

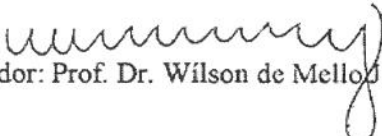
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Neuranei Salete Bonfiglio

“ESTEREOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DA MUCOSA DA
PARTE PROXIMAL DO DUODENO DE CAMUNDONGOS
C57BL/6 SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO EXPERIMENTAL”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Neuranei Salete Bonfiglio
e aprovada pela Comissão Julgadora

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Celular e
Estrutural na área de Anatomia.


Orientador: Prof. Dr. Wilson de Mello Junior

Fevereiro – 2006



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA FL UNICAMP
B641e
 V EX
 TOMBO BC/ 69028
 PROC. 16.123-06
 C ☐ D ☒
 PREÇO 11,00
 DATA 23-06-06

BIB ID: 383915

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

*Título diferente
da página next*

B641e

Bonfiglio, Neuranei Salete

Estereologia e ultra-estrutura da mucosa da parte proximal do duodeno de camundongo submetido ao alcoolismo experimental / Neuranei Salete Bonfiglio. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Wilson de Mello Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Histologia. 2. Ultraestrutura (Biologia). 3. Duodeno. 4. Camundongo. 5. Álcool. I. Mello Júnior, Wilson de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Stereology and ultrastructure of the mucosa of mouse proximal duodenum submitted to experimental alcoholism.

Palavras-chave em inglês: Histology; Ultrastructure (Biology); Duodenum; Mice; Alcohol.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

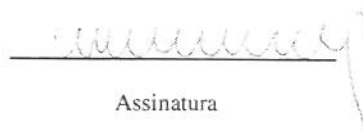
Banca examinadora: Wilson de Mello Júnior, Daniela Carvalho dos Santos, Elisa Aparecida Gregório, Antonio Marcos Orsi, Patricia da Silva Melo.

Data da defesa: 23/02/2006.

Campinas, 23 de fevereiro de 2006.

Banca Examinadora

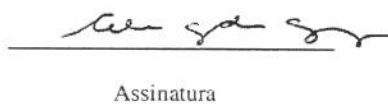
Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi

Assinatura

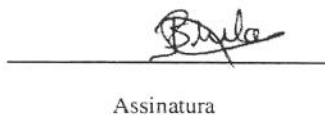
Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório


Assinatura

Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos


Assinatura

Profa. Dra. Patricia da Silva Melo


Assinatura

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

Assinatura

Prof. Dr. Progresso José Garcia

Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro


Assinatura



A QUEM DEDICO

*"Entre as melhores coisas da vida, estão
as pessoas que fazem os nossos dias
serem mais especiais, pois preenchem
nossa história com momentos felizes e
nos permitem sorrir através do coração."*

DEDICO este trabalho a essas pessoas especiais:

Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior pelo incentivo e por mostrar-me a importância de seguir sempre adiante.

Daniel e Renan, meus queridos filhos, razão pela qual nunca poderei desistir.

HOMENAGEM

*"Há grandes homens que fazem com que
todos se sintam pequenos. Mas o verdadeiro
grande homem é aquele que faz com que
todos se sintam grandes."*

Charles Dickens

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda** pela maneira especial com que me ensinou os primeiros passos para o entendimento e a aplicação da Estereologia.

À **Prof^a Dr^a Elisa Aparecida Gregório** pelo modo distinto com que repartiu seus conhecimentos, adquiridos ao longo do tempo, disponibilizando-os para a conclusão deste estudo.

À **Prof^a Dr^a Daniela Carvalho dos Santos** pela paciência, eficiência e competência ao conduzir parte desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

*"Todos aqueles que conhecemos
profundamente nos formam, nos modificam
e nos constroem."*

Ao **Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior**, pela forma especial com que conduziu a orientação deste estudo do princípio ao fim.

Ao **Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi**, atencioso em todos os momentos solicitados.

Ao **Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez**, pelas pertinentes sugestões que auxiliaram na melhoria do trabalho.

Aos demais professores **Profª Drª Patricia da Silva Melo, Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro e Prof. Dr. Progresso José Garcia** que ao aceitarem fazer parte da Banca Examinadora demonstraram carinhosamente que podem contribuir para a grandeza deste estudo.

À **Profª Drª Shirlei Maria Recco Pimentel e à Profª Drª Maria Júlia Marques** pela cordialidade com que me receberam no Programa.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP – Campus de Botucatu, **Nivalde Antônio Basso e Maria Helena Moreno**, pelo modo eficiente com que auxiliaram na parte técnica da microscopia eletrônica.

Ao funcionário do Laboratório de Microscopia do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP, **Gelson Rodrigues** pela sua colaboração na preparação das lâminas histológicas.

Ao **André de Azevedo** que incansável, paciente e gentilmente participou da formatação e edição deste trabalho.

À querida **Líliam Alves Senne Panagio**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pois sua eficiência, sua dedicação e seu carinho trouxeram leveza aos nossos afazeres.

À especial **Melissa de Oliveira**, amiga de longa jornada que compartilhou a revisão do texto.

À grande amiga **Eliane Victoriano**, que soube acolher-me afetuosamente em sua terra natal e com a qual passei muitos momentos agradáveis.

Aos queridos **colegas do Laboratório de Anatomia da FURB**, que tão bem conduziram as atividades durante a minha ausência.

Aos **meus familiares** que sempre compensaram minha ausência auxiliando para que eu pudesse desenvolver tranquilamente este estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1.1 Alcoolismo	1
1.1.2 Álcool e nutrição	3
1.1.3 Ingestão de etanol e seus efeitos sobre a morfofisiologia da mucosa duodenal.....	5
1.1.4 Aspectos morfológicos do duodeno	8
1.2 OBJETIVOS.....	9
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
1.3.1 Modelo animal	9
1.3.2 Grupos experimentais	10
1.3.3 Coleta do material.....	11
1.3.4 Processamento do tecido e análise dos dados.....	11
1.3.4.1 Microscopia de luz e estereologia	11
1.3.4.2 Análise imunocitoquímica.....	12
1.3.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	13
1.3.4.4 Microscopia eletrônica de varredura	13
1.3.5 Análise estatística	14
2 ARTIGOS.....	15
2.1 Effects of the chronic ethanol ingestion on the mice duodenal villi	16
Abstract.....	17
Introduction	18
Materials and Methods	19
Results	22
Discussion.....	24
References	28
Legends.....	33
Table 1	38

Figure 1.....	39
Figure 2.....	40
Figure 3.....	41
Figure 4.....	42
Figure 5.....	43
2.2 Morte de enterócitos em vilos duodenais proximais de camundongos alcoólicos.....	44
Resumo.....	44
Introdução.....	45
Materiais e Métodos.....	48
Resultados.....	50
Discussão.....	52
Conclusão.....	58
Referências.....	58
Legendas.....	65
Figura 1.....	70
Figura 2.....	71
Figura 3.....	72
Figura 4.....	73
Figura 5.....	74
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS.....	79

RESUMO

O alcoolismo consiste num dos grandes problemas de farmacodependência do mundo, gerando uma das principais preocupações em saúde pública. Inúmeras são as complicações gastrointestinais decorrentes do consumo de bebidas alcoólicas. O recente foco de estudos científicos concentra-se em substâncias que podem interferir na preservação, manutenção e função da barreira intestinal, com diversos mecanismos biológicos não totalmente conhecidos. Investigações dessa natureza podem prover informações para entender o papel das repetidas exposições de etanol em baixa concentração sobre a morfofisiologia da mucosa do intestino delgado e estabelecer correlações com a toxicidade aguda já conhecida. Camundongos C57BL/6 constituem modelos experimentais para estudos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, nutricionais e farmacológicos, importantes para a compreensão do alcoolismo. O presente trabalho analisou a morfologia da parte proximal da mucosa duodenal da linhagem de camundongos C57BL/6. Submetidos ao tratamento crônico com etanol 4,2% foram divididos em 2 grupos: controle (GC) e alcoólico (GA). O GC recebeu, diariamente, 30 ml de dieta líquida (Sustacal) com dextrose (Dextrosol) no equivalente calórico do etanol 4,2% e o GA, dieta líquida (Sustacal), acrescida de etanol 4,2%. Ambos os grupos receberam água *ad libitum*. Após 8 semanas de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta e processamento do duodeno destinado às técnicas microscópicas e estereológicas. A análise histológica revelou que os animais alcoólicos apresentaram vilos duodenais mais curtos e largos, com grande perda de epitélio, especialmente no ápice. Áreas de mucosa apareceram aplainadas, sem vilos. Estereologicamente, houve redução na densidade de superfície de vilos e numérica de células caliciformes. A ultra-estrutura evidenciou imagens de morte celular por apoptose, autofagia e necrose nos animais alcoólicos. Os dados sugerem que doses clinicamente aceitáveis de etanol representam risco para a manutenção da integridade do vilo duodenal, interferindo na sobrevivência da barreira intestinal e, possivelmente, na sua fisiologia. Portanto, a ação lesiva do etanol é preocupante para consumidores leves.

Palavras-chave: histologia, ultra-estrutura, enterócitos, duodeno, camundongos C57BL/6, etanol

OBS: O projeto foi aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética na Experimentação com Animais (CEEAA), sob protocolo nº 001/02 em reunião do dia 06/06/02.

ABSTRACT

Alcoholism consists in one of the greatest problems of pharmacodependence, generating one of the main concerns in world public health. Several gastrointestinal complications decurres from alcoholic beverage consumption. The recent scientific studies enphasys is concentrated in substances that can interfere on preservation, maintenance and function of the intestinal barrier throught several mechanisms that are not well known. Inquiries of this nature can provide knowledge to understand the role of repeated expositions of ethanol in low concentration on the morpho-physiology of the intestinal mucosa establishing correlations with the already known acute toxicity. C57BL/6 mice constitute experimental models for works related to morphologic, physiological, biochemical, nutritritional and pharmacological effects of ethanol, such studies are important means to understand human alcoholism. The present work analyzed the morphology of the proximal part of the duodenal mucosa of the mice lineage C57BL/6 submitted to a chronic ethanol 4,2% treatment, and divided into two groups: control (GC) and alcoholic (GA). Daily, the GC received 30 ml of a liquid nutritionally adequated diet (Sustacal) with dextrose (Dextrosol) in the equivalent caloric of etanol 4.2% and the GA received liquid diet (Sustacal) increased by etanol 4.2% (v/v). Both groups had received water *ad libitum*. After 8 weeks of treatment, the animals had been submitted to euthanasia for duodenum sampling and proceeding in order to microscopical and estereological techniques. Histological analysis showed that the animals from the GA presented shorter and enlarged duodenal villi with great loss of epithelium specially in apex. Mucosa areas seemed to be smooth, without villous. Estereologically, there was reduction in the surface density of villi and numerical density of goblet cells. In alcoholic animals, the ultra-structural characteristics seen evidenced cell death: apoptosis, autophagy, and necrosis. This data suggest that the consumption of quantities clinically acceptable of ethanol represent risk to the maintenance of the duodenal villous integrity, interfering in the survival of the intestinal barrier and, possibly, in its physiology. Therefore, facts indicate that ethanol harmful action is concerning to whom is a light drinker.

Key-words: histology, ultrastructure, enterocytes, duodenum, mice C57BL/6, ethanol

OBS: The project was approved without restrictions for the Committee of Ethics in the Experimentation with Animals (CEEAA) of the Blumenau Regional University – SC - Brazil under protocol in 01/02.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1.1 Alcoolismo

O tema específico do alcoolismo foi incorporado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) à Classificação Internacional das Doenças (CID-8), a partir da 8ª Conferência Mundial de Saúde em 1967. O Ministério da Saúde do Brasil definiu alcoolismo como a dependência do álcool e/ou os problemas relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas. O termo alcoolista (ou alcoólico) refere-se tanto aos bebedores-problemas quanto aos dependentes do álcool. O bebedor-problema é a pessoa que apresenta qualquer tipo de problema (físico, psíquico ou social) decorrente do consumo do álcool, sem dependência (BRASIL, 1994). Dependente do álcool é a pessoa que preenche os critérios para a dependência do álcool, de acordo com a 10ª Revisão da Classificação Internacional de Doenças – CID 10 (ORGANIZAÇÃO..., 1993).

O alcoolismo ou a dependência química ao álcool é uma doença crônica (de longa duração). É um estado de intoxicação, causado pelo consumo excessivo de álcool que desenvolve-se em ritmos diferentes em cada pessoa, de acordo com suas características físicas, emocionais e psicológicas, grau de tolerância ao álcool e tipo de bebida ingerida (SECRETARIA....., 2005).

Em todo o mundo, o consumo de substâncias psicoativas e as farmacodependências representam um grande problema aos indivíduos e à sociedade. O

álcool é um dos principais fatores de risco, em termos de doenças evitáveis, ocupando o 5º lugar, com previsões de continuar no alto da lista entre 2010 e 2020 (ORGANIZAÇÃO..., 2004).

As doenças crônicas figuram como a principal causa de mortalidade e incapacidade no mundo, sendo responsáveis por 59% dos 56,5 milhões de óbitos anuais (ORGANIZAÇÃO..., 2005). Embora, os coeficientes de prevalência de alcoolismo entre os países sejam divergentes, cerca de 10% da população mundial é dependente de álcool (MAGALHÃES, 2000). Na Europa, o consumo de álcool é responsável por 10% do ônus total de doenças (EZZATI et al., 2002). Nos últimos 16 anos, atribuiu-se ao álcool a causa de uma em cada quatro mortes de homens jovens europeus entre 15 a 29 anos (HAGMANN, 2001). Aproximadamente 14 milhões de americanos, ou seja, 7,4% da população preenchem o critério diagnóstico para abuso de álcool ou alcoolismo (KANG & ZHOU, 2005) e cerca de 1,5 milhões procuram tratamento para o alcoolismo (MARKOWITZ, 2000), custando cerca de 184 bilhões de dólares ao ano (SHALALA, 2000). No Brasil, foram identificados alguns trabalhos epidemiológicos de prevalência do alcoolismo, que, utilizando diversos métodos de tratamento, descreveram prevalências que variaram de 3,4% a 22,6% (SOUZA, 2005).

O alcoolismo torna-se cada vez mais alarmante e pouco se sabe sobre a extensão do problema. Em todo o mundo, o número de mortes e de incapacitados pelo consumo do álcool equivale à soma dos casos provocados pela pressão alta e pelo fumo. Segundo Robin Room, pesquisador da Universidade de Estocolmo, “em um mundo de mercados cada vez mais comuns, uma política sobre o uso do álcool não é mais uma questão nacional, mas sim internacional” (ROOM et al., 2005).

Os dados epidemiológicos apresentados afirmam a necessidade do desenvolvimento de pesquisas nas mais diversas áreas do conhecimento sobre as consequências do uso abusivo de álcool.

1.1.2 Álcool e nutrição

O álcool é a droga psicoativa mais antiga conhecida pelo homem (SANTOS et al., 1994). Beber álcool é costume desde a pré-história (CARDIM et al., 1986) e, em algumas sociedades, as bebidas alcoólicas são consideradas parte da suplementação alimentar (LIEBER, 1991).

O álcool contido nas diferentes bebidas alcoólicas utilizadas pelo homem é o etanol (álcool etílico). O conteúdo de etanol das diferentes bebidas alcoólicas é expresso em graus “Gay-Lussac” (°GL) que correspondem ao número de milímetros de etanol em cada 100 ml da bebida. Em média, a cerveja contém 4 a 5°GL, os vinhos 8 a 14°GL e as bebidas destiladas 40 a 50°GL (BRASIL, 1994).

Segundo LIEBER (1992), o etanol é fonte substancial de energia, com 7,1 kcal (29,7kJ) por grama, valor que excede a energia contida em carboidratos ou proteínas. Em alcoólicos, aproximadamente metade da ingestão calórica total é proveniente do etanol. Por substituir nutrientes normais, pode causar desnutrição, incluindo deficiências de ácido fólico, tiamina (vitamina B₁) e outros nutrientes (LIEBER, 2004). Em alcoólicos desnutridos, quando o álcool é consumido antes da ingestão de uma dose oral simples de tiamina, a sua absorção máxima é significativamente diminuída (COOK et al., 1998).

A desnutrição é, provavelmente, uma combinação de diversos fatores, como dieta pobre, diminuição da capacidade de armazenamento, aumento na perda de eletrólitos e de microelementos, aumento das exigências metabólicas e má-absorção (GREEN, 1983; WORLD & RYLE, 1985; THOMSON, 2000; MARKOWITZ, 2000).

Diversos são os mecanismos que podem contribuir para a ocorrência de má-absorção (BALLARD et al., 1988). Secundariamente, a desnutrição também pode ocorrer pela má-absorção devido às complicações gastrointestinais tais como, disfunções pancreáticas e hepáticas (LIEBER, 1992, 2004). Sugeriu-se que a desnutrição, em consequência do consumo de etanol, pode também ocorrer devido a distúrbios na absorção intestinal (BALLARD et al., 1988). Em aproximadamente 60% dos alcoólicos crônicos ocorre má-absorção intestinal, diagnosticada pela absorção diminuída de D-xilose, vitamina B₁₂ e presença de esteatoréia (MINCIS, 2002).

O folato é o micronutriente mais deficiente em indivíduos cronicamente dependentes do álcool (WU et al., 1975; HALSTED et al., 2002). Relatou-se que, mesmo em presença de dieta adequada, a administração de álcool por longos períodos, ocasiona deficiência significativa de ácido fólico (DE LA VEJA et al., 2001; MINCIS, 2002; LIEBER, 2004). Em alcoólicos, a associação do efeito do etanol com a deficiência de ácido fólico pode produzir diminuição na absorção de D-xilose, glicose, água e sódio (MINCIS, 2002). A administração aguda de etanol pode inibir a absorção de aminoácidos (KAMINO & INOUE, 1969; IBER, 1971; DINDA et al., 1975) e interferir no transporte de glicose pelo epitélio (BODE, 1980). Em adição, a ingestão de etanol promove a degradação de nutrientes, entre eles a vitamina A (LIEBER, 1992).

Em decorrência do consumo crônico de etanol, os fatores intestinais possuem papel dominante na absorção e no transporte de água, eletrólitos e nutrientes (ALTHAUSEN et al., 1960; HALSTED, 1973; HOYUMPA et al., 1975; KRASNER et al., 1976; DINDA & BECK, 1977; GOETSCH & KLIPSTEIN, 1977; HOYUMPA et al., 1981; BJORKMAN et al., 1994). Pesquisadores propuseram que o efeito inibitório do etanol na absorção intestinal é secundário aos efeitos na morfologia (BARAONA et al., 1974; FOX et al., 1978a; KUO & SHANBOUR, 1978; FOX et al., 1978c), porque compromete a integridade das vilosidades intestinais (FIELDS et al. apud MINCIS, 2002), destruindo o epitélio absorvente como resultado da perda celular. Por outro lado, em algumas regiões do intestino, a ingestão crônica de etanol promove grande desequilíbrio na atividade enzimática, na produção e no acúmulo de acetaldeído. Esse mecanismo pode ser responsável pela toxicidade celular local levando a danos mucosais, à hiper-regeneração compensatória e, possivelmente, à carcinogênese na mucosa retal e colônica de alcoólicos como efeitos do acetaldeído (PRONKO et al., 2002).

Resumidamente, os processos múltiplos de desnutrição e má-absorção intestinal podem ser afetados de diversas maneiras pela exposição aguda ou crônica do etanol, direta e indiretamente.

1.1.3 Ingestão de etanol e seus efeitos sobre a morfofisiologia da mucosa duodenal

O etanol atravessa todas as membranas biológicas por difusão simples (KALANT, 1971). Ele é completamente absorvido no estômago, duodeno e jejuno proximal, distribuindo-se por todos os tecidos e fluidos do organismo (MEZEY, 1975).

Estudos prévios, em animais experimentais e humanos, mostraram que os efeitos do etanol no intestino estão relacionados com a dose, o modo e a duração da administração, a espécie de animal e os métodos experimentais usados, o tipo e a concentração da substância testada (BARAONA et al., 1974; WORTHINGTON et al., 1978; PERSSON et al., 1990; FOX et al., 1979; MILLAN et al., 1980; LEV et al., 1980; SEITZ et al., 1985; PRONKO et al., 2002; ASAI et al., 2003).

A ingestão aguda de etanol causa danos na mucosa duodenal e jejunal proximal (BECK & DINDA, 1981; BODE & BODE, 2003), além de alteração na motilidade gastrointestinal (BECK & DINDA, 1981). Ingestão prolongada de altas doses de etanol produz alterações morfológicas significantes no intestino delgado, podendo afetar a atividade enzimática mucosal (BARAONA et al., 1974; BODE, 1980; LIEBER, 1982; HOYUMPA, 1986), a permeabilidade (TAMAI et al., 2000; BODE & BODE, 2003), o transporte intestinal através das membranas (CHANG et al., 1967; DINDA & BECK, 1977; HOYUMPA, 1981; BJORKMAN & JESSOP, 1994; THOMSON, 2000) e o crescimento bacteriano (BODE et al., 1984; LEMBKE et al., 1985; CASAFONT et al., 1998; BODE & BODE, 2003).

As teorias mais aceitas propõem-se a explicar as complicações infecciosas do alcoolismo incluindo imunossupressão sistêmica e translocação de bactérias do lúmen intestinal (MACGREGOR, 1986; DUNNE, 1989). Estudos demonstraram que, em ratos, a ingestão crônica de etanol 5% (v/v) pode reduzir os componentes humoral e celular da mucosa do intestino, possivelmente pela perda celular como resultado da apoptose induzida pelo etanol (SOUZA et al., 2003).

Em concentrações elevadas, o etanol produz efeitos deletérios na morfofisiologia das células epiteliais do intestino delgado comprometendo sua sobrevivência (MINCIS, 2002). Estudos revelaram que o consumo abusivo de etanol compromete os vilos intestinais (HERMOS et al., 1972; MILLAN et al., 1980; VAQUERA et al., 2002; ASAI et al., 2003), os enterócitos (RUBIN et al., 1972; FOX et al., 1978a; ZUCULOTO & ROSSI, 1979; BECK & DINDA, 1981; BALLARD et al., 1988; OTANI, 2003), as células caliciformes (LEV et al., 1980; VAQUERA et al., 2002) e a lâmina própria (HOYUMPA et al., 1975; CASINI et al., 1999), além de aumentar o risco de câncer colorretal (PRONKO et al., 2002; OTANI et al., 2003; PUROHIT et al., 2005).

Há inúmeros estudos sobre os efeitos do etanol no sistema digestório, porém a maioria utilizando altas concentrações, o que devido a toxicidade do etanol ficou claro seu efeito deletério. No entanto, a questão sobre os efeitos do etanol em baixa concentração, administrado cronicamente, sobre o sistema digestório, aproximando-se da realidade do maior consumo humano, permanece controversa e pouco esclarecedora. Investigações desta natureza podem prover conhecimentos para melhor compreender o mecanismo de repetidas exposições do etanol em baixas concentrações sobre a morfofisiologia celular, estabelecendo correlações com a toxicidade aguda já conhecida. Mediante o importante papel do epitélio absorvente na nutrição do indivíduo, às inúmeras complicações resultantes de uma desnutrição e, também à expressividade da barreira intestinal, faz-se necessário estudar os possíveis mecanismos biológicos que possam levar a sua alteração morfofuncional e, até mesmo, sua destruição.

1.1.4 Aspectos morfológicos do duodeno

Em camundongos, o intestino delgado é um tubo com cerca de 45 cm de comprimento, estendendo-se do piloro ao ceco. Divide-se em 3 unidades: duodeno, jejuno e íleo não delimitadas anatomicamente. O duodeno consiste de uma alça em forma de U estendendo-se do piloro, posteriormente, em nível da cicatriz umbilical e uma parte transversa, dorsal à margem posterior do estômago. A área de superfície do intestino delgado é aumentada por projeções semelhantes a dedos – as vilosidades ou vilos. No duodeno, os vilos são longos e filiformes. As glândulas intestinais tubulares curtas (criptas de Lieberkühn) abrem-se entre os vilos adjacentes. Próximo ao piloro, grupos de glândulas duodenais tubuloalveolares (de Brünner) estendem-se na submucosa, abrindo-se nas bases das glândulas intestinais. As células epiteliais de cobertura (enterócitos) do vilo são colunares altas, com borda estriada, núcleos ovais de localização basal (THE STAFF..., 1966) e caracterizadas pela ausência de produtos secretórios no citoplasma (CHENG & LEBLOND, 1974). A superfície basal das células epiteliais assentam-se sobre uma lâmina basal bem definida que limita os compartimentos estromal e epitelial dos vilos. A continuidade da lâmina basal só é interrompida em lugares onde os linfócitos intra-epiteliais são encontrados entre o estroma e o epitélio (ABBAS et al., 1989).

As células caliciformes são ovais e estão dispersas entre os enterócitos. Tais células ocorrem com menor frequência no duodeno quando comparado com os demais segmentos do intestino delgado (BRENNAN et al., 1999). Análises em microscopia eletrônica de transmissão revelam a presença de acúmulo de grânulos de mucigênio na matriz citoplasmática apical (ROSS et al., 1995).

O estroma dos vilos é composto de tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos, células musculares lisas e fibras nervosas. Plasmócitos, leucócitos e macrófagos também podem estar presentes no estroma (ABBAS et al., 1989).

1.2 OBJETIVOS

a) Analisar histológica e ultra-estruturalmente o epitélio da mucosa da parte proximal do duodeno de camundongos C57BL/6 submetidos à ingestão crônica de etanol em baixa concentração..

b) Quantificar os parâmetros estereológicos: densidade de superfície de vilos duodenais e densidade numérica de células caliciformes.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Modelo animal

Foram utilizados camundongos, linhagem C57BL/6, adultos e machos, obtidos no Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP) – SP. Os animais foram transferidos e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) – Campus de Erechim – RS, para os períodos de ambientação e adaptação (4 semanas) e tratamento (8 semanas).

1.3.2 Grupos experimentais

Após os períodos de ambientação e adaptação, com 7 semanas de idade, pesando cerca de 20 gramas, os camundongos foram distribuídos em 2 grupos:

GC = controle (12 animais)

GA = alcoólico (12 animais)

Os animais foram mantidos, individualmente, em caixas de polipropileno em um ambiente controlado (temperatura: $21\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade do ar: $60\pm10\%$, ciclos de exaustão de ar: 15min/h e ciclos claro/escuro: 12h com luz artificial das 7:00-19:00h). Diariamente, cada animal do GA recebeu 30 ml de dieta líquida (Sustacal – MeadJohnson), acrescida de solução de etanol 4,2% (30% do total de calorias ingeridas). O GC recebeu a mesma quantidade de dieta líquida, porém o etanol foi substituído por dextrose (Dextrosol), no equivalente calórico do etanol administrado ao GA. Diariamente, ambos os grupos receberam água à vontade. A formação dos grupos ficou condicionada a um período de adaptação gradativa ao consumo de sustacal, etanol e dextrose (Apêndices A, B e C). O peso dos animais e o consumo de água foram aferidos semanalmente.

Os protocolos experimentais usados foram aprovados sem restrições pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Regional de Blumenau – SC, sob protocolo nº 001/02, segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

1.3.3 Coleta do material

Após 8 semanas de tratamento, os animais foram pesados, anestesiados com éter etílico e eutanasiados por decaptação. Para a coleta do segmento proximal do duodeno destinado à microscopia realizou-se uma incisão na cavidade abdominal na linha alba.

1.3.4 Processamento do tecido e análise dos dados

1.3.4.1 Microscopia de luz e estereologia

Amostras da parte proximal do duodeno de 8 animais de cada grupo foram obtidas segundo a técnica de “cortes verticais” para análise com sistema-teste de arcos ciclóides (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). As amostras foram fixadas em solução de Bouin, desidratadas, diafanizadas e incluídas em Paraplast plus®. Dezoito secções de 4µm de espessura foram obtidas de cada animal e coradas pelos métodos H&E, PAS e Tricrômico de Masson. A densidade de superfície dos vilos e a densidade numérica de células caliciformes foram determinadas pela observação de 9 campos microscópicos por animal, totalizando 72 campos por grupo. A análise estereológica e a fotodocumentação foi realizada usando um vídeo-microscópico Leica modelo DMRBE com vídeo câmera Kappa CF a 5/5 e um monitor Triniton Sony, com objetivas de x5 e x10 (Laboratório de Morfometria Cardiovascular do Instituto de Biociências – UERJ – RJ). Um sistema de arcos ciclóides foi colocado sob a tela do monitor e calibrado. O número de intersecções (I)

entre os contornos dos vilos e dos arcos ciclóides foram contados para estimar a densidade de superfície dos vilos (S_v). Para obter a densidade numérica (N_A) de células caliciformes, contou-se o número de células por área-teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). A área-teste bidimensional total foi de $3.600\mu\text{m}$.

1.3.4.2 Análise imunocitoquímica

Localização *in situ* de novas extremidades 3'-OH do DNA: TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)

A técnica do TUNEL para determinação de fragmentação de DNA foi realizada de acordo com Souza *et al.*, 2003, utilizando o protocolo do kit de detecção (FRAG-EL, Oncogene, código: QIA 33). Os fragmentos da parte proximal do duodeno foram fixados em solução de Bouin, desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast plus®. Cortes de $4\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos de cada animal e colocados em lâminas silanizadas. Em seguida, foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao protocolo do kit para detecção de morte celular, utilizando-se o Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) como enzima. O alvo da marcação foram os novos finais 3' -OH de DNA gerados pela fragmentação do DNA durante o processo de morte celular.

1.3.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos da parte proximal do duodeno de 4 animais de cada grupo foram fixados em glutaraldeído 2,5%, diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por 24 h. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2 horas. Os fragmentos foram lavados em água destilada e submetidos à desidratação em soluções crescentes de acetona. A embebição foi realizada, primeiramente, em mistura de resina (Araldite®) e acetona 100% e, após em resina pura à temperatura de 37°C. Para a inclusão utilizou-se resina pura e polimerização em estufa à 60°C. Cortes semifinos (5 µm) foram corados à quente com solução de azul de toluidina 1% - azur II 1% em solução aquosa de bórax 1% e examinados em microscópio de luz. Após a seleção dos blocos, contendo material de interesse, obteve-se secções ultrafinas (50nm) que foram contrastadas com solução alcoólica de acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise e a fotodocumentação foi realizada utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão (CM 100 - Philips) do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP.

1.3.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos da parte proximal do duodeno de 4 animais de cada grupo foram coletados e fixados em solução de glutaraldeído 2,5% diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, por 24 horas. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 30 minutos e desidratados em soluções

crescentes de álcool etílico. O material foi submetido ao ponto crítico de secagem com CO₂ líquido, em aparelho CPD 020 (Balzers Union). Após, os fragmentos foram colados em suportes apropriados e levados à metalização com 10 nm de ouro em aparelho MED 010 (Balzers Union). A análise e a fotodocumentação foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEMC-515 - Philips) do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP.

1.3.5 Análise estatística

Os dados referentes ao peso dos animais e ao consumo de água foram organizados no programa Excel e submetidos a análise pelo teste F, que informou se as variâncias entre os grupos foram diferentes ou não. Quando não houve diferença entre as variâncias, usou-se o teste t de variâncias equivalentes. Os dados resultantes dos parâmetros estereológicos e as diferenças entre os grupos foram analisados através do teste não-paramétrico (teste de Kolmogorov-Smirnov) usando o programa *Statistic*. O nível de 0,05 foi considerado para significância estatística (ZAR, 1999).

2 ARTIGOS

2.1 Effects of the chronic ethanol ingestion on he mice C57BL/6 duodenal villi.

Artigo submetido à publicação na *Alcohol and Alcoholism*.

2.2 Morte de enterócitos em vilos duodenais proximais de camundongos alcoólicos.

EFFECTS OF THE CHRONIC ETHANOL INGESTION ON THE MICE DUODENAL VILLI

***BONFIGLIO, N. S.; **MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. and ***MELLO
JUNIOR, W.**

***Natural Sciences Department, Universidade Regional de Blumenau, FURB, SC,
Brazil.**

****Laboratory of Morphometry & Cardiovascular Morphology, Universidade
Estadual do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil.**

*****Anatomy Department, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista,
UNESP, Botucatu, SP, Brazil.**

Address for correspondence:

*Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior
Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Departamento de Anatomia
Caixa Postal 510
Rubião Júnior
18.618-000 – Botucatu – SP
Brasil*

Fone: [+55.14] 3811 6040

Fax: [+55.14] 3811 6361

E-mail: mellojr@ibb.unesp.br

Key-words: ethanol, alcoholism, mice, morphology, enterocytes, duodenum.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the morphology of duodenal villi in the mice C57BL/6 after chronic ingestion of ethanol at low concentration. In the present study, chronic ingestion of ethanol in a liquid diet (30% of total calories) altered the proximal part of the mucosa of the mice, when compared with isocaloric controls. The ethanol damaged the goblet cells and enterocytes. The basal surface of enterocytes was shown to be detached from the basal lamina. Intercellular spaces were dilated and the lamina propria suffered retraction and increase in cellularity. In the basal region of the enterocytes, areas of cytoplasmic rarefaction were observed containing endoplasmic reticulum and free ribossomes. The basal lamina presented occasional discontinuities and there was detachment of a large part of the epithelium of the villi. In some villi, especially in the apex, formation of blebs was evident, protruding to the lumen. The tissue lesions resulting from ingestion of ethanol at low concentrations for long periods are similar to those observed during acute ingestion of low and high concentrations. In the present work, it was evident that low concentrations of ethanol, administered chronically, reduce villi surface densities and the number of goblet cells. Thus it was concluded that alcoholism represents a risk factor for maintenance of the integrity of duodenal villi, interfering in intestinal physiology.

INTRODUCTION

Annually, about 1.5 million Americans seek treatment for alcoholism (Markowitz *et al.*, 2000). Malnutrition is frequently observed in chronic alcoholics and may have multi-factorial causes (Santolaria *et al.*, 2000). It has been suggested that malnutrition as a consequence of ethanol consumption also could have occurred due to disturbances in intestinal absorption (Ballard *et al.*, 1988). Intestinal malabsorption occurs in approximately 60% of chronic alcoholics, diagnosed by decrease in the absorption of D-xylose, vitamin B₁₂ and presence of steatorrhea (Mincis, 2002). It was observed that, even in the presence of an adequate diet, the administration of alcohol, for long periods, may lead to significant folic-acid deficiency (De La Veja *et al.*, 2001; Mincis 2002; Lieber, 2004). Chronic ethanol abuse alters lipid-soluble (vitamins A, D and E) and water-soluble (B-complex vitamins, vitamin C) vitamins status, and some trace elements status such as magnesium, selenium or zinc (Maillot *et al.*, 2001). The association of ethanol effect with folic-acid deficiency can produce, in alcoholics, decrease in the absorption of D-xylose, glucose, water and sodium (Mincis, 2002). Acute administration of ethanol can, also, inhibit absorption of amino acids (Kamino & Inoue, 1969; Dinda *et al.*, 1975) and transport of glucose by the epithelium (Bode, 1980).

Several mechanisms can contribute to occurrence of malabsorption (Ballard *et al.*, 1988). It was demonstrated that chronic consumption of ethanol compromises the integrity of intestinal villi (Fields *et al.*, 1994 *apud* Mincis, 2002). This could be one of the factors responsible for malabsorption of nutrients and, secondarily, for malnutrition.

Previous studies, in animals and humans, showed that effects of ethanol in the intestine are related to dose, manner and duration of administration, species of animals and experimental methods used, the type and concentration of the substance tested (Baraona *et al.*, 1974; Worthington *et al.*, 1978; Persson *et al.*, 1990; Millan *et al.*, 1980; Lev *et al.*, 1980; Buell & Beck, 1983; Seitz *et al.*, 1985; Pronko *et al.*, 2002; Asai *et al.*, 2003). Yet the question about effects of ethanol at low concentrations, administered chronically, on the integrity of intestinal villi remain controversial and little understood, principally with respect to quantification and ultrastructure of its constituent elements. The present work aimed to evaluate the morphology of duodenal villi in mice after chronic ingestion of ethanol at low concentration. Inquiries of this nature can provide knowledge to better understand the mechanism of repeated exposures to ethanol on duodenal morphology and establish correlations with already known acute toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Groups

Twenty-four (24) male mice, C57BL/6, were used in this study. The animals were divided into two groups: control (n=12) and alcoholic (n=12), individually maintained in polypropylene cages in a controlled environment ($t = 21 \pm 1^\circ\text{C}$, air humidity $60 \pm 10\%$, air exhaustion cycles of 15min/h e light/dark cycles of 12h with artificial light from 7:00 to 19:00h). Daily, each animal from the alcoholic group received nutritionally adequate liquid

diet (Sustacal – MeadJohnson), increased by 4.2% ethanol (equivalent to 30% of total calories). The control group received the same volume of liquid diet, but dextrose (Dextrosol) was used instead of ethanol, at the caloric equivalent of ethanol administered to the alcoholic group. Both groups received water *ad libitum*. After 8 weeks of treatment, the animals were weighed, anesthetized by etilic ether and euthanized by decapitation. An incision was made in the abdominal cavity to collect material destined for microscopy. The experimental protocols used were approved by the Committee on Ethics in Animal Experimentation of the Regional University of Blumenau – SC – Brazil, according to the principles of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Processing of Tissues for Structural Analysis

Samples from the proximal part of the duodenum of eight animals from each group were obtained by the "vertical cuts technique" for analysis with cycloid arcs test-system (Mandarim-de-Lacerda, 1995). The samples were fixed in Bouin solution, dehydrated, diaphanized and included in Paraplast plus®. Eighteen sections 4µm in thickness were obtained from each animal and stained by H&E, PAS and Masson Trichromic. The density of the surface of villi and the numerical density of goblet cells were determined by observation of 9 microscopic fields per animal, totaling 72 fields per group. For stereological analysis and photo-documentation was used a video-microscope (Leica model DMRBE with Kappa CF 5/5 video camera and Triniton Sony monitor) with objectives of 5x and 10x. A system of cycloid arcs was placed on the monitor screen and

calibrated. The number of intersections between profiles of villi and cycloid arcs (I) were counted to estimate the density of villi surface (S_v). To obtain the numerical density (N_A) of goblet cells, the number of cells per test-area was counted as described by Mandarim-de-Lacerda (1995). The total test-area was $3.600\mu\text{m}$. For statistical analysis of stereological parameters the non-parametric Kolmogorov-Smirnov test was utilized through the program *Statistic*. The level of 0.05 was considered statistically significant (Zar, 1999).

Processing of Tissues for Ultrastructural Analysis

Electron Microscopy

Samples of the proximal part of the duodenum of four animals from each group were fixed in glutaraldehyde 2.5%, diluted in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.3, for 24 hours. After, they were routinely processed for TEM and SEM in agreement with the protocol of the Electronic Microscopy Center at the Institute of Biosciences of the Paulista State University – Botucatu – SP. The selected sections were examined and photo-documented by Philips electronic microscope (CM-100 and FEMC 515).

RESULTS

Structural Findings

Animals of the control group presented well-preserved villi (Fig. 1A and Fig. 1B). However, in animals from the alcoholic group, destruction of the villi was observed in focal areas of the duodenal mucosa. Denuded areas were characterized by disappearance of villi that had suffered degeneration (Fig. 1C). Loss of epithelium from the apical extremity of villi (Fig. 1D). In this case, the cells were observed to be cuboid. There was formation of blebs under the necrotic layer of enterocytes with retraction of the lamina propria (Fig. 1E). An increase in cellularity of the lamina propria was observed in the core of the villi (Figs. 1E and 1F).

Under light microscopy, stereological analysis revealed that, in mice, chronic ingestion of solutions of ethanol 4.2% (v/v) was capable of decrease the surface density of villi ($S_{[V]}$) per unit area, as well as the numerical density of goblet cells ($N_{[A]}$) in the test-area. Alcoholic animals presented reduction of about 37% in density of villi surface and decrease of approximately 50% in numerical density of goblet cells as shown in Table 1.

Ultrastructural Findings

Animals from the control group presented duodenal normal villi, erect, finger-like and with well-preserved surface when observed under a scanning electron microscopy

(Figs. 2A and 2B). In alcoholic group, the primary signals of alterations in the ultrastructure of duodenal villi were related to its configuration. These seems to be shorter, larger and irregular compared to those from control animals (Fig. 2C). The apex consisted in a common place of cellular degeneration with detachment of parts of the epithelium toward the lumen (Figs. 2D and 2E). Marked fissures were observed in villi walls (Fig. 2D), contributing to their disintegration and misconfiguration, characterizing deep distortions. Villi with signs of fusion also were found in alcoholic animals (Fig. 2C - inset). In some villi, especially in the apex, formation of blebs was evident, protruding to the lumen (Figs. 3A and 3B).

The epithelial lining of the apical surface of the duodenal villi in the alcoholic group, characterized by the presence of necrotic cells and by detachment, resulted in extensive surface losses (Fig. 2E). Wide lateral spaces (Fig. 4B) were observed destabilizing intercellular junctions when compared to control group (Fig. 4A). Transmission electron microscope analysis revealed that, in some areas, the basal lamina occasionally appeared discontinuous (Fig. 4D - inset). In the basal region of the enterocytes and above the basal lamina were evidenced areas of cytoplasmic rarefaction containing endoplasmic reticulum and free ribossomes (Fig. 4D). These areas contributed to formation of blebs in the basal part of enterocytes. These cells showed cytoplasmic vacuolation (Fig. 4C).

Animals from the control group presented normal goblet cells (Fig. 5A). However, in animals from the alcoholic group, these cells showed ultrastructural cytoplasmic and nuclear alterations. The more electron-dense cytoplasm exhibited vacuoles and vesicles of different sizes and heterogeneous content (Fig. 5C). Mucigen granules were

observed to be more electron-lucent and with rupture of its membranes still in the cytoplasm (Fig. 5B), suggesting degeneration. A moderate swelling of rough endoplasmic reticulum (Fig. 5C) as observed when compared to control mice. The nucleus of irregular format contained fissures and marginal condensation of chromatin (Fig. 5D).

DISCUSSION

Ethanol crossed all the biological membranes by simple diffusion (Kalant, 1971). It is completely absorbed in the stomach, duodenum and proximal jejunum, distributing it to all tissues and fluids of the organism (Mezey, 1975). Baraona *et al.* (1974) observed that, in the rat jejunum, ethanol, depending on concentration (5-49%), has deleterious effects on function, structure and survival of enterocytes.

We investigated the effects of ethanol 4.2% (v/v) in the morphology of villi from the proximal duodenum in mice, after prolonged ingestion (8 weeks). Our results showed that the most pronounced damage was initiated at the villous apex before destruction of the same and, in this case, the role of ethanol in ulcerogenesis must be taken into account. It is supposed that a sequence of events happened leading up to the total amputation of the duodenal villi. Initially, the lesions reached the apical cells of villi from the proximal part of the duodenum. Subsequently, the lesions progressed to the sides of the villi with detachment of necrotic cells in groups, retraction of the lamina propria and leveling of mucosa, characterizing erosion and ulceration. Similar sequences of events were described in the literature utilizing propionitrile (Giampaolo *et al.*, 1978) or in coeliac disease (Trier, 1973; Shiner, 1974). The fact of the observed alterations were located in

focal areas, more precisely in villi apex, may have occurred due to the topical effect of ethanol, in other words, to more localized concentration of this substance in these regions.

By stereological analysis we demonstrated that there was a significant reduction in surface density of villi (about 37%) of animals from the alcoholic group compared to their isocaloric controls. This datum quantified the villi destruction observed at the histological analyze. Moreover it was reported that, in rats, prolonged consumption of ethanol results in a decreased number of mature villi cells (Mincis, 1982). Structural damage to intestinal villi, such as loss of enterocytes and mucosal vesiculation were correlated with the increase in permeability of bacterial products (Tamai *et al.*, 2000).

Light microscope analysis of the duodenal bulb of alcoholic patients that ingested 200g/ethanol/day did not show significant differences in the number of goblet cells compared with non-alcoholics (Lev *et al.*, 1980). However, after 15 weeks, rats treated with ethanol 15% (v/v) had significant increase in number of goblet cells in the duodenal mucosa (Vaquera *et al.*, 2002). Our work showed that the alcoholic group presented reduction (of about 50%) in density of goblet cells. When interpreting the results it was inferred that repeated doses of ethanol 4.2% also damaged goblet cells inducing their possible death by apoptosis.

The anatomical base of a complete "mucosal barrier" was described in ionic terms, apical membranes and junctions joining to adjacent cells (Allen *et al.*, 1993). Two processes, proliferation and restitution, are responsible for maintaining the "epithelial cellular barrier" in the gastrointestinal tract (Lipkin, 1981; Silen & Ito, 1985). The proliferation, slower, occurs as a result from mitosis and restitution, faster, depends on the cellular migration through the basal lamina (Lacy, 1987). We observed basal lamina

occasional and focal discontinuities when the duodenal mucosa was exposed to ethanol, suggesting that it also affects this structure. This can interfere in epithelial restitution, inhibiting the process of rapid reepithelialization.

It was observed, in animals of the alcoholic group, ample lateral spaces destabilizing cellular junctions in the inferior two-third of enterocytes, formation of basal areas with cytoplasmic rarefaction containing endoplasmic reticulum and free ribossomes. Probably these areas contributed to production of blebs in the basal region of the cell. According to some authors (Fox *et al.*, 1978a; Fox *et al.*, 1978b; Beck & Dinda, 1981) ethanol is freely permeable through the epithelium, affecting the morphology of enterocytes. This causes capillary stasis, directly affecting the microcirculation or inducing contraction of the villous core, provoking transudation of plasma inside pericapillary and intercellular spaces. Continuous transport of sodium and water, not drained by capillaries, accumulated in intercellular spaces, dilating them. This fact provokes detachment of the epithelium from the basal lamina. As a result, the anchoring of the epithelium is lost, the cells become cuboidal, intercellular spaces disappear and blebs form. If the accumulated fluid is excessive and the epithelium is not sufficiently resistant, the blebs rupture, provoking denuding of the villi. After chronic ingestion of ethanol 15% (v/v), the formation of blebs also was observed in the duodenum of rats (Vaquera *et al.*, 2002). Some morphological alterations are present during the early stages of apoptosis, among them the loss of microvilli and formation of blebs on the surface of cells. These isolated alterations do not constitute conclusive evidence of apoptosis, but associated with posterior events – such as annular condensation of chromatin, loss of nuclear volume, fragmentation of the

cell and formation of apoptotic bodies – offer a more precise diagnosis (Huppertz *et al.*, 1999). Thus the alterations observed suggest that, possibly, an increase in cellular death by apoptosis as an effect of ethanol may have occurred. But to confirm this supposition, new studies must be accomplished.

Control group animals presented normal intact duodenal villi when observed through a scanning electron microscope. However, this form was not constant in the alcoholic groups. These exhibited a mucosa with shortened villi with base larger than the apex, the surface of which presented deep fissures, contributing to its disorganization and disintegration. The configuration of villi, severely altered, suggests that the epithelium is not the only tissue to be affected by ethanol. It was proposed that chronic abuse of ethanol can induce fibrosis of the duodenal villi. In alcoholic patients, fibrosis was associated with transformation of juxta-parenchymal cells into subepithelial myofibroblasts, which can produce different components of extracellular matrix (Casini *et al.*, 1999). Similar alterations to those provoked by ethanol in villi form were observed in the intestine of mice after irradiation and related to alterations of stromal constituents (Carr *et al.*, 1985). Rubin *et al.* (1972), using nutritionally adequate liquid diet, containing 36% of total calories provided by ethanol, after analysis under light microscope, did not observe alterations in length or configuration of the villi in rats and humans. But reduction in villi length and also atrophy were observed in mucosa of alcoholic patients after ingestion of ethanol (above 40g/day) for 3 weeks (Persson *et al.*, 1990). Subsequent studies, addressing stromal constituents will be able to clarify the significance of these findings.

The morphological alterations involved in the integrity of enterocytes and of villi in the proximal part of the duodenal mucosa of C57BL/6 mice, possibly result from direct intoxication caused by chronic ingestion of ethanol. The tissue lesions resulting from ingestion of low concentrations of ethanol for long periods were similar to those observed during acute ingestion of low and high concentrations described in the literature. In the present work it became evident that low concentrations of ethanol, administered chronically, reduce surface density of villi and number of goblet cells. Therefore, it is concluded that alcoholism represents a risk factor to maintenance of duodenal villi, enabling interference in phenomena of production, transport, absorption, secretion and permeability of substances.

REFERENCES

- Allen, A., Flemström M, G., Garner, A., *et al.* (1993) Gastroduodenal mucosal protection. *Physiological Reviews* 73, 823-857.
- Asai, K., Buurman, W. A., Reutelingsperger, C. P., *et al.* (2003) Low concentrations of ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38, 1154-1161.
- Ballard, H. J., Wilkes, J. M. and Hirst, B. H. (1988) Effect of alcohols on gastric and small intestinal apical membrane integrity and fluidity. *Gut* 29, 1648-1655.
- Baraona, E., Pirola, R. C. and Lieber, C. S. (1974) Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat. *Gastroenterology* 66, 226-234.

- Beck, I. T. and Dinda, P. K. (1981) Acute exposure of small intestine to ethanol. Effects on morphology and function. *Digestive Disease Sciences* 26, 817-838.
- Bode, J. C. (1980) Alcohol and the gastrointestinal tract. *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde* 45, 1-75.
- Buell, M. G. and Beck, I. T. (1983) Effect of ethanol on jejunal region blood flow in the rabbit. *Gastroenterology* 84, 81-89, 1983.
- Carr, K. E., Hamlet, R., Nias, G. *et al.* (1985) Stromal damage in the mouse small intestine after Co⁶⁰ gamma or D-T neutron irradiation. *Scanning Electron Microscopy* 4, 1615-1621.
- Casini, A; Galli, A., Calabro, A. *et al.* (1999) Ethanol-induced alterations of matrix network in the duodenal mucosa of chronic alcohol abusers. *Virchows Archives* 434, 127-135.
- De La Veja, M. J., Santolaria, F., González-Riemers, M. *et al.* (2001) High prevalence of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: the importance of the termolabile form the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Alcohol* 25, 59-67.
- Dinda, P. K.; Beck, I. T., Beck, M. *et al.* (1975) Effect of ethanol on sodium-dependent glucose transport in the small intestine of the hamster. *Gastroenterology* 68, 1517-1526.
- Fox, J. E., McElligott, T. F. and Beck, I. T. (1978a) Effect do ethanol on the morphology of hamster jejunum. *American Journal Digestive Diseases* 23, 201-209.
- Fox, J. E., McElligott, T. F. and Beck, I. T. (1978b) The correlation of ethanol-induced depression of glucose and water transport with morphological changes in the hamster jejunum in vivo. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 123-131.

- Giampaolo, C., Poulsen, S. S., Szabo, S. *et al.* (1978) Stereomicroscopic and ultrastructural characterization of propionitrile-induced duodenal ulcer in the rat. *Laboratory Investigation* 38, 1-7.
- Huppertz, B. Frank, H-G. and Kaufmann, P. (1999) The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embriology* 200, 1-18.
- Kalant, H. (1971). Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effects on biological membranes. *The Biology of Alcoholism*. v. 1, Biochemistry, Brissin, H Begleiter (eds). p 1-62. Plenum Press, New York.
- Kamino, K. and Inoue, A. (1969) Light-scattering studies on brain microsomes. I. Evidence for osmotic behavior. *Biochimistry and Biophysics Acta* 183, 36-47.
- Lacy, E. R. (1987) Gastric mucosal defense after superficial injury. *Clinical Investigation Medicine* 10, 189-200.
- Lev, R., Thomas, E., Parl, F. F. *et al.* (1980) Pathological and histomorphometric study of the effects of alcohol on the human duodenum. *Digestion* 20, 207-213.
- Lieber, C. S. (2004) Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34, 9-19.
- Lipkin, M. (1981) Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells in normal and disease states. *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (1st ed.). edited by L. R. Johnson, J. Christensen, M. I. Grossman, E. D. Jacobson and S. G. Schultz. p.31-48, Raven, New York
- Maillot, F., Farad, S. and Lamisse, F. (2001). Álcool et nutrition. *Pathology & Biology* 49,

v. 683-688.

Mandarim-de-Lacerda, C. A. (1995) Métodos quantitativos em morfologia. EDUERJ, p 72-109, Rio de Janeiro.

Markowitz, J. S., McRae, A.L. and Sonne, S. C. (2000) Oral nutritional supplementation for the alcoholic patient: a brief overview. *Annals of Clinical Psychiatry* 12, 153-158.

Mezey, E. (1975) Intestinal function in chronic alcoholism. *Annals New York Academy of Sciences* 252, 215-227.

Millan, M. S., Morris, G. P. and Beck, I. T. (1980) Villous damage induced by suction biopsy and by acute ethanol intake in normal human small intestine. *Digestive Disease Sciences* 25, 513-525.

Mincis, M., Pereira, A. A. and Ferrari, M. de L. (1982). Efeitos do álcool no tracto digestivo. *Revista Hospital Clinicas Faculdade Medicina São Paulo* 37, 30-42.

Mincis, M. (2002) Etanol e o trato gastrointestinal. *Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento*, 3^a. ed., editorial Lemos, 1033p, São Paulo.

Persson, J., Berg, N. O., Sjölund, K. *et al.* (1990) Morphologic changes in the small intestine after chronic alcohol consumption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 25, 173-184.

Pronko, P., Bardina, L., Satanovskaya, V. *et al.* (2002) Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol-and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract. *Alcohol & Alcohol* 37, 229-235.

Rubin, E., Rybak, B. J., Linderbaum, J. *et al.* (1972) Ultrastructural changes in the small intestine induced by ethanol. *Gastroenterology* 63, 801-814.

- Santolaria, F., Pérez-Manzano, J. L., Milena, A. *et al.* (2000) Nutritional assessment in alcoholic patients. Its relationship with alcoholic intake, feeding habits, organic complications and social problems. *Drug and Alcohol Dependence* 59, 295-304.
- Seitz, H. K., Velasquez, D., Waldherr, R. *et al.* (1985) Duodenal gamma-glutamyltransferase activity in human biopsies: effect of chronic ethanol consumption and duodenal morphology. *European Journal of Clinical Investigation* 15, 192-196.
- Shiner, M. (1974) Cell distribution in the jejunal mucosa in coeliac disease. *Coeliac Disease*, Heppens W ThJM, Pena AS, p 121. Leiden, Stenfleeet Kroese.
- Silen, W & Ito, S.(1985) Mechanisms for rapid reepithelialization of the gastric mucosal surface. *Annual Review of Physiology* 47, 217-229.
- Tamai, H., Kato, S., Horie, Y., Ohki, E. *et al.* (2000) Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clinical Experimental Research* 24, 390-394.
- Trier, J. S. (1973) Celiac sprue disease. *Gastrointestinal Disease*. Sleisenger MH, Fordtran JS, Saunders, Philadelphia.
- Vaquera, J., Vaquera, A. and Girbes, T. (2002) Effects of chronic administration of either ethanol or pentanol on rat duodenum morphology. *Histology and Histopathology* 17, 199-203.
- Worthington, B. S., Meserole, L. and Syrotuck, J. A. (1978) Effect of daily ethanol ingestion on intestinal permeability to macromolecules. *American Journal Digestive Diseases*, 23, 23-32.
- Zar, J. H. (1999) *Biostatistical analysis*, 4th ed. Upper Saddle River, 178-228, Prentice-Hall.

LEGENDS

Figure 1. Photomicrograph of villi in the proximal duodenum of mice after 8 weeks of treatment.

- A. Normal appearance of duodenum wall of the control group. Finger-like villi are seen. These contain normal numbers of goblet cells (magent). PAS. Bar = 50µm
- B. Upper two-third of villous of the control group. Goblet cells (arrows) with appear as oval empty spaces in the epithelial layer. The lamina propria contain the usual number of cells. PAS. Bar = 50µm
- C. Avillous area (arrows) on the duodenum wall of the alcoholic group. Intestinal glands (GI). HE. Bar = 100µm
- D. Detail of villous apex of the alcoholic group. The epithelial layer is starting to become detached from the basal membrane in several places (arrows). PAS. Bar = 100µm
- E. Bleb formation (B) under the enterocytes at the apex of villi and retraction of lamina propria in alcoholic group. The cellularity of the lamina propria (LP) was increased in the core of the villi. Masson Trichromic. Bar = 50 µm
- F. Loss of enterocytes from the apical extremity of villi (arrow) in alcoholic group. Cytoplasmic rarefaction area (asterisk). Lamina propria (LP), intestinal glands (GI). PAS. Bar = 50µm

Figure 2. Scanning electronmicrographs of duodenal villi of mice after 8 weeks of treatment.

- A. Normal appearance of duodenal villi of the control group. The erect, finger-like villi are seen. Bar = 500 μ m. Inset: apical extremity of villi with intact enterocytes. Bar = 50 μ m
- B. The enterocytes surface of the control group showed normal ultrastructure. Intercellular junctions (arrows) well-preserved. Bar = 20 μ m
- C. Alcoholic group villi showed to be shorter, larger and irregular. Villous with signs of fusion (asterisk). Bar = 500 μ m. Inset: Detail misconfiguration of the villous. Bar = 200 μ m.
- D. Desquamation of the necrotic cells (asterisk) resulting in detachment of parts of the epithelium toward the lumen. Deep fissures (arrows) were observed in villous lateral wall of the alcoholic group. Bar = 50 μ m.
- E. Extensive cellular loss and disintegration of the villous upper part observed in alcoholic group. Bar = 150 μ m.

Figure 3. Electronmicrographs of duodenal covering epithelium of the villi after 8 weeks of treatment in alcoholic group.

- A. Formation of the apical blebs (arrows) in the luminal surface of the enterocytes. Bar = 50 μ m Inset: Detail of the apical bleb (asterisk). Bar = 30 μ m
- B. Bleb (B) in the apical membrane of the enterocyte. Bar = 2 μ m. Inset: Detail of the bleb containing endoplasmic reticulum (arrows) and free ribossomes (R). Lumen (L). Bar = 0,3 μ m

Figure 4. Transmission electronmicrographs of duodenal covering epithelium of the villi after 8 weeks of treatment.

- A. Normal enterocytes (E) and goblet cells (GC) of the control group. Also note presence of intercellular junctions (arrows) between well-preserved enterocytes. Nucleus (N), lumen (L). Bar = 5 μ m
- B. The intercellular spaces (arrows) are widely dilated in the inferior two-third of the villi of the alcoholic group. Bar = 5 μ m
- C. Epithelium covering blebs (B) observed in alcoholic group. The enterocytes shows cytoplasmic vacuolation (arrows). Lumen (L). Bar = 5 μ m
- D. Infranuclear region of enterocytes of the alcoholic group. Basal areas of cytoplasmic rarefaction (asterisk) containing endoplasmic reticulum and free ribossomes. Basal lamina (arrows), nucleus (N), blood capillary (C) . Bar = 1 μ m Inset: detail of basal lamina presented occasional discontinuities (arrows). Bar = 0,3 μ m

Figure 5. Transmission electronmicrographs of duodenal villi of the mice after 8 weeks of treatment.

- A. Normal goblet cell observed in control group. Mucigen granules (MG). Bar = 1 μ m
- B. Mucigen granules (MG) electron-lucent with rupture of its membranes still in the cytoplasm observed in alcoholic group. Bar = 1 μ m
- C. Moderate swelling of rough endoplasmic reticulum (arrows) in goblet cell of the alcoholic group. Vacuoles and vesicles of different sizes and heterogeneous content (asterisk). Bar = 2 μ m
- D. Nucleus of irregular format contained fissures (arrow) and marginal condensation of chromatin observed in goblet cell of the alcoholic group. Bar = 2 μ m

TABLE

Table 1. Median $\pm$ confidence interval of 95% of surface density of villi and numerical density of goblet cells.

Experimental groups	Stereological parameters	
	$S_{v[\text{villi}]}$ (mm^2/mm^3)	$N_{A[\text{goblet}]}$ ($1/\text{mm}^2$)
Control	$27.5 \pm 0.8_a$	$1111 \pm 89_a$
Alcoholic	$17.5 \pm 2.0_b$	$556 \pm 27_b$

Different letters indicate statistically significant differences. $p < 0.001$

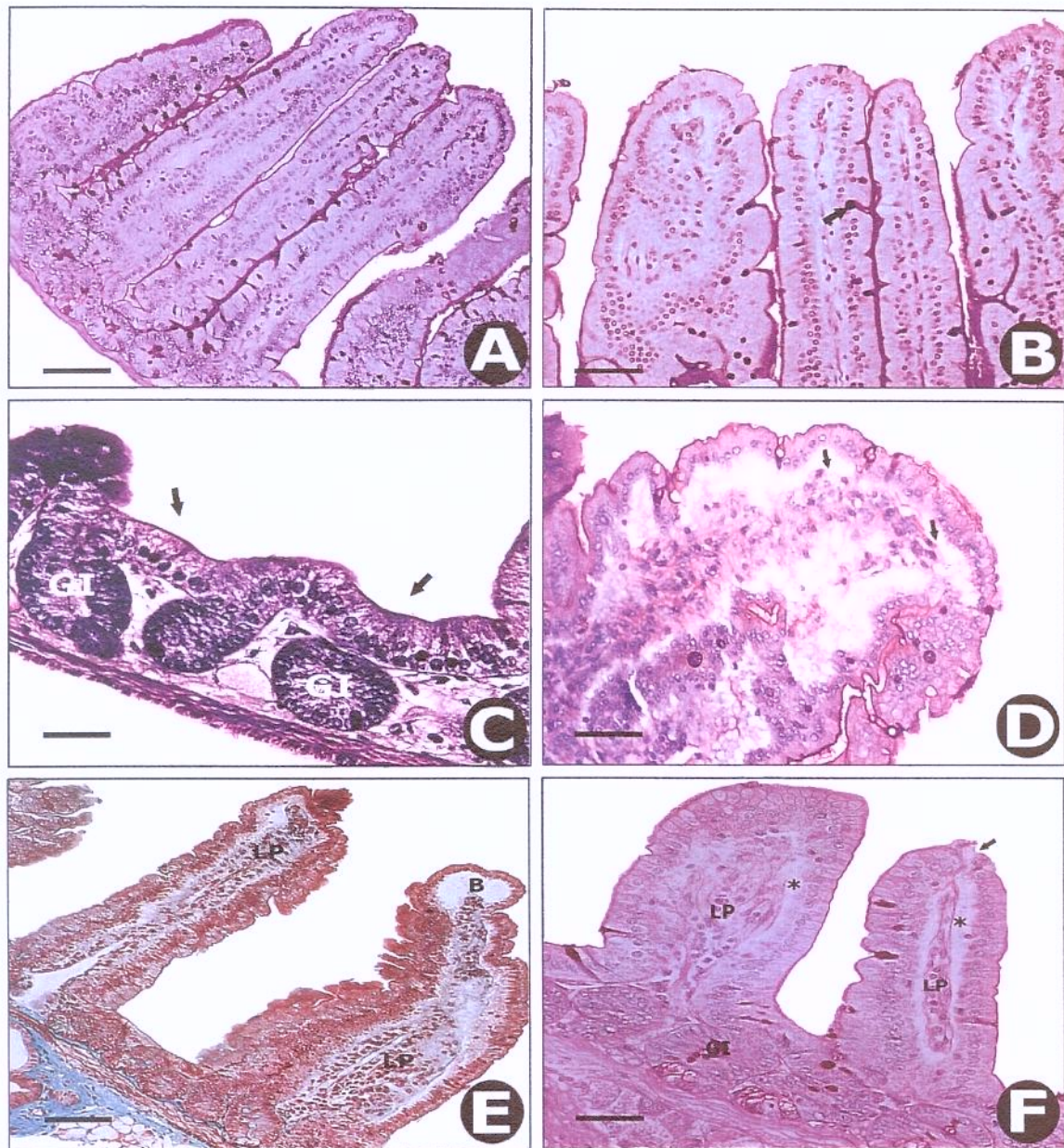


Figure 1

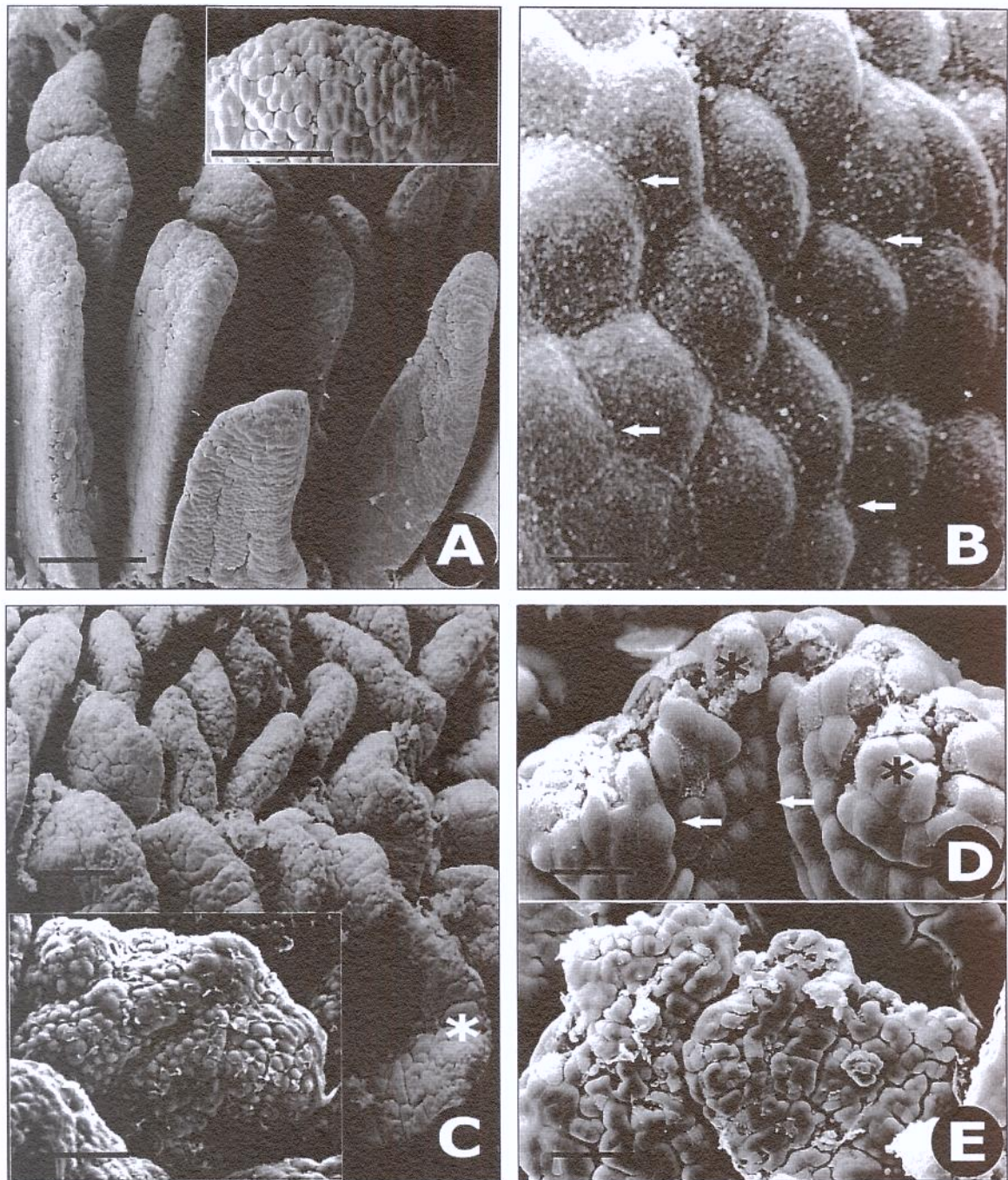


Figure 2

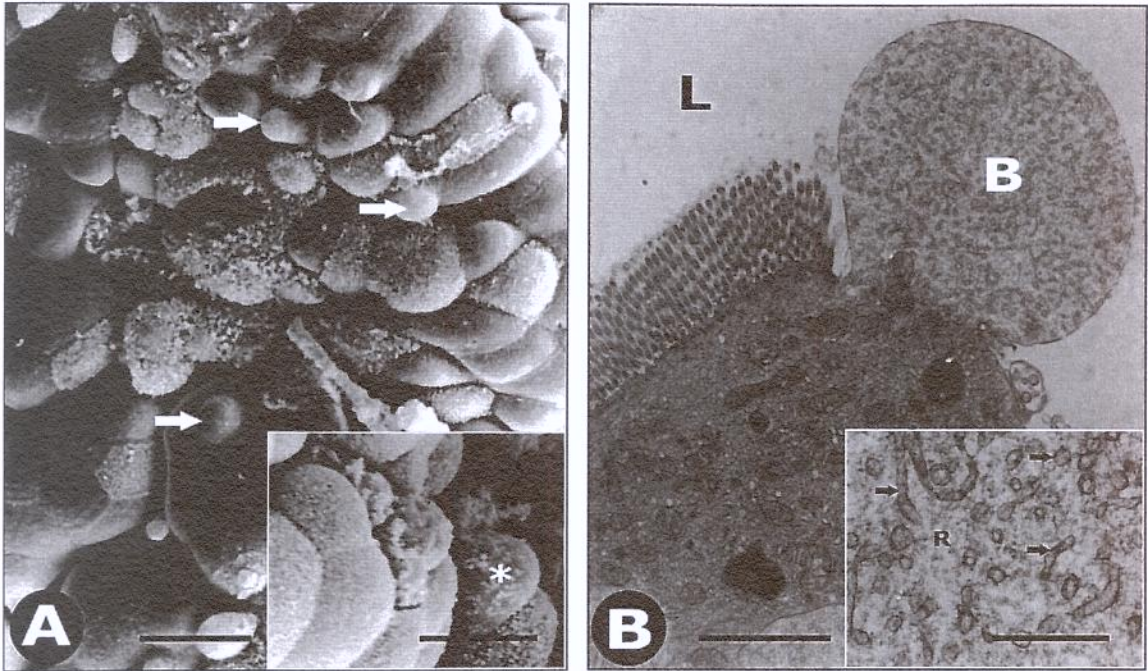


Figure 3

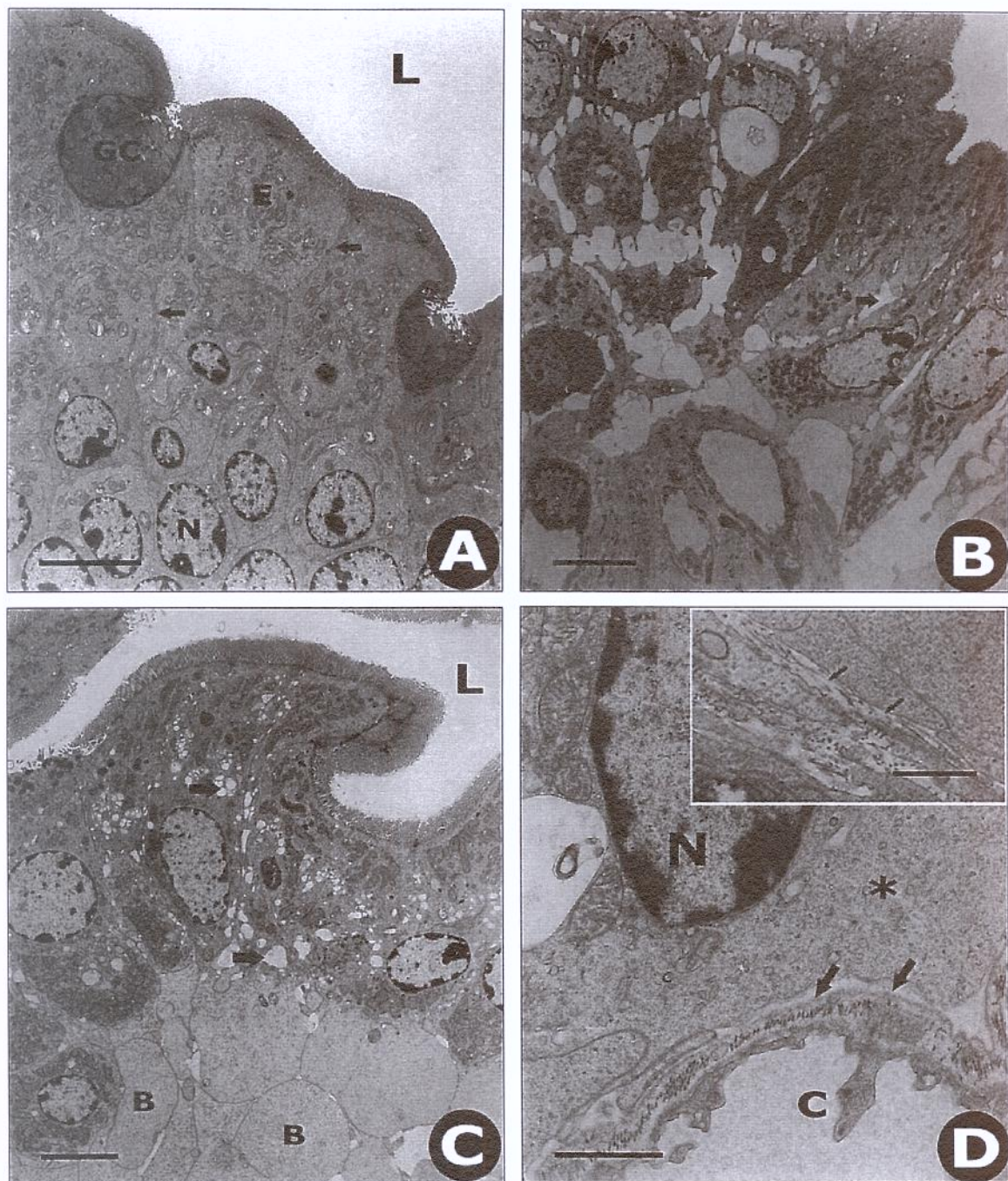


Figure 4

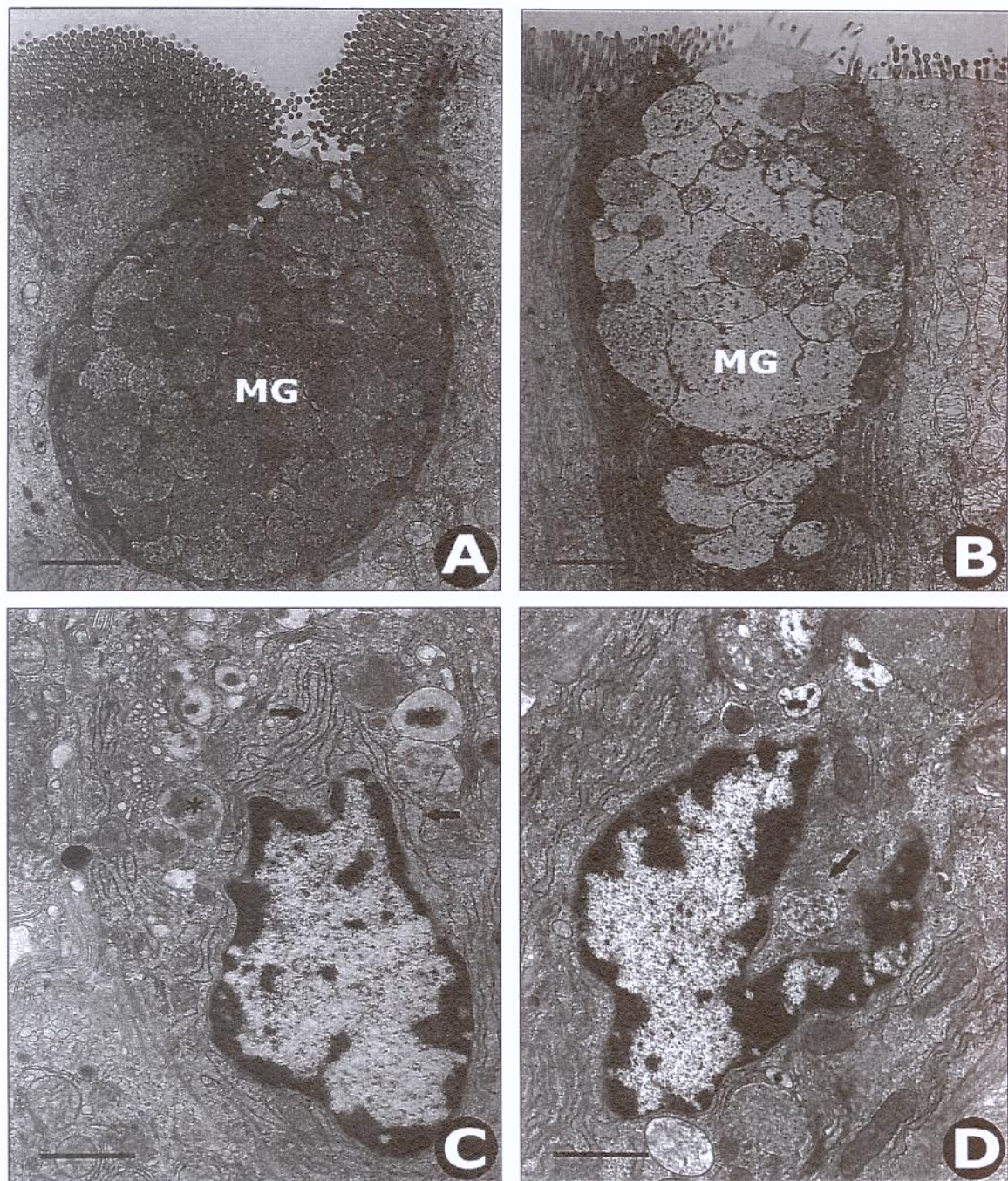


Figure 5

MORTE DE ENTERÓCITOS EM VILOS DUODENAIIS PROXIMAIS DE CAMUNDONGOS ALCOÓLICOS

BONFIGLIO, N. S. e MELLO JR, W.

RESUMO

Distúrbios no equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular podem alterar a integridade do intestino delgado, levando à perda de função. Entre as condições causadoras de perturbações estão lesões tóxicas, incluindo as decorrentes do abuso do etanol. Este foi indicado como um mensageiro potencial para a sinalização de vias envolvendo a morte celular programada. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar, pelo método do TUNEL e pela microscopia eletrônica, possíveis mecanismos de morte celular de enterócitos em vilos duodenais de camundongos alcoólicos, após 8 semanas de tratamento. A análise ultra-estrutural revelou enterócitos com sinais de degeneração, resultante de apoptose, necrose e, possivelmente da autofagia. A análise qualitativa é sugestiva de que a morte celular, em animais alcoólicos, foi aumentada quando comparada com seus controles. Os dados indicaram que a ação destrutiva do etanol é preocupante mesmo para consumidores leves.

Palavras-Chave: etanol, camundongo, ultra-estrutura, enterócitos, duodeno.

OBS: O projeto foi aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética na Experimentação com Animais (CEEAA), sob protocolo nº 001/02 em reunião do dia 06/06/02.

INTRODUÇÃO

O epitélio do intestino delgado é continuamente renovado através da proliferação e da perda celular (Watson & Pritchard, 2000; Wilson & Potten, 2004). A preservação da integridade da mucosa do intestino e a homeostasia dependem do equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (Steller, 1995; Jones & Gores, 1997).

A morte celular, no intestino delgado, ocorre por dois mecanismos distintos: apoptose e necrose (Sun *et al.*, 1998). Observações realizadas no intestino de animais adultos indicam que a apoptose é uma via comum de eliminação de células epiteliais velhas encontradas nos vilos (Iwanaga, 1995; Shibahara *et al.*, 1995). A apoptose tem sido usada como sinônimo de “morte celular programada”, isto é, um mecanismo intrínseco de suicídio, regulado por uma variedade de vias sinalizantes (Danial & Korsmeyer, 2004). As alterações seqüenciais que ocorrem durante a morte celular apoptótica e que são reconhecidas morfológicamente são as seguintes: intensa condensação nuclear, quebra do DNA em fragmentos internucleossomais, condensação do citoplasma, convolução das membranas citoplasmática e nuclear, rompimento do núcleo em fragmentos envoltos por membrana nuclear e aparecimento de bolhas na superfície celular que se desprendem formando os corpos apoptóticos envoltos por membranas. Esses são reconhecidos e removidos por células fagocíticas configurando ausência de inflamação no tecido (Kerr *et al.*, 1972; Edinger & Thompson, 2004). Os aspectos morfológicos da apoptose resultam da ativação das caspases por ligação de receptores de morte ou liberação de mediadores apoptóticos da mitocôndria (Edinger & Thompson, 2004).

Em contraste, enquanto a apoptose representa a morte celular individual, sob estímulos fisiológicos e patológicos, a necrose envolve a morte de grupos de células sempre resultante de agressões ao tecido (Levin, 1995; Vasconcelos, 2005).

A necrose é o resultado final da catástrofe bioenergética resultante da depleção de ATP em níveis incompatíveis com a sobrevivência da célula e é iniciada, principalmente, por “acidente” celular, como agressões tóxicas ou danos físicos. Caracteriza-se, morfológicamente, pelo rompimento da membrana plasmática com liberação do conteúdo celular para o espaço extracelular (Vasconcelos, 2005), vacuolização citoplasmática e indução de inflamação ao redor da célula morta (Edinger & Thompson, 2004). Células que morrem por necrose, freqüentemente, exibem alterações na morfologia nuclear, tais como condensação cromatínica com formação de massas irregulares pouco definidas e picnose (Levin, 1995; Vasconcelos, 2005).

A morte celular autofágica foi classificada como distinta da morte celular necrótica. Existem evidências de que a autofagia pode ser usada como um programa de suicídio e não somente como resposta adaptativa à privação de nutrientes (Baehrecke, 2003; Gozwacik & Kimchi, 2004; Yuan *et al.*, 2003). É importante considerar que a necrose ocorre em células que sofrem estresse bioenergético severo, as mesmas condições que podem estimular a autofagia. É provável que a autofagia e a necrose ocorram em paralelo, iniciadas em resposta aos mesmos estímulos, porém com objetivos completamente opostos (Edinger & Thompson, 2004).

A morte celular autofágica (tipo II ou lisossomal) inclui a degradação do aparelho de Golgi, de polirribossomos, do retículo endoplasmático e das mitocôndrias, os quais precedem a destruição nuclear (Bursch *et al.*, 2000; Eskelinen, 2005). A captura

autofágica de organelas e partículas, a expansão do compartimento lisossomal, a presença de vacúolos autofágicos, a fragmentação do DNA, o colapso tardio do núcleo e a ausência de inflamação são características morfológicas de morte celular descrita como autofágica (Locke & McMahon, 1971; Lockshin & Zakeri, 2004). Neste tipo de morte celular, os microfilamentos e filamentos intermediários são amplamente preservados (Brusch *et al.*, 2000; Levine & Yuan, 2005) presumidamente, porque o citoesqueleto é exigido para a autofagocitose (Bursch *et al.*, 2000).

Distúrbios no equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular podem alterar a integridade do intestino delgado, levando à perda de função. Entre as condições patológicas, causadoras de perturbações estão as desordens metabólicas, as infecções virais, as neoplasias, as inflamações e as lesões tóxicas, incluindo as decorrentes do abuso do etanol (Oue & Gorres, 1996).

O etanol foi indicado como um mensageiro potencial para a sinalização de vias envolvendo a morte celular programada (Neuman *et al.*, 1998, 1999). Inferiu-se que o consumo de etanol induz à apoptose numa variedade de tecidos, incluindo o hepático, intestinal, da mucosa bucal, da glândula salivar, da mucosa gástrica, do cérebro, do timo e do baço (Slomiany *et al.*, 1997, 2000; Young *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003). Repetidas exposições à níveis altos de etanol foram capazes de promover a apoptose em hepatócitos (Felver *et al.*, 1990; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1993; Garcia-Ruiz *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 1998). Entretanto, a indução da apoptose pelo etanol pode ser atenuada pela ação antioxidativa da polienilfosfatidilcolina (PPC) (Mi *et al.*, 2000) e pela inibição da caspase-3 (Katz *et al.*, 2001).

Estudos mostraram que, em linhagens de células intestinais humanas (Caco-2), a morte celular apoptótica foi induzida pela exposição aguda de baixas concentrações (5 e 10%) de etanol (Asai *et al.*, 2003, 2005). Esses dados sugerem que, doses clinicamente aceitáveis de etanol podem interferir na sobrevivência e função da barreira intestinal, através da indução da morte celular.

Considerando que o tracto intestinal é o “iniciador” da síndrome da disfunção múltipla de órgãos e sepse, sua patogenicidade potencial tem merecido maior atenção (Chang *et al.*, 2005).

O recente foco dos estudos científicos concentra-se na preservação, manutenção e função da barreira intestinal, com uma enormidade de mecanismos biológicos não totalmente conhecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar, pelo método do TUNEL e pela microscopia eletrônica, possíveis mecanismos de morte celular em enterócitos de vilos duodenais de camundongos alcoólicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais

Vinte e quatro (24) camundongos, C57BL/6, machos foram usados neste estudo. Os animais foram divididos em 2 grupos: controle (n=12) e alcoólico (n=12), individualmente mantidos em caixas de contenção em ambiente controlado. Diariamente, cada animal do grupo alcoólico recebeu dieta líquida (Sustacal – MeadJohnson), acrescida de etanol 4,2% (30% do total de calorias ingeridas). O grupo controle recebeu o mesmo

volume de dieta líquida, porém o etanol foi substituído por dextrose (Dextrosol), no equivalente calórico do etanol administrado ao grupo alcoólico. Ambos os grupos receberam água à vontade. Após 8 semanas de tratamento, os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados por decaptação. Realizou-se uma incisão na cavidade abdominal para coletar o material destinado à microscopia. Os protocolos experimentais usados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Regional de Blumenau – SC – Brasil, seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Processamento do Tecido para Análise Imunocitoquímica

Localização *in situ* de novas extremidades 3'-OH do DNA: TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)

A técnica do TUNEL, para determinação de fragmentação de DNA, foi realizada

de acordo com Souza *et al.* (2003), utilizando o protocolo do kit de detecção (Frag-EL™, Oncogene, código: QIA33). Os fragmentos da parte proximal do duodeno foram fixados em solução de Bouin, desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast plus®. Cortes de 4µm de espessura foram obtidos de cada animal e colocados em lâminas silanizadas. Em seguida, foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao protocolo do kit para detecção de morte celular, utilizando-se o Terminal deoxynucleotidyl transferase

(TdT) como enzima. O alvo desta marcação foram os novos finais 3' –OH de DNA gerados pela fragmentação do DNA durante o processo de morte celular.

Processamento do Tecido para Análise Ultra-estrutural

Microscopia eletrônica

Fragmentos da parte proximal do duodeno de 4 animais de cada grupo foram fixados em glutaraldeído 2,5%, diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por 24 horas. Após, foram rotineiramente processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme protocolo do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu – SP. As secções selecionadas foram examinadas e documentadas com microscópio eletrônico Philips (CM-100 e FEMC 515).

RESULTADOS

A análise da parte proximal do duodeno de camundongos alcoólicos permitiu a identificação e a caracterização ultra-estrutural de diferentes mecanismos de morte celular de enterócitos.

Em animais controle, imagens ultra-estruturais revelaram a perda individual de enterócitos (Figs. 1A, 1B e 1C). Entretanto, em animais alcoólicos, a morte celular acometeu as células individualmente ou em grupos. Em determinadas regiões do epitélio, as

características morfológicas sugeriram diferentes mecanismos de morte celular entre células de um mesmo grupo (Figs. 5B e 5D).

A morte celular foi detectada pela técnica do TUNEL que marcou positivamente o DNA fragmentado dos núcleos das células engajadas no processo de morte (Fig. 2A). A análise descritiva revelou maior frequência de células marcadas positivamente para o TUNEL nos vilos duodenais de animais alcoólicos quando comparados com controles.

A ultra-estrutura do epitélio duodenal revelou células em apoptose (Fig. 2B), contendo mitocôndrias preservadas em citoplasma reduzido e núcleos com cromatina altamente condensada e marginada, além da presença de fragmentos nucleares (Fig. 2C) e brotamentos celulares em forma de bolha que, possivelmente, irão originar corpos apoptóticos (Fig 2D).

Em animais alcoólicos, a desintegração dos elementos do citoesqueleto, especialmente microvilos e trama terminal (Fig. 3C), foi detectada principalmente nas células em processo de morte por apoptose e necrose. No entanto, nas células em autofagia estes elementos se mostraram discretamente preservados (Figs. 4A e 5D) e, em animais controle, totalmente íntegros (Fig. 3A e 3B).

Grupos de enterócitos foram detectados exibindo mitocôndrias não preservadas e muitos vacúolos eletron-densos de conteúdo e forma heterogêneos, interpretados como lisossomos (Figs. 4A e 4B), sugerindo autofagia. Ampla dilatação das cisternas do retículo endoplasmático e rompimento de cristas mitocondriais com rarefação de matriz (Fig. 4C) foram também visualizados. A vacuolização citoplasmática abundante (Fig. 4D) e a discreta preservação dos microvilos nestas células, evidenciaram ainda mais a existência de

características ultra-estruturais, normalmente utilizadas, para classificar a morte celular como autofágica (ou para reconhecer a autofagia como um mecanismo que pode levar a morte celular).

A necrose foi evidenciada em ambas, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, afetando grupos de enterócitos (Figs 5A, 5B, 5C e 5D). Nestes, os limites do rompimento da membrana plasmática apical (Fig. 5A e 5D) foram claramente visualizados. Pela microscopia eletrônica de transmissão observou-se grupos de células necróticas ao lado de células com citoplasma eletrôn-denso (Fig 5B). As células necróticas exibiram rarefação citoplasmática, desintegração de organelas e núcleo picnótico com massas cromáticas bastante condensadas (Fig. 5C). Além disso, extravasamento do material celular também pode ser observado na parte apical da célula, provavelmente resultante do rompimento da membrana plasmática (Fig. 5D). Células em autofagia, detectadas lateralmente às células necróticas, apresentaram maior densidade citoplasmática, mitocôndrias alteradas e presença de vacúolos (Fig. 5D).

DISCUSSÃO

Normalmente, a produção de células nas criptas intestinais é equilibrada pela igual perda celular nos vilos. No intestino delgado de camundongo, a perda celular é amplamente realizada pela extrusão de células individuais, por um processo de vacuolização intercelular, resultante do destacamento da célula inteira. Este processo é similar ao que envolve a extrusão de células caliciformes, células apoptóticas e a migração de células basais epidermais individuais (Potten & Allen, 1977).

No corrente estudo, a morte celular presente nos vilos, foi confirmada pela técnica do TUNEL, que marcou positivamente os finais 3' -OH do DNA, gerados pela fragmentação da molécula, durante o processo de morte. Entretanto, esta técnica imunocitoquímica não é específica para identificar o tipo de morte celular ocorrida. Aceita pelo Comitê da Sociedade de Patologistas, ela é apropriada apenas para localizar e marcar a fragmentação de filamentos de DNA, confirmando a presença da morte celular no tecido (Levin *et al.*, 1999).

Enterócitos com sinais morfológicos de degeneração foram observados com extrema frequência no duodeno de animais alcoólicos. A análise descritiva é sugestiva de que a morte celular, em animais alcoólicos, é aumentada quando comparada com animais controles. Entretanto, para confirmação destes dados faz-se necessário realizar a quantificação em estudos futuros.

A identificação e a caracterização de diferentes mecanismos de morte celular foram realizadas através da análise ultra-estrutural, que revelou a existência de apoptose, autofagia e necrose.

De acordo com Lockshin & Zakeri (2004) a morte celular é subdividida nas categorias: apoptose (Tipo I), morte celular autofágica (Tipo II) e necrose (Tipo III). No presente estudo, as características ultra-estruturais de morte celular apoptótica são confirmadas pela presença de núcleos apoptóticos com marginação de cromatina condensada, mitocôndrias preservadas, citoplasma reduzido e formação de corpos apoptóticos, marcando uma etapa avançada da apoptose. Tais características foram bem descritas por Kerr *et al.*, 1972; Majno & Joris, 1995; Guimarães & Linden, 2004 e Lockshin & Zakeri, 2004. Algumas evidências de início de apoptose, geralmente, antes da

ativação irreversível das caspases executoras, foram descritas por Huppertz *et al.*, (1999); estas incluem a perda de microvilos e a formação de bolhas na superfície de células em alguns tecidos (por exemplo, vilos de trofoblastos, mioblastos esqueléticos e osteoclastos). Entretanto, estas alterações morfológicas, vistas isoladamente, não podem oferecer diagnóstico conclusivo de apoptose. Para isso, torna-se necessária a associação de imagens ultra-estruturais clássicas da etapa avançada de apoptose, conforme já descrito anteriormente.

No duodeno de camundongos alcoólicos observou-se, em inúmeros enterócitos, a freqüente desintegração de microvilos e a formação de bolhas, interpretadas como corpos apoptóticos. Além disso, evidências morfológicas clássicas da etapa avançada de apoptose também foram visualizadas. De acordo com a literatura, a apoptose irreversível e clássica é confirmada, morfológicamente, por correlações estruturais mais óbvias que indicam a progressão da cascata de caspases, com a ativação e execução destas proteases, que incluem condensação da cromatina e alterações na forma nuclear. A condensação da cromatina, usualmente começa com o aumento da densidade nuclear, seguido pela formação de pontos de densidade máxima, adjacente ao envelope nuclear. Ao final, a grande característica ultra-estrutural é visualizada como uma condensação anular de cromatina. Esse evento é acompanhado pela perda paralela do volume nuclear, fragmentação da célula e de seu núcleo, resultando em pequenos corpos apoptóticos (Huppertz *et al.*, 1999). Alterações semelhantes, observadas no atual estudo, foram suficientes para que pudéssemos confirmar a morte celular apoptótica dos enterócitos. Esta se apresentou de forma pontual, ou seja, acometendo células individuais.

Freqüentemente, observou-se enterócitos, cuja ultra-estrutura sugeriu que a morte celular poderá advir através da autofagia. Essas células caracterizaram-se pelo aumento da densidade citoplasmática, abundância de vacúolos autofágicos, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, rompimento de cristas e rarefação mitocondrial. Características semelhantes de autofagia foram descritas por Guimarães & Linden, 2004; Shao *et al.*, 2004; Eskelinen, 2005; Levine & Yuan, 2005; Gonzalez-Polo, 2005 e Codogno & Meijer, 2005.

O grande impasse para a teoria da morte celular autofágica é a compreensão de que muitas células manifestam substancial autofagia e não morte (Lockshin & Zakeri, 2004). A autofagia é um processo fisiológico bem conhecido, envolvido na rotina de renovação de constituintes celulares e documentada em espécies mais simples como a *Dictyostelium* (Olie *et al.*, 1998; Levraud *et al.*, 2004). Suas funções na fisiologia normal (Mizushima *et al.*, 2004) constitui o maior mecanismo de regulação da renovação de proteínas e organelas (Yoshimori, 2004).

Porém, em que ponto a autofagia torna-se morte celular autofágica?

A autofagia é um mecanismo protetor tentando reduzir a demanda metabólica da célula, retardando sua morte. Uma célula sob estresse pode determinar que a manutenção fisiológica não é possível e ativar a maquinaria apoptótica. Se o estresse é iniciado por ligantes extracelulares como *Fas* ou TNF, ela pode usar a via extrínseca (caspase 8); quando o estresse deriva de alterações metabólicas, ela pode usar a via intrínseca (mitocondrial, caspase 9). Porém, se inicialmente o estresse não é tão severo, a célula pode tentar ativar as vias de salvamento autofágica ou proteossomal e recuperar-se. Caso contrário, a autofagia continua e a célula morre pela ativação da via metabólica para

apoptose ou, simplesmente, destruindo todo o seu conteúdo e desaparecendo via morte celular autofágica (Lockshin & Zakeri, 2004). Segundo Eskelinen (2005) a apoptose e a autofagia podem ter papéis complementares na morte celular; se a apoptose falha, as células tem a opção de morrerem via autofagia.

Portanto, se considerarmos que a autofagia é um processo fisiológico ativo, em ambas, homeostasia (renovação de organelas) e atrofia, a morte celular autofágica pode ser interpretada como um processo de autofagia que, dependendo das situações, não necessariamente irá terminar antes que a célula colapse (Lockshin & Zakeri, 2004).

Em células de mamíferos, a autofagia pode ser estimulada pela privação de nutrientes, porém ela também pode ser observada com frequência, em desordens neurodegenerativas (doenças de Alzheimer e Parkinson). Esses fatos podem remeter à idéia de que a autofagia não é somente uma resposta adaptativa à limitação de nutrientes, mas também um mecanismo de suicídio da célula (Baehrecke, 2003; Gozuack & Kimchi, 2004; Yuan *et al.*, 2003).

Os argumentos mais racionais sugerem que o papel da autofagia depende do estado ou história da célula. Ela é inicialmente protetora, mas finalmente resulta na acumulação de materiais não digeríveis (Cuervo, 2003, 2004) ou na destruição dos componentes vitais da célula (Lockshin & Zakeri, 2004). Segundo Levine & Yuan (2005) a maquinaria autofágica pode ser usada para a destruição de células quando elas não morrem por apoptose e também quando não podem ser destruídas por células de engolfamento.

O mecanismo de morte celular mais amplamente observado nos enterócitos dos animais alcoólicos foi a necrose, acometendo grupos de células e levando a perda de extensas áreas de epitélio dos vilos.

Segundo Majno & Joris (1995) a necrose é sinalizada pela presença de alterações morfológicas irreversíveis no núcleo (cariólise, picnose e cariorrexe) e no citoplasma (condensação e intensa eosinofilia, perda de estruturas e fragmentação). No presente estudo, as características morfológicas de necrose foram as mesmas observadas por Giampaolo *et al.* (1978) em outras situações e também semelhantes às descritas por Majno & Joris (1995), Levin *et al.* (1999) e Lockshin & Zakeri (2004).

O mesmo agente etiológico pode provocar tanto apoptose quanto necrose sendo que a severidade da agressão parece ser o fator determinante do tipo de morte celular (Vasconcelos, 2005).

Evidências recentes indicam que o etanol é um agente indutor de apoptose em enterócitos (Asai *et al.*, 2003, 2005). Porém, o presente estudo permitiu apontar mecanismos distintos, envolvidos no processo de degeneração celular no epitélio dos vilos duodenais de camundongos alcoólicos. A análise qualitativa sugere que a ingestão de etanol, de alguma forma, induz a morte celular dos enterócitos. É conhecido que, múltiplos são os caminhos alternativos que levam a morte celular (Guimarães & Linden, 2004). Baseados nessas informações, não podemos antever se a autofagia evolui diretamente para a morte celular, ou se ela constitui uma via de ativação da apoptose.

Outra questão importante diz respeito ao equilíbrio entre a taxa de renovação (proliferação e restituição) e a perda celular. Em estudo anterior, sob as mesmas condições experimentais, observamos que há um decréscimo significativo na densidade de superfície de vilos duodenais em camundongos alcoólicos.

A apoptose é um processo rápido, que se completa em aproximadamente 3 horas e não é sincronizado por todo o órgão. Portanto, diferentes fases da apoptose

coexistem em diversas secções do tecido. Devido à taxa rápida de destruição celular é necessário que apenas 2 a 3% das células estejam em apoptose, em um determinado momento, para que se obtenha uma regressão substancial do tecido, atingindo a proporção de 25% ao dia (Vasconcelos, 2005).

Mediante a constatação da perda de extensas áreas de epitélio nos vilos de camundongos alcoólicos, associada as evidências de diferentes mecanismos de morte celular, torna-se importante investigar se a taxa de renovação é suficiente para permitir a reposição da perda celular, amplamente observada. Para esclarecer estas dúvidas novos estudos serão direcionados.

CONCLUSÃO

Baseados nas evidências imunocitoquímicas e, principalmente nas ultra-estruturais, concluiu-se que a apoptose, a necrose e, possivelmente, a autofagia são responsáveis pela degeneração dos enterócitos nos vilos duodenais de camundongos alcoólicos.

REFERÊNCIAS

- Asai, K., Buurman, W. A., Reutelingsperger, C. P. et al (2005) Modular effects of estradiol on ethanol – induced apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 40, 326-335.
- Asai, K., Buurman, W. A., Reutelingsperger, C. P. et al. (2003) Low concentrations of

- ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. *Scand J Gastroenterol* 38, 1154-1161.
- Baehrecke, E. H. (2003) Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 10, 940-945.
- Bursh, W., Ellingu, A., Gerner, C. H. et al. (2000) Programmed cell death (PCD): apoptosis, autophagic PCD, or others?. *Annals of Sciences* 926, 1-12.
- Cameron, R. G., Neuman, M. G., Shear, N. H. et al. (1998) Modulation of liver specific cellular response to ethanol in vitro in Hep G2 cells. *In Vitro Toxicology* 12, 1-29.
- Chang, Y-X., Chen, S., Ma, L. P. et al. (2005) Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World Journal of Gastroenterol* 11, 5485-5491.
- Codogno, P. & Meijer, A. J. (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* 12, 1509-1518.
- Cuervo, A. M. (2003) Autophagy and aging – when “all you can eat” is yourself. *Sci Aging Knowledge Environ* 36, 2.
- Cuervo, A. M. (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14, 70-77.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Edinger, A. L. and Thompson, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 663-669.
- Eskelinen, E. L. (2005) Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* 12, 1468-1472.
- Felver, M. E., Mazly, E., McGuire, M. et al. (1990) Plasma tumor necrosis factor - a

predicts long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcoholism Clin Exp Res* 14, 225-259.

Garcia-Ruiz, C., Calell, A., Morales A. et al. (1995) Role of oxidative sheds generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 48, 825-834.

Giampaolo, C. Poulsen, S. S., Szabo, S. et al. (1978) Stereomicroscopic and ultrastructural characterization of propionitrile-induced duodenal ulcer in the rat. *Lab Invest* 38, 1-7.

Gonzalez-Polo, R. A., Doya, P., Pauleau, A. L. et al (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 118, 3091-3102.

Gozwacik, D. and Kimchi, A.(2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891-2906.

Guimarães, C. A. and Linden, R. (2004) Programmed cell death. *Eur J Biochemistry* 271, 1638-1650.

Huppertz, B., Frank, H-G. and Kaufmann, P. (1999) The apoptosis cascade-morphological and imunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 200, 1-18.

Ingelman-Sundberg, M.; Johansson, I.; Yin, H. et al. (1993) Ethanol – inducible cytochrome P 450 2 e 1: genetic polymorphism regulation and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 10, 447-452.

Iwanaga, T. (1995) The involvement of macrophages and lymphocytes in the apoptosis of enterocytes. *Arch Histol Cytol* 58, 151-159.

Jones, B. A. and Gores, G. J. (1997) Physiology and pathophysiology of apoptosis in

- epithelial cells of the liver, pancreas and intestine. *Am J Physiol* 272, 61174-61188.
- Katz, G. G.; Shear, N. H.; Malkiewicz, I. et al. (2001) Signaling for ethanol – induced apoptosis and repair *in vitro* . *Clinical Biochemistry* 34, 219-227.
- Kerr, J. F., Wylie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Levin, S. (1995) A toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues. *Toxicol Pathol* 23, 533-539.
- Levin, S., Bucci, T. J. Cohen, S. M. et al. (1999) The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc committee of the Society of Toxicologic Pathologist. *Society of Toxicologic Pathology* 27, 484-490.
- Levine, B. and Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict *Journal Clin Invest* 115, 2679-2688.
- Levraud, J. P., Adam, M., Luciani, M. F. et al. (2004) Cell death in *Dictyostelium*: Assessing a genetic approach. *When the cells die II*. Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (eds), p. 59-78 , Wiley-Liss, New York.
- Locke, M. and McMahon, J. T. (1971). The origin and fate of microbodies in the fat body of an insect. *J Cell Biol* 48, 61-78.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Biolog* 36, 2405-2419.
- Majno, G. and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Patho* 146, 3-19.
- Meijer, A. J. and Codogno, P. (2004) Regulation and role autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem & Cell Biol* 36, 2445-2462.

- Mi, L. J., Mak, K. M. and Lieber, C. S. (2000) Attenuation of alcohol – induced apoptosis of hepatocytes in rat liver by polyenylphosphatidilcholine (PPC), *Alcohol Clin Exp Res* 24, 207-212.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsu, M. et al.(2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.
- Newman, M. G., Shear, N. H., Bellentani, S. et al. (1998) Role of cytokines in ethanol-induced hepatocytotoxicity in Hep 62 cells. *Gastroenterol* 114, 157-169.
- Newman, M.G. Shear, N. H. Cameron, R.. et al. (1999) Ethanol induced apoptosis in vitro. *Clin Biochem* 32, 547-555.
- Olie, R. A., Durrieu, F. and Cornillon, S. et al. (1998) Apparent caspase independence of programmed cell death in Dictyostelium. *Curr Biol* 8, 955-958.
- Oue, F. G. and Gores, G. J.(1996) Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterol* 110, 1238 – 1243.
- Potten, C. S. and Allen, T. D. (1977) Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *Journal of Ultrastructure Research* 60, 272-277.
- Shao, Y., Gao, Z., Marks., et al. (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *PNAS* 101, 18030-18035.
- Shibahara, T., Sato, N., Waguri, S. et al. (1995)The fate of effete epithelial cells at the villi tips of the human small intestine. *Arch Histol Cytol* 58, 205-219.
- Slomiany, B. I., Piotrowski, J. and Slomiany, A. (1997) Chronic alcohol ingestion enhances tumor necrosis factor – alpha expression and salivary gland apoptosis. *Alcohol Clin Exp*

Res 21, 1530-1533.

Slomiany, B. I., Pietrowski, J. and Slomiany, A. (2000) Suppression of endothelin-converting enzyme – 1 during buccal mucosa ulcer healing: effect of chronic ethanol ingestion. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 318-332.

Souza, H. S .P., Elia, C. C. S., Braulio, V. B. *et al.* (2003) Effects of ethanol on gut-associated lymphoid tissues in a model of bacterial translocation: a possible role of apoptosis. *Alcohol* 30, 183-191.

Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267,1445-1449.

Sun, Z., Wang, X., Wallen, R. *et al.* (1998) The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand J Gastroenterol* 33, 415-422.

Vasconcelos, A. C. Patologia Geral em Hipertexto
<<http://www.icb.ufmg.br/~pat/Apoptose.htm>> acesso em 04 dez 2005.

Walt, S. E., Ikede, H., Matin, S. *et al.* (1999) Cutaneous burn increases apoptosis in the gut epithelium of mice. *J Am Coll Surg* 188, 10-16.

Watson, A. J. M. and Pritchard, D.M. (2000) Lessons from genetically engineered animal models VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knock out mice. *Am J Physiol* 278, 61-65.

Wilson, J. W and Potten, C. S. (2004). Cell turnover: intestine and other tissues. *When Cells Die II*. Lockshin, R.A. and Zakeri, Z. (eds), p. 201-240. Wiley, *Haboken*.

Yoshimori, T. (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 453-458.

Young, C., Klocke, B. J., Tenkonovo, T. *et al.* (2003) Ethanol – induced neuronal apoptosis

in vivo requires – Bax in the developing mouse brain. *Cell Death Differ* 10, 1148–1155.

Yuan, J., Lipinski, M. and Degterev, A. (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40, 401-413.

LEGENDAS

Figura 1. Epitélio dos vilos duodenais de camundongos controles após 8 semanas de tratamento.

- A. Eletromicrografia de varredura da superfície do epitélio dos vilos. Notar a perda individual de enterócitos identificada pelo espaço (asterisco). Bar = 20 μ m. *Inset:* Detalhe de um enterócito em degeneração (seta). Bar = 100 μ m.
- B. Eletromicrografia de transmissão do epitélio de superfície dos vilos exibindo um enterócito em degeneração. Luz (L). Bar = 3 μ m.
- C. Eletromicrografia de transmissão evidenciando um enterócito em degeneração entre dois enterócitos normais. Luz (L). Bar = 1 μ m.

Figura 2. Epitélio dos vilos duodenais de camundongos após 8 semanas de tratamento.

- A. Fotomicrografia de enterócitos (setas) de camundongos alcoólicos em processo de morte celular marcados positivamente para o TUNEL. Luz (L). Bar = 50 μ m. *Inset:* marcação positiva para o TUNEL (seta) em camundongos controles. Bar = 50 μ m.
- B. Eletromicrografia de transmissão de células em apoptose (asteriscos) observadas em camundongos alcoólicos. Luz (L). Bar = 5 μ m.
- C. Eletromicrografia de transmissão de uma célula apoptótica de camundongo alcoólico contendo núcleo com marginalização da cromatina condensada (setas), fragmentação nuclear (asterisco) e mitocôndrias (mc) preservadas no citoplasma reduzido. Bar = 0,5 μ m.
- D. Eletromicrografia de varredura de brotamentos celulares (seta) no ápice de um vilo duodenal. Bar = 40 μ m.

Figura 3. Eletromicrografias de transmissão do epitélio dos vilos duodenais de camundongos após 8 semanas de tratamento.

- A. Visão geral dos enterócitos normais de camundongos controles. Microvilos (seta), núcleo (N), luz (L). Bar = 3 μ m.
- B. Microvilos (mv) normais de um enterócito de camundongo controle. Trama terminal (setas). Luz (L). Bar = 0,2 μ m.
- C. Enterócitos de camundongos alcoólicos evidenciando a desintegração de microvilos (setas). Luz (L). Núcleo (N). Bar = 3 μ m. *Inset*: Detalhe da lesão dos microvilos e ausência de trama terminal (asterisco). Luz (L). Bar = 0,5 μ m.

Figura 4. Eletromicrografia de transmissão dos enterócitos de camundongos alcoólicos após 8 semanas de tratamento.

- A. Visão geral dos enterócitos. Notar célula exibindo mitocôndrias alteradas (mc), vacúolos (va) e microvilos preservados (seta). Núcleo (N), luz (L). Bar = 3 μ m.
- B. Vacúolos autofágicos eletron-densos de conteúdo e forma heterogêneos interpretados como lisossomos. Bar = 0,4 μ m.
- C. Região citoplasmática de uma célula em autofagia. Notar a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático (setas) e rompimento das cristas mitocondriais com rarefação de matriz (asteriscos). Bar = 0,5 μ m.
- D. Região nuclear e perinuclear de uma célula em autofagia evidenciando vacuolização citoplasmática (V) abundante e núcleo íntegro (N). Bar = 1 μ m.

Figura 5. Eletromicrografias dos enterócitos de camundongos alcoólicos após 8 semanas de tratamento.

- A. Eletromicrografia de varredura de um grupo de células em necrose exibindo os limites de rompimento (setas) da membrana plasmática apical. Bar = 10 μ m.
- B. Eletromicrografia de transmissão de células necróticas (CN) ao lado de células de citoplasma eletrôn-denso (CE). Luz (L). Bar = 5 μ m.
- C. Eletromicrografia de transmissão de células necróticas. Notar núcleo picnótico com grumos cromatínicos condensados (setas), rarefação citoplasmática com início de desintegração das organelas (asterisco). Luz (L). Bar = 3 μ m.
- D. Eletromicrografia de transmissão de uma célula necrótica (CN) ao lado de uma célula de citoplasma eletrôn-denso em autofagia (CE). Notar rarefação citoplasmática (asterisco) e extravasamento do material celular (seta) devido ao rompimento da membrana plasmática apical. A célula em autofagia (CE) apresenta maior densidade citoplasmática, mitocôndrias alteradas (mc), presença de vacúolos (v) e preservação de microvilos (mv) . Luz (L). Bar = 1 μ m.

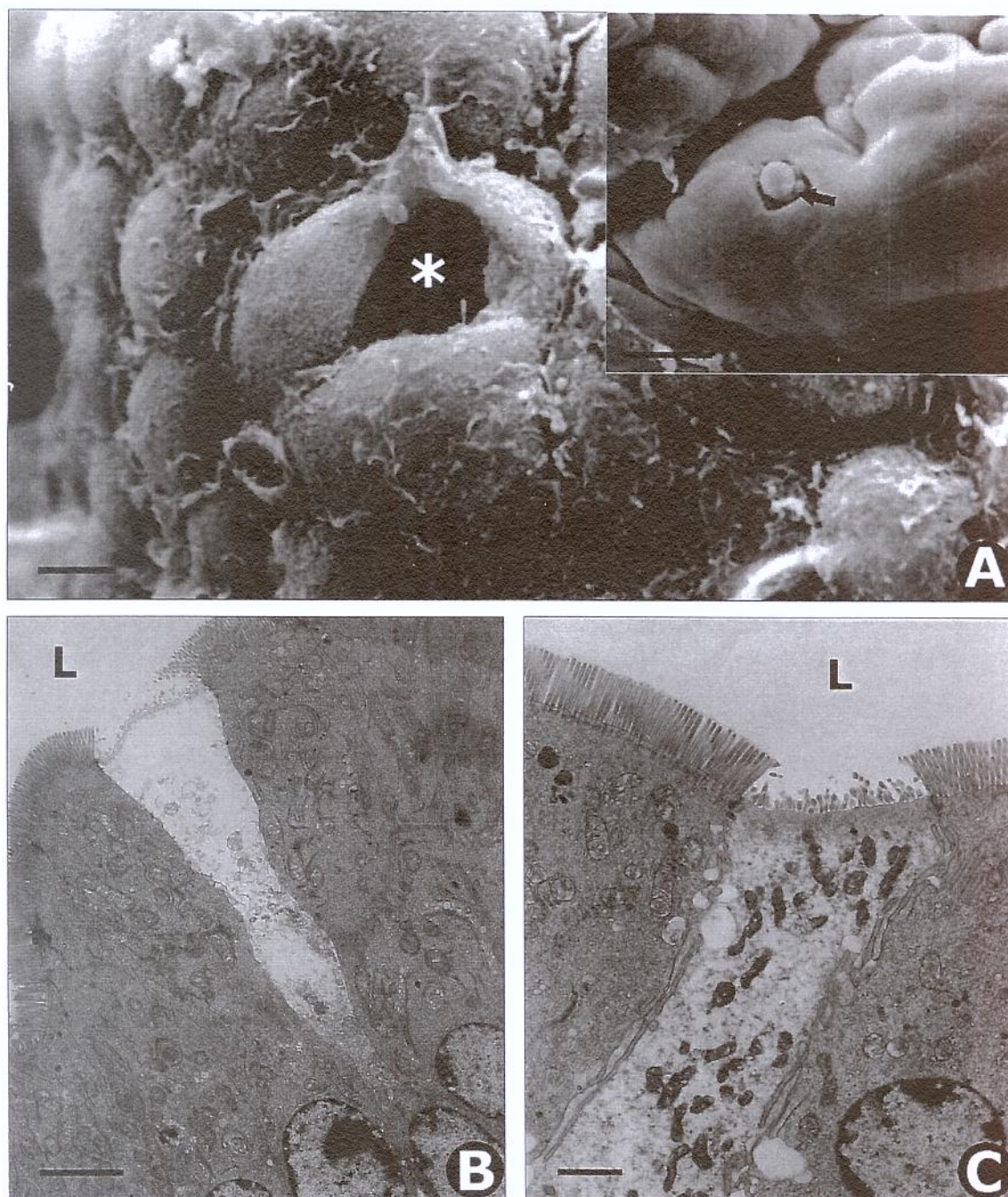


Figura 1

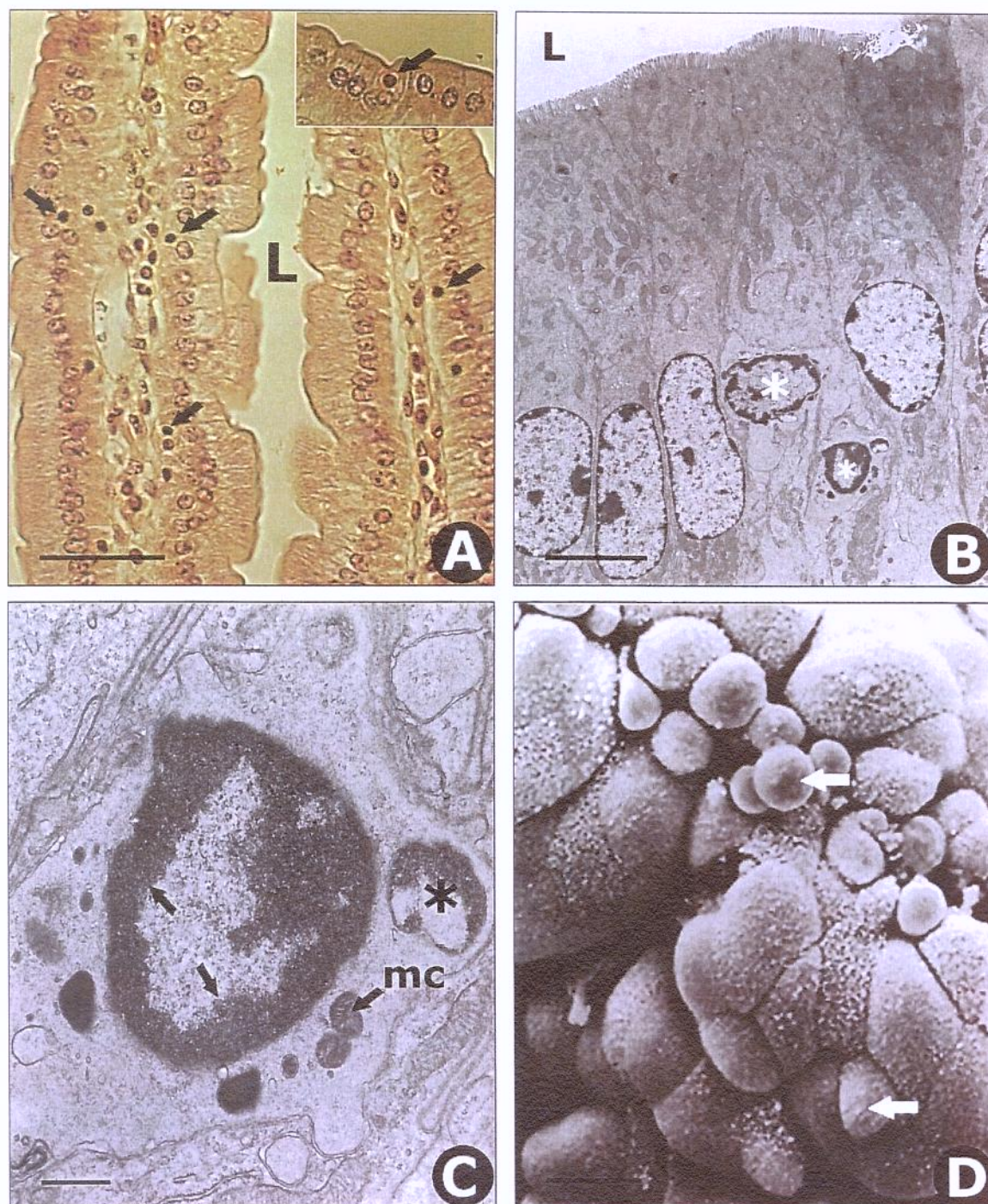


Figura 2

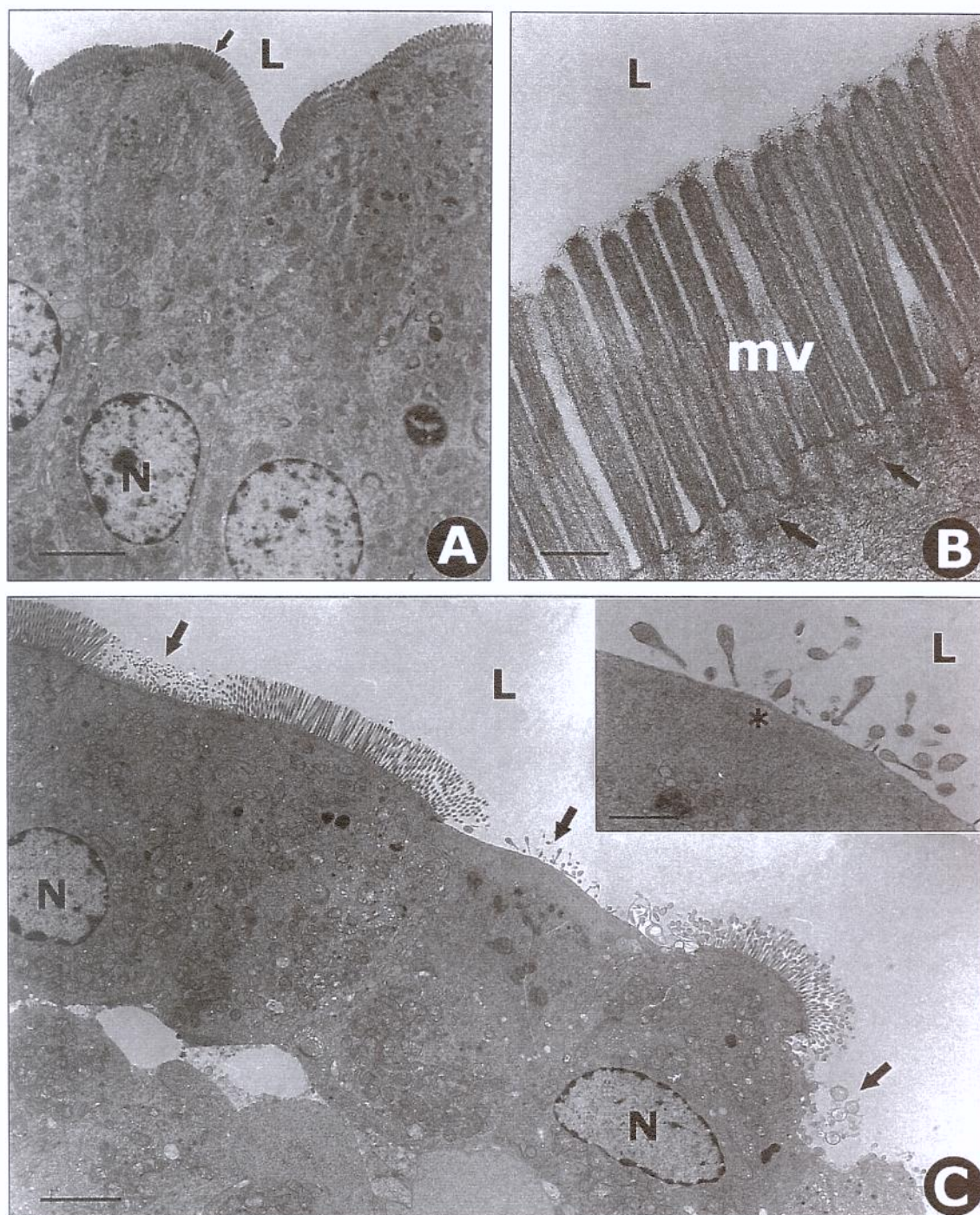


Figura 3

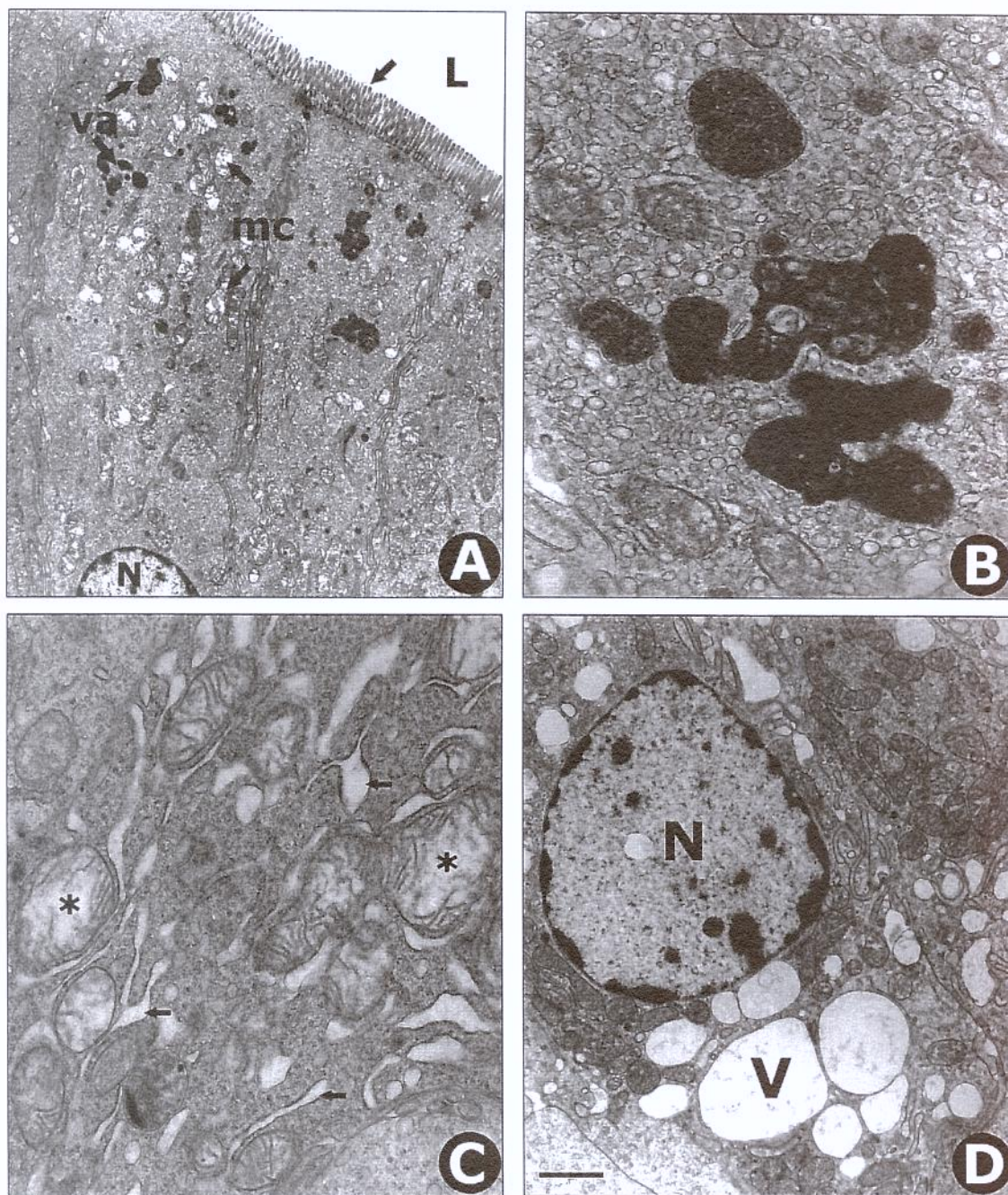


Figura 4

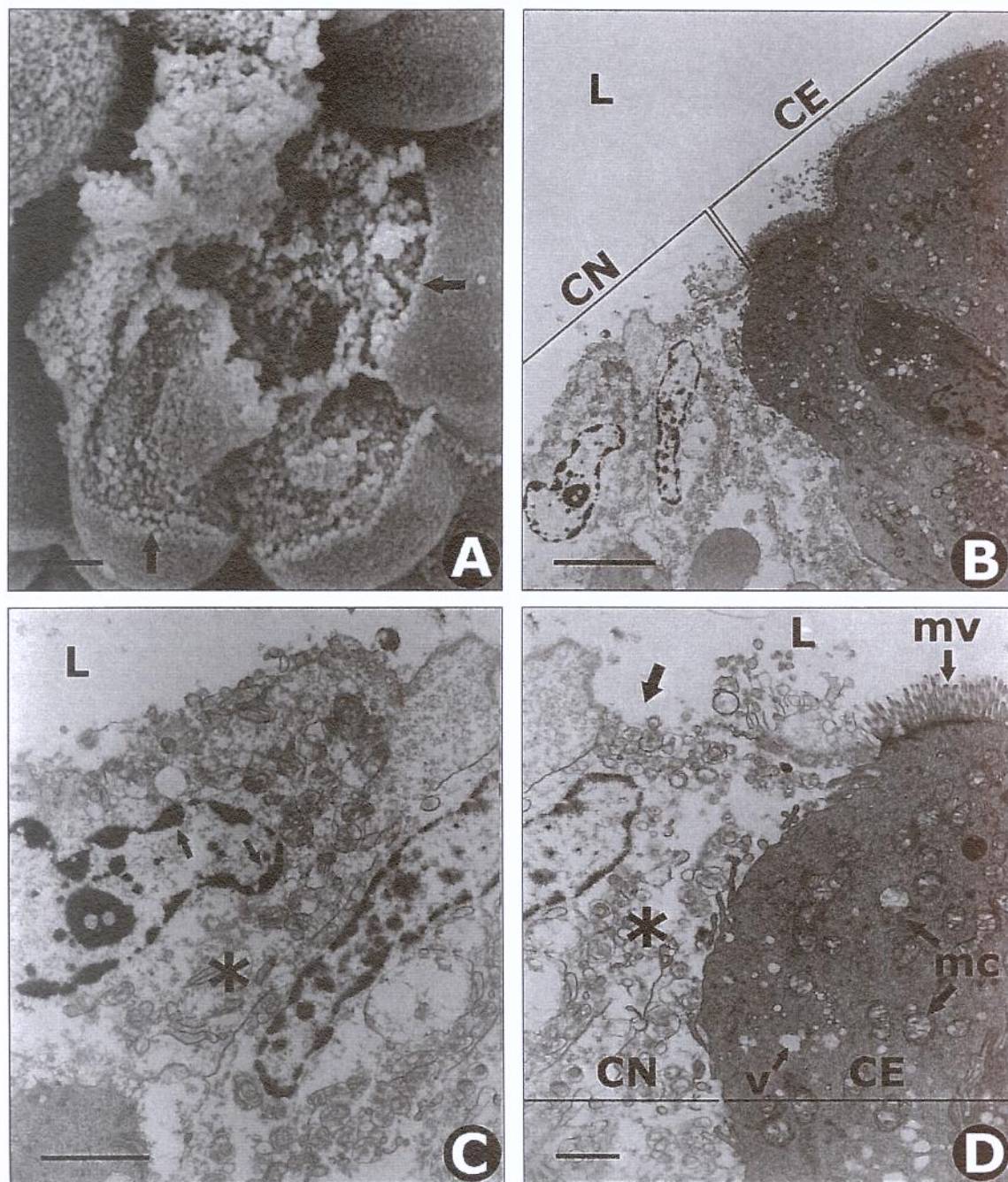


Figura 5

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para compreender os presentes resultados foi essencial considerar não somente a quantidade de etanol consumida, porém a ingestão calórica total e a composição da dieta, pois a desnutrição protéica produz deliberada atrofia intestinal (VITERI et al., 1974). O procedimento experimental usado para indução dos camundongos à ingestão de etanol consistiu na dieta líquida modificada e baseada em modelos propostos (DECARLI & LIEBER, 1967; LIEBER & DECARLI, 1982). Camundongos C57BL toleram, por longos períodos, soluções de até 20g/kg/dia de etanol (RANDALL, 1973), sendo utilizados como modelos em pesquisas de alcoolismo (BECKER & LOPEZ, 2004; LOPES & BECKER, 2005). Segundo Middaugh et al. (2003), a linhagem de camundongos C57BL/6 (B6), voluntariamente, consome etanol suficiente para produzir intoxicação em níveis sangüíneos. O método experimental, aplicado neste estudo, permitiu aos camundongos do grupo GA o consumo de 30% do total de calorias proveniente do etanol. Indivíduos que recebem do etanol, diariamente, mais que 20% de calorias foram descritos como alcoólicos (UGARTE et al., 1970). Então, os animais do grupo GA podem ser considerados “alcoólicos”.

Dietas líquidas são normalmente utilizadas em estudos sobre os efeitos do consumo agudo e crônico de etanol. Em animais experimentais, essas dietas permitem o consumo do etanol em níveis mais elevados em comparação ao administrado na água (LIEBER & DECARLI, 1989). Provendo acesso livre a água, os tratamentos com etanol são menos estressantes, os animais serão mais saudáveis e pelo menos, para as dietas

baseadas em Sustacal, eles irão consumir tanto quanto, ou senão mais dieta líquida do que aqueles em que o acesso à água é restrito (DE FIEBRE & DE FIEBRE, 2003).

Em pacientes alcoólicos crônicos, sinais comuns e sintomas de disfunção do intestino delgado incluem diarreia, perda de massa corpórea e deficiência multivitamínica (GEOKAS et al., 1981). Entre as principais causas da diarreia estão as anormalidades na motilidade intestinal delgada e a diminuição na absorção de água e eletrólitos (PERLOW et al., 1977).

O consumo médio de água dos animais do GA foi maior do que o observado nos animais do GC (Apêndice D). Provavelmente, a maior ingestão de água do GA seja um mecanismo compensatório necessário, podendo estar relacionado a sua diminuída absorção ou à desidratação, normalmente provocada pela ingestão de etanol.

A adequação nutricional da dieta consumida pelos camundongos foi evidenciada pelo aparente crescimento continuado, massa corpórea e morfologia duodenal normais observada no GC. A qualidade e quantidade total de calorias fornecidas ao GC foram as mesmas oferecidas ao GA, porém o etanol foi substituído, isocaloricamente, por dextrose. É sugestivo de que as diferenças na massa corpórea dos animais e as alterações morfológicas observadas foram provenientes da ingestão de etanol.

Não houve alteração na massa corpórea dos animais em ambos os grupos estudados até a quarta semana. Entretanto, com 8 semanas, as diferenças foram significativas para o GA (Apêndice E). ADDOLORATO et al. (1998) observaram em pacientes alcoólicos massa corpórea e de gordura reduzidas comparados com bebedores sociais.

Em termos de necessidades de nutrientes como proteínas, minerais ou vitaminas, as calorias provenientes do etanol são consideradas “vazias” ou não-aproveitáveis bioquimicamente (SANTOLARIA et al., 2000). Elas não são armazenadas de forma eficiente, dissipando-se como calor. Isto pode explicar porque uma significativa substituição de calorias não alcoólicas pelas provenientes do etanol está associada a perda de massa corpórea (PIROLA & LIEBER, 1972).

A perda de massa corpórea pode ser atribuída a dieta deficiente ou a má-absorção calórica (LINSCHER, 1970). Descarta-se a possibilidade da dieta ser deficiente, pois os animais de ambos os grupos consumiram a mesma quantidade e qualidade de calorias (70% delas provenientes do Sustacal).

Estudos clínicos demonstraram que ocorre má-absorção de certas vitaminas, magnésio, selênio, zinco (MAILLOT et al., 2001) e ácido fólico (HALSTED et al., 1971; DE LA VEJA et al., 2001) quando o consumo de etanol é excessivo e prolongado. É conhecido que danos na mucosa do intestino delgado, induzidos pelo etanol, variam dependendo da dose do etanol e das espécies de animais experimentais (GEOKAS et al., 1981).

Nas condições experimentais deste estudo, as análises realizadas permitiram avaliar os efeitos do etanol na morfologia dos vilos duodenais de camundongos.

As lesões teciduais resultantes da ingestão de baixas concentrações de etanol, por longos períodos, foram semelhantes às aquelas observadas durante a ingestão aguda de baixas e de altas concentrações, já descritas na literatura. No presente trabalho, ficou evidente que baixas concentrações de etanol, administradas cronicamente, reduzem as densidades de superfície de vilos e numérica de células caliciformes. Baseados nas evidências ultra-estruturais e imunocitoquímicas, no epitélio dos vilos duodenais de

camundongos alcoólicos, observou-se sinais de morte celular levando à degeneração dos enterócitos. Os dados sugerem que doses clinicamente aceitáveis de etanol representam fatores de risco para a manutenção da integridade dos vilos duodenais, interferindo na barreira intestinal.

Portanto, a ação lesiva do etanol é preocupante mesmo para consumidores leves. Dessa forma, torna-se importante investigar se a taxa de renovação é suficiente para permitir a reposição da perda celular, amplamente observada em animais alcoólicos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, B et al. Internal structure of intestinal villous: morphological and morphometric observations at different levels of the mouse villous. **J Anat**, v. 162, p. 263-273, 1989.
- ADDOLORATO, G. et al. Influence of chronic alcohol abuse on body weight and energy metabolism: is excess ethanol consumption a risk factor for obesity or malnutrition? **J Intern Med**, v. 244, p. 387-395, 1998.
- ALTHAUSEN, T. L.; UYEHAMA, K.; LORAN, M. R. Effects of alcohol on absorption of vitamin A in normal and in gastrectomized subjects. **Gastroenterol**, v. 38, p. 942-945, 1960.
- ASAI, K.M. et al. Low concentrations of ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. **Scand J Gastroenterol**, v. 38, p. 1154-1161, 2003.
- BALLARD, H. J.; WILKES, J. M.; HIRTS, B. H. Effect of alcohols on gastric and small intestinal apical membrane integrity and fluidity, **Gut**, v. 29, p. 1648-1655, 1988.
- BARAONA, E.; PIROLA, R. C.; LIEBER, C. S. Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat. **Gastroenterol**, v. 66, p. 226-234, 1974.
- BECK, I. T.; DINDA, P. K. Acute exposure of small intestine to ethanol. Effect on morphology and function. **Dig Dis Sci**, v. 26, p. 817-838, 1981.
- BECKER, H. C.; LOPEZ, M. P. Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, p. 1829-1838, 2004.

- BJORKMAN, D. J.; JESSOP, L. D. Effects of acute and chronic ethanol exposure on intestinal microvillus membrane lipid composition and fluidity. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 18, p. 560-565, 1994.
- BODE, J. C. Alcohol and the gastrointestinal tract. **Ergeb Inn Med Kinderheilkd**, v. 45, p. 1-75, 1980.
- BODE, J. C. et al. A. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. **Hepatogastroenterol**, v. 31, p. 30-34, 1984.
- BODE, C.; BODE, J. C. Effect of alcohol consumption on the gut. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, p. 575-592, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência da Saúde. **Normas e procedimentos na abordagem do alcoolismo**. Brasília, Ministério da Saúde, 1994, 61p.
- BRENNAN, P. C.; McCULLOUGH, J. S.; CARR, K. E. Variations in cell and structure populations along the length of murine small intestine. **Cells Tissues Organs**, v. 164, p. 221-226, 1999.
- CARDIM, M. S. et al. Epidemiologia descritiva do alcoolismo em grupos populacionais do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 2, p. 191-211, 1986.
- CASINI, A. et al. Ethanol-induced alterations of matrix network in the duodenal mucosa of chronic alcohol abuser. **Virchows Arch**, v. 434, p. 127-135, 1999.
- CASAFONT, F. et al. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal em las hepatopatias crônicas. **Rev Med Univ Nav**, v. 42, p. 183-187, 1998.
- CHANG, T.; LEWIS, J.; GLAZKO, A. J. Effects of ethanol and other alcohols on the transport of amino acids and glucose by everted sacs of rat small intestine. **Biochim**

Biophys Acta, v. 135, p. 1000-1007, 1967.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. **Am J Anat**, v. 141, p. 461-480, 1974.

COOK, E. B. et al. Acute inhibition by ethanol of intestine absorption of glucose and hepatic glycogen synthesis on gut refeeding after starvation in the rat. **Biochem J**, v. 254, p. 59, 1998.

DE FIEBRE, N. L. C.; DE FIEBRE, C. M. Freely accessible water does not decrease consumption of ethanol liquid diets. **Alcohol**, v. 29, 61-68, 2003.

DE LA VEJA, M. J. et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: the importance of the thermolabile form of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Alcohol**, v. 25, p. 59-67, 2001.

DE CARLI, L. M.; LIEBER, C.S. Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. **J Nutr**, v. 91, p. 331-336, 1967.

DINDA, P. K. Et al.. Effect of ethanol on sodium-dependent glucose transport in the small intestine of the hamster. **Gastroenterol**, v. 68, p. 1517-1526, 1975.

DINDA, P. K.; BECK, I. T. On the mechanism of the inhibitory effect of ethanol on intestinal glucose and water absorption. **Dig Dis Sci**, v. 22, p. 529-533, 1977.

DUNNE, F. J. Alcohol and the immune system. **BMJ**, v. 298, p. 543-544, 1989.

EZZATI, M. et al. Comparative risk assessment collaboration group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet**, v. 360, p. 1347-1390, 2002.

FOX, J. E.; McELLIGOTT, T. F.; BECK, I. T. Effect of ethanol on the morphology of

hamster jejunum. **Am J Dig Dis**, v. 23, p. 201-209, 1978a.

FOX, J. E.; McELLIGOTT, T. F.; BECK, I. T. The correlation of ethanol-induced depression of glucose and water transport with morphological changes in the hamster jejunum *in vivo*. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 56, p. 123-131, 1978b.

FOX, J. E.; BOURDAGES, R.; BECK I. T. Effects of ethanol on glucose and water absorption in hamster jejunum *in vivo*. Methodological problems: Anesthesia, nonabsorbable markers and osmotic effect. **Am J Dig Dis**, v. 23, p. 193 – 200, 1978c.

FOX, J. E. et al. The ultrastructure of blebs induced in the hamster jejunum by ethanol. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 57, p. 305-313, 1979.

GEOKAS, M. C. et al. H. Ethanol, the liver, and the gastrointestinal tract. **Ann Int Med**, v. 95, p. 198-211, 1981.

GOETSCH, C.; KLIPSTEIN, F. A. Effect of folate deficiency of the intestinal mucosa on jejunal transport in the rat. **J Lab Clin Med**, v. 89, p. 1002-1008, 1977.

GREEN, P. Alcohol: nutrition and malabsorption. **Clin Gastroenterol**, v. 12, p. 563-574, 1983.

HAGMANN, M. Alcohol takes it toll on Europe's youth. **Bull World Health Organ**, v. 79, p. 380, 2001.

HALSTED, C. H.; ROBLES, E. A; MEZEY, E. Decreased jejunal uptake of labeled folic acid (^3H -PGA) in alcoholic patients: roles of alcohol and nutrition. **N Engl J. Med**, v. 285, p. 701-706, 1971.

HALSTED, C. H.; ROBLES, E. A.; MEZEY, E. Distribution of ethanol in the human gastrointestinal tract. **Am J Clin Nutr**, v. 26, p. 831-834, 1973.

HALSTED, C. H.; VILLANUEVA, J. A.; DEVLIN, A. M. Folate deficiency, methionine metabolism, and alcoholic liver disease. **Alcohol**, v. 27, p. 169-172, 2002.

HERMOS, J. A. et al. Mucosa of the small intestine in folate-deficient alcoholics. **Ann Intern Med**, v. 76, p. 957-965, 1972.

HOYUMPA, A. M. Jr. et al. Thiamine transport across the rat intestine. II. Effect of ethanol. **J. Lab Clin Med**, v. 86, p. 803-816, 1975.

HOYUMPA, A. M.; PATWARDHAN, R.; ANTONSON, D. Effect of thiamine deficiency and acute ethanol ingestion on jejunal transport in rats. **Am J Clin Nutr**, v. 34, p. 14-19, 1981.

HOYUMPA, A. M. Mechanisms of vitamin deficiencies in alcoholism. **Clin Exp Res**, v. 10, p. 573-582, 1986.

IBER, F. L. Alcohol and the gastrointestinal tract. **Gastroenterol**, v. 61, p. 120-123, 1971.

KALANT, H. Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effects on biological membranes. **The Biology of Alcoholism**. v 1, Biochemistry, B. Kissin, H. Begleiter (eds). New York: Plenum Press, 1971, p. 1-62

KAMINO, K.; INOUE, A. Light-scattering studies on brain microsomes. I. Evidence for osmotic behavior. **Biochem Biophys Acta**, v. 183, p. 36-47, 1969.

KANG, Y. J.; ZHOU, Z. Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p.391-404, 2005.

KRASNER, N. et al. Alcohol and absorption from the small intestine. 2. Effect of ethanol on ATP and ATPase activities in guinea-pig jejunum. **Gut**, v. 17, p. 249-251, 1976.

KUO, Y. J.; SHANBOUR, L. L. Effects of ethanol on sodium, 3-O- methyl glucose, and

- L-alanine transport in the jejunum. **Am J Dig Dis**, v. 23, p. 51-56, 1978.
- LEMBCKE, B; KRAUS, B.; LANKISCH, P. G. Small intestinal function in chronic relapsing pancreatitis. **Hepatogastroenterol**, v. 32, p. 149-151, 1985.
- LEV, R. et al. Pathological and histomorphometric study of the effects of alcohol on the human duodenum. **Dig**, v. 20, p. 207-213, 1980.
- LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. Ethanol dependence and tolerance: a nutritionally controlled experimental model in the rat. **Res Com Chem Pathol Pharmacol.**, v. 6, p. 983-991, 1973.
- LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. Alcoholism: **Clin Exp Res**, v 6, p. 523-531, 1982.
- LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. **Alcohol & Alcohol**, v. 24, p. 197-211, 1989.
- LIEBER, C. S. **Medical Disorders of Alcoholism: Pathogenesis and Treatment**. v. XXII, Philadelphia:W. B. Saunders Company, 1982.
- LIEBER, C. S. Alcohol and the liver. **Hepatosol**, v. 4, p. 1243-1260, 1984.
- LIEBER, C. S. Perspectives: do alcohol calories count? **Am J Clin Nutr**, v. 54, p. 976-982, 1991.
- LIEBER, C. S. **Medical and nutritional complications of alcoholism**. Mechanisms and Management. New York: Plenum Press, 1992.
- LIEBER, C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v. 34, p. 9-19, 2004.
- LINSCHKEER, W. G. Malabsorption in cirrhosis. **Am J Clin Nutr**, v. 23, p. 226-234, 1970.

- LOPES, M. F.; BECKER, H. C. Effect of pattern and number of chronic ethanol exposures on subsequent voluntary ethanol intake in C57BL/6J mice. **Psychopharmacol**, v. 181, p. 688-696, 2005.
- MACGREGOR, R.. R. Alcohol and immune defense. **JAMA**, v. 256, p. 1474-1479, 1986.
- MAILLOT, F.; FARAD, S.; LAMISSE, F. Alcool et nutrition. **Pathol Biol**, v. 49, p. 683-688, 2001.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995, 131p.
- MAGALHÃES, M. São Paulo tem no mínimo 980 mil alcoólatras. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 11 mai, 2000. p. 1.
- MARKOWITZ, J. S.; MCRAE, A. L.; SONNE, S. C. Oral nutritional supplementation for the alcoholic patient: a brief overview. **Ann Clin Psychiatry**, v. 12, p. 153-158, 2000.
- MEZEY, E. Intestinal function in chronic alcoholism. **Ann NY Acad Sci**, v. 252, p. 215-227, 1975.
- MIDDAUGH, L. D. et al. Chronic ethanol consumption by C57BL/6 mice promotes tolerance to its interoceptive cues and increases extracellular dopamine, an effect blocked by naltrexone. **Alcohol Clin Exp Res**, v 27, p. 1892-1900, 2003.
- MILLAN, M. S. et al. Villous damage induced by suction and by ethanol intake in normal human small intestine. **Dig. Dis. Sci**, v. 25, p. 513-525, 1980.
- MINCIS, M. **Etanol e o trato gastrointestinal**. Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento. São Paulo: editorial Lemos, 3^a. ed, 2002, 1033p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Classificação de transtornos mentais e de**

comportamento da CID 10. Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993, 101p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Neurociências: consumo e dependência de substâncias psicoativas.** Genebra: OMS, 2004, 40p.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde.** Genebra: OMS, 2003, 60p. Disponível em: <[http:// www.opas.org.br/sistema/arquivos d_cronic.pdf](http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf)> Acesso em 05 dez 2005.

OTANI, T. et al. Cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: japan public health center-based prospective study. **Alcohol**, v. 31, p. 155-160, 2003.

PERLOW, W.; BARAONA, E.; LIEBER, C. S. Symptomatic intestinal disaccharidase deficiency in alcoholics. **Gastroenterol**, v. 72, p. 680-684, 1977.

PERSSON, J. et al Morphologic changes in the small intestine after chronic alcohol consumption. **Scand J Gastroenterol**, v. 25, p. 173-184, 1990.

PIROLA, R. C.; LIEBER, C. S. The energy coast of the metabolism of drugs, including alcohol. **Pharmacology**, v. 7, p. 185-196, 1972.

PRONKO, P. et al. Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol-and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract. **Alcohol & Alcohol**, v. 37, p. 229-235, 2002.

PUROHIT, V.; KHALSA, J.; SERRANO, J. Mechanisms of alcohol-associated cancers: introduction and summary of the symposium. **Alcohol**, v. 35, p. 155-160, 2005.

RANDALL, C. The effect of p-chlorophenylalanine on ethanol preference in C57BL mice.

intestine. **Alcohol Alcoholism**, v. 20, p. 89-124, 1985.

WU, A.; CHANARIN, I.; SLAVIN, G.; LEVI, A. J. Folate deficiency in the alcoholic – its relationship to clinical and hematological abnormalities, liver disease and folate stores. **Br J Haematol**, v.29, p. 469-478, 1975.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1999.

ZUCULOTO, S.; ROSSI, M. A. Effect of chronic ethanol consumption on mucosal morphology and mitotic index in the rat small intestine. **Digestion**, v. 19, p. 277-283, 1979.

APÊNDICES

**APÊNDICE A – ADAPTAÇÃO GRADATIVA DOS CAMUNDONGOS À DIETA LÍQUIDA
(SUSTACAL)**

APÊNDICE B – ADAPTAÇÃO GRADATIVA DOS CAMUNDONGOS AO ETANOL

APÊNDICE C – ADAPTAÇÃO GRADATIVA DOS CAMUNDONGOS À DEXTROSE

APÊNDICE D – CONSUMO MÉDIO DE ÁGUA DOS CAMUNDONGOS

APÊNDICE E – PESO CORPÓREO MÉDIO DOS CAMUNDONGOS

**APÊNDICE A – ADAPTAÇÃO GRADATIVA DOS CAMUNDONGOS À DIETA LÍQUIDA
(SUSTACAL)**

Período (dias)	Dieta sólida (g)	Dieta líquida (ml)
01	6	0
02	5	5
03	4	10
04	3	15
05	2	20
06	1	25
07	0	30

APÊNDICE B – ADAPTAÇÃO GRADATIVA DOS CAMUNDONGOS AO ETANOL

Período (dias)	Sustacal (g)	Etanol (g)	Etanol (ml)	Etanol (% p/v)	Sustacal (calorias %)	Etanol (calorias %)
01	7,5	0,21	0,26	0,7	95	5
02	7,5	0,21	0,26	0,7	95	5
03	7,5	0,21	0,26	0,7	95	5
04	7,3	0,42	0,53	1,4	90	10
05	7,3	0,42	0,53	1,4	90	10
06	7,3	0,42	0,53	1,4	90	10
07	6,9	0,63	0,79	2,1	85	15
08	6,9	0,63	0,79	2,1	85	15
09	6,9	0,63	0,79	2,1	85	15
10	6,3	0,84	1,06	2,8	80	20
11	6,3	0,84	1,06	2,8	80	20
12	6,3	0,84	1,06	2,8	80	20
13	6,1	1,05	1,33	3,5	75	25
14	6,1	1,05	1,33	3,5	75	25
15*	5,6	1,26	1,59	4,2	70	30

OBS: Cálculo para 30 ml de solução

* Dia de início do tratamento

APÊNDICE C – ADAPTAÇÃO GRADATIVA DOS CAMUNDONGOS À DEXTROSE

Período (dias)	Sustacal (g)	Dextrose (g)	Sustacal (calorias %)	Dextrose (calorias %)
01	7,5	0,4	95	5
02	7,5	0,4	95	5
03	7,5	0,4	95	5
04	7,3	0,8	90	10
05	7,3	0,8	90	10
06	7,3	0,8	90	10
07	6,9	1,2	85	15
08	6,9	1,2	85	15
09	6,9	1,2	85	15
10	6,5	1,6	80	20
11	6,5	1,6	80	20
12	6,5	1,6	80	20
13	6,1	2,0	75	25
14	6,1	2,0	75	25
15*	5,6	2,5	70	30

OBS: Cálculo para 30 ml de solução

* Dia de início do tratamento

APÊNDICE D – CONSUMO MÉDIO DE ÁGUA DOS CAMUNDONGOS

Período (semanas)	Grupos	
	Controle	Alcoólico
4	64,69±5,20 _a	62,35±5,24 _a
8	61,24±3,40 _b	64,24±3,23 _a

O consumo médio é dado em mililitros (ml). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

APÊNDICE E – PESO CORPÓREO MÉDIO DOS CAMUNDONGOS

Período (semanas)	Grupos	
	Controle	Alcoólico
4	19,48±1,05 _a	19,30±1,23 _a
8	18,93±0,80 _a	17,90±0,96 _b

O peso corpóreo médio é dado em gramas (g). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.