

End. Decimo: 76498
R13854664106
22106126

TEONAS CARVALHO CIPRIANO

ESTUDOS MORFOMÉTRICO E CINÉTICO DO EPITÉLIO JEJUNAL
PROXIMAL DE RATOS COM DEFICIÊNCIA AGUDA DE TIAMINA.

D
616.39
C5232

Dissertação apresentada ao Departamento
de Patologia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da U.S.P., para obten-
ção do grau de MESTRE.

Orientador:
Prof. Dr. SÉRGIO ZUCOLOTO

1984



À minha esposa Marta
e às nossas filhas:

Sáskia

Cardinale

e

Monera

Ao meu pai

e à memória de minha mãe

À memória do amigo Capelo



A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto pelo muito que te nho aprendido em ciência.

Ao Prof. Dr. Marcos A. Rossi pela documentação fotográfica e oportunas sugestões.

Ao Prof. Dr. Gerson Muccillo pelo auxílio que me prestou na análise estatística.

À Laura Midori Kawasse pelos excelentes preparados histológicos que obteve para este trabalho.

À Márcia Aparecida Oliva Destido pela dedicada tarefa dactilográfica.

À Ivone de Paula da Silva, à Maria Aparecida A polinário Caetano e à Vera Lúcia Paula de Souza pelo valioso auxílio nos serviços do biotério.

Aos professores e demais funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P. pela amizade.

Aos colegas e demais funcionários do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará pelo incentivo.

À Universidade Federal do Ceará, à CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que colaboraram de um ou de ou tro modo, meus agradecimentos sinceros.



Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3. RESULTADOS	32
4. DISCUSSÃO	42
5. RESUMO E CONCLUSÕES	51
6. SUMMARY AND CONCLUSIONS	53
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema de saúde pública mundial que aflige tanto os países desenvolvidos como os subdesenvolvidos, sendo, obviamente, mais crucial nestes (Jellife, 1968). Nas doenças em geral o prognóstico é bem pior em indivíduos desnutridos que em indivíduos bem nutridos (Leevy et al., 1965; Bollet & Owens, 1973; Bistrrian et al., 1974; 1976; Prevost & Butterworth, 1974; Hill et al., 1977; Yates et al., 1977; Blackburn, 1979; Weinsier et al., 1979). Mesmo em países desenvolvidos, como a Inglaterra e os Estados Unidos da América do Norte (U.S.A.), cerca de 44 a 48% dos pacientes internados em hospitais gerais são desnutridos (Bistrrian et al., 1976; Weinsier et al., 1979). A desnutrição humana é, quase sempre, multicarenencial e se manifesta com deficiência de proteínas, de carboidratos, de lipídios, de vitaminas e de sais minerais. No tocante às carências vitamínicas, no homem estas são geralmente múltiplas e raramente específicas. Em relação às diversas deficiências vitamínicas é importante saber que a deficiência de tiamina acomete cerca de 30% dos pacientes internados em hospitais gerais (Leevy et al., 1965). O efeito da carência específica de vitamina B₁ é difícil de ser pesquisado pois a mesma vem, em regra, acompanhada de outras deficiências; logo, torna-se importante o seu estudo em animais de experimentação.

A tiamina, vitamina B₁ ou aneurina, é conhecida desde 1927 (Jansen & Donath). Sua estrutura química foi determinada em 1936 (Williams) e, a partir desta data, a sua função bioquímica e o seu papel na nutrição foram pesquisados por muitos autores. É absorvida pelo tubo digestivo e fosforilada no epitélio intestinal produzindo-se a tiamina pirofosfato (TPP) ou cocarboxilase (Goldsmith, 1964) que participa no metabolismo celular, como coenzima, em cerca de 24 sistemas enzimáticos (Sauberlich, 1967) existentes em mamíferos e em microorganismo (Nakada & Sund, 1958; Goldberg & Racker, 1962).

Nos mamíferos as enzimas que possuem a tiamina pirofosfato (ou pirofosfato de tiamina) como coenzima são a transcetolase (E.C. 2.2.1.1.), a piruvato desidrogenase (E.C. 4.1.1.1.) e a alfacetoglutarato desidrogenase (E.C. 1.2.4.2.). A transcetolase age na fase não oxidativa da via das pentoses cuja importância metabólica está na síntese de pentoses e de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) necessárias para a síntese do DNA da célula. A piruvato desidrogenase age na descarboxilação do ácido pirúvico em acetil-CoA, na glicólise. A alfacetoglutarato desidrogenase age no ciclo de Krebs descarboxilando o ácido alfacetoglutárico em succinil-CoA. Estas duas reações de descarboxilação auxiliam na formação da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) que é importante na formação de ATP na cadeia da fosforilação oxidativa. Conse

quentemente pode-se supor que a deficiência aguda de tiamina (como acontece experimentalmente na ingestão de uma dieta sem vitamina B₁ e/ou no uso de antagonistas desta vitamina) levaria a importantes alterações metabólicas e conseqüentemente a distúrbios funcionais e morfológicos no organismo animal principalmente no sistema nervoso, no coração, no fígado e no tubo gastrointestinal. Animais mais alimentados com dieta sem tiamina apresentam anorexia e conseqüente perda de peso corporal que se dá do 12º ao 14º dia (Gubler, 1968; Bai et al., 1971).

A desnutrição, de uma maneira geral, altera o epitélio do intestino delgado induzindo diminuição da absorção de nutrientes e de medicamentos, o que fatalmente aumenta a morbidade de pacientes internados (Willard et al., 1980). É no jejuno proximal que quase todos os elementos nutritivos e drogas ingeridos são absorvidos (Truelove & Reynell, 1972), além de ser esta a região intestinal mais estudada no ser humano (Shiner, 1957; Rubin & Dobbins, 1965; Stanfield et al., 1965; Cook & Lee, 1966). A carência de tiamina afeta de modo relevante vários tecidos e, naqueles em que a renovação celular é muito rápida, o efeito lesivo de tal deficiência deve ser também muito importante. O epitélio de revestimento da mucosa do intestino delgado apresenta uma das maiores taxas de renovação celular do organismo (Bertalanffy, 1960).

Ao se analisar o epitélio do intestino delgado

reconhecem-se quatro compartimentos: um compartimento proliferativo, que corresponde à porção da cripta onde as células são produzidas; um compartimento funcional, que é a própria vilosidade, onde o enterócito desempenha suas funções digestivas; um compartimento de maturação, localizado entre os compartimentos proliferativo e funcional, onde o enterócito se diferencia; e um compartimento de células indiferenciadas e de células de Paneth, no fundo da cripta (figura 1).

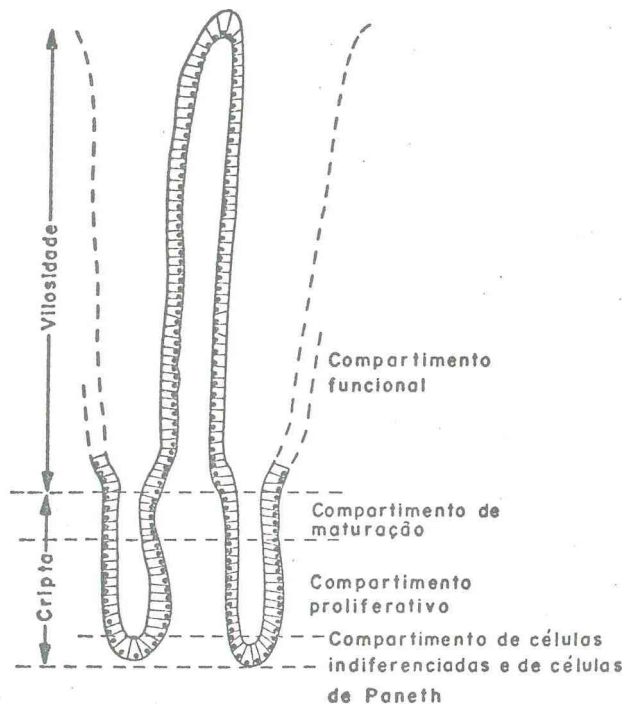


Figura 1: Compartimentos do epitélio do intestino delgado.

As células são continuamente produzidas nas criptas e, a seguir, migram ao longo das vilosidades (Leblond & Stevens, 1948; Bertalanffy, 1960; Lipkin, 1973; Wright, 1984). As criptas de Lieberkühn têm a função primordial de manter a renovação e a diferenciação de células para a vilosidade que desempenha as funções de absorção, digestão e secreção. A taxa de produção celular da cripta representa um dos mais importantes parâmetros para os estudos de proliferação celular intestinal (Wright, 1980).

A proliferação, a migração, a diferenciação e a perda de células que ocorrem em tecidos normais ou patológicos, podem ser avaliadas pelos estudos de cinética celular. A análise cinética das populações celulares têm colaborado muito para uma melhor compreensão do mecanismo patogênico de diversas doenças. A história do estudo da proliferação celular é recente (Leblond & Stevens, 1948). Inicialmente, a cinética celular era avaliada baseando-se no encontro de figuras mitóticas na população de células em proliferação ou, mesmo, quantificando as figuras de mitose em suas fases (prófase, metáfase, anáfase e telófase).

O ciclo celular de uma célula em proliferação começa numa fase e termina na mesma fase do ciclo subsequente (Aherne et al., 1977; Baserga, 1981). Antes de 1952, os pesquisadores achavam que o ciclo celular compreendia duas fases: a mitose e a interfase. Walker &

Yates (1952) medindo a intensidade da reação de Feulgen em células proliferativas de tecido de galinha, demonstraram que a síntese de DNA (ácido desoxiribonucléico) se faz completamente na interfase. Outros pesquisadores reforçaram tal achado, utilizando-se de elementos radioativos, que se incorporam ao DNA da célula em proliferação, e verificaram que a incorporação acontece durante a interfase (Howard & Pelc, 1953; Lajtha et al., 1954). Howard & Pelc (1953), baseando-se em seus achados, propuseram uma divisão do ciclo celular em quatro fases: a) mitose; b) fase G₁ ou de pré-síntese de DNA; c) fase S ou de síntese de DNA; d) fase G₂ ou de pós-síntese de DNA (figura 2).

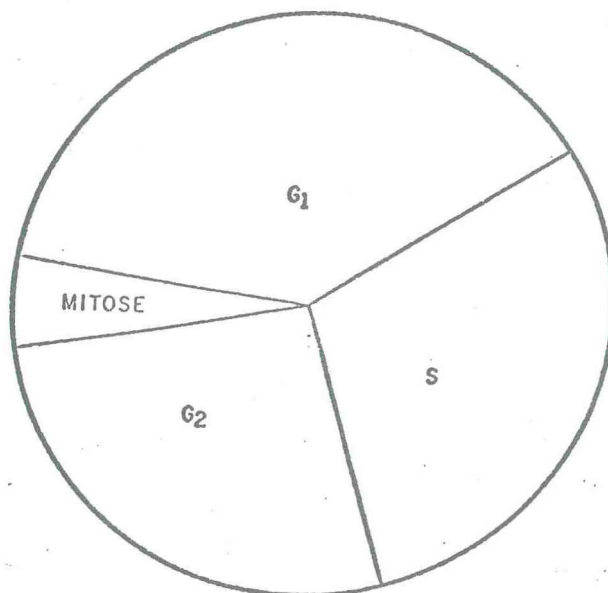


Figura 2: Fases do ciclo celular.

a) Mitose - É o processo de separação física dos cromossomos em duas novas células. As diferentes fases da mitose podem ser reconhecidas por algumas características morfológicas: a prófase é caracterizada pelo condensamento da cromatina nuclear e pelo desaparecimento da membrana nuclear; a metáfase é marcada pela formação dos cromossomos e pelo seu arranjo no plano equatorial da célula; na anáfase há separação das cromátides e se inicia o movimento das mesmas para os pólos da célula; na telófase há o reaparecimento da membrana nuclear; a mitose se completa com a citocinese, surgindo, então, duas células filhas.

b) Fase G1 - Seguindo-se à fase mitótica, a fase G1 também é chamada de fase de pré-síntese do DNA. Seu tempo de duração é extremamente variável sendo a fase mais sensível às alterações ambientais (Quastler & Sherman, 1959; Cameron & Greulich, 1963). A atividade bioquímica essencial dessa fase é marcada pelo início da síntese de DNA, RNA (ácido ribonucléico) e proteínas (Baserga, 1968). A fase G1 pode ser considerada como a de controle do ciclo celular a partir da qual a célula entra em período de latência ou continua a replicação. Em algumas células o controle do ciclo pode-se fazer na fase G2 (Gelfant, 1962; 1963).

c) Fase S - É a fase de síntese do DNA, durante a qual os cromossomos duplicam o seu conteúdo. É na fase de síntese que ocorre a incorporação de isótopos radiati

vos (e.g. a timidina marcada) quando estes entram na sín_utese do DNA. Este fenômeno de incorporação é extremamente importante nas estimativas dos diversos tempos das fases do ciclo celular. Esta fase demora de 6 a 8 horas nas células dos mamíferos (Trasher & Greulich, 1965 a; 1965 b). Um fato referido durante esta fase é que a sín_utese de proteínas pelas células é um pré-requisito impor_utante para a síntese do DNA. Bloqueando-se a síntese protéica há parada da síntese de DNA (Baserga, 1968; Prescott, 1968).

d) Fase G2 - É também chamada de fase de pós-síntese do DNA e se segue à fase S. Os eventos bioquímicos nesta fase são pouco conhecidos; todavia sabe-se que as sínteses de RNA e de proteínas são essenciais para a mitose. Há evidências de que algumas células do organismo entram em repouso proliferativo na fase G2, indicando a existência de um ponto transicional específico nesta fase. Outros investigadores são adeptos da hipótese das calonas, controladoras do crescimento celular, que atuam nesse período do ciclo celular (Bullough, 1965).

Para a análise do ciclo celular é muito impor_utante conhecer o tipo da fase de distribuição de uma população de células vivas, visto que, em cada distribuição usam-se modelos matemáticos diferentes para expressá-la. Em geral, dois tipos de distribuição são úteis para o entendimento da proliferação celular: a distribuição em equilíbrio dinâmico e a distribuição exponen-

cial. Na primeira, a taxa de células perdidas por migração ou por morte é igual à taxa de células produzidas num determinado compartimento; sob essas condições, o número de células numa fase é proporcional à duração da mesma, formando um diagrama de distribuição retangular. Na distribuição exponencial o número total de células na população aumenta de forma exponencial, sendo necessário que todas as células estejam proliferando ao mesmo tempo e que não haja célula perdida na população. Como cada célula produz duas células filhas, após mitose, haverá mais células na fase G1, isto é, mais células na população. O crescimento exponencial acontece nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário, nas células em cultura e no início do crescimento tumoral. Há divergências de opiniões com respeito à implicação destes tipos de distribuição na cripta do intestino delgado. Cairnie et al. (1965 b) relataram que as células da porção inferior da cripta têm crescimento populacional exponencial; Schultze et al. (1972) concluíram que há um estado de equilíbrio dinâmico na cripta como um todo (figura 3).

Numa população proliferativa há sempre uma proporção de células que deixa o ciclo celular. A maneira e o ponto em que as células na população param as suas atividades proliferativas tem sido objeto de muitos estudos, inclusive com a formulação de hipóteses de mecanismos de controle dos tamanhos dos compartimentos pro

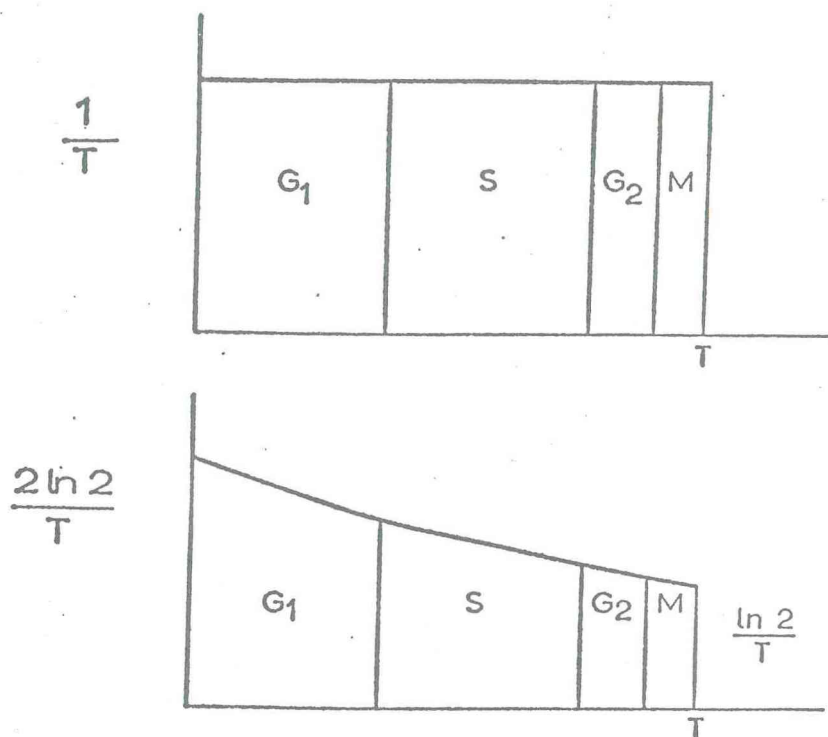


Figura 3: Tipos de distribuição do ciclo celular: condição do estado de equilíbrio dinâmico (acima), comparado com a condição exponencial (abaixo).

liferativos. As células saem do ciclo em dois pontos: na fase G1 e na fase G2. Na cripta de Lieberkühn elas se diferenciam a partir da fase G1 e caminham para a vilosidade, onde desenvolvem suas funções (absorção, digestão e secreção) e são, finalmente, desprendidas no pico da mesma (figura 4).

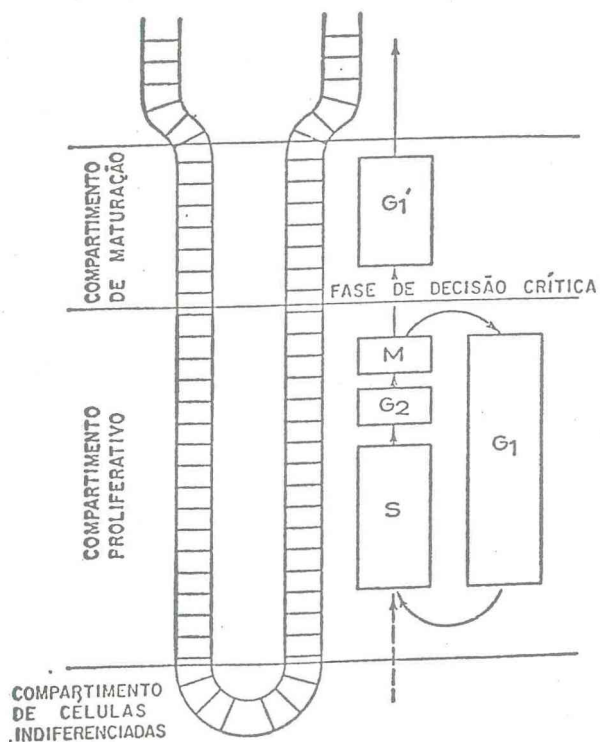


Figura 4: Controle da proliferação celular na cripta do epitélio do intestino delgado.

A morte celular, no epitélio do intestino delgado, acontece na zona de extrusão e não na cripta (Cairnie et al., 1965 b). Das fases G1 e G2 a célula pode entrar em fase de repouso ou fase gê zero (G0) (Lajtha, 1963). Nesta fase as células mantêm as suas potencialidades e podem, sob condições apropriadas, voltar ao ciclo proliferativo como acontece com os tecidos da próstata e da vesícula seminal dos animais castrados e estimulados com testosterona (Morley et al., 1973; Appleton et al., 1973). Na porção basal da cripta de Lieberkühn há células que deixam o ciclo celular a partir da fase G1 (Quasler & Sherman, 1959; Cairnie et al., 1965 a; 1965 b; Wright, et al., 1972 a) e/ou da fase G2 (Clarke, 1973) e entram em G0.

Os estudos sobre o efeito da deficiência aguda de vitamina B₁ no tubo digestivo, citados pela literatura, abordam, basicamente, aspectos bioquímicos e/ou fisiológicos (Harper, 1942; Althausen et al., 1946; Hawk & Hundley, 1951; Grana, 1958; Veen, 1963; Gubler, 1968; Bitter et al., 1969; Bai et al., 1971). A deficiência de B₁, per se, acarreta depressão da atividade de três enzimas (transcetolase, piruvato desidrogenase e alfa-ceto glutarato desidrogenase) que necessitam da tiamina (pirófosfato de tiamina - TPP) como coenzima. A diminuição da atividade da transcetolase induz decréscimo das sínteses de pentoses e de NADPH, essenciais para a produção de DNA (Henderson et al., 1973). A diminuição da atividade

da piruvato desidrogenase e da alfa-cetoglutarato desidrogenase causam uma queda da produção de ATP pelo enterócito. Como vimos, a síntese de DNA e a produção de energia estão intimamente relacionadas com a manutenção do ciclo reprodutivo celular. Consequentemente podemos esperar que neste tipo de deficiência hajam alterações morfológicas da mucosa intestinal; porém não se encontram estudos morfométrico e cinético do epitélio intestinal de animais alimentados com dieta sem tiamina.

Objetivo do presente trabalho: os experimentos do presente trabalho foram realizados para se estudar o efeito da deficiência aguda de tiamina, per se, no epitélio jejunal proximal de ratos, na fase de início de perda de peso corporal, através das análises da morfometria e da proliferação (cinética) celular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animal

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar, machos, recém-desmamados, pesando cerca de 50 g cada, oriundos da colônia mantida no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P..

2.2. Gaiolas

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas semi-metabólicas, de polipropileno, com fundo suspenso de arame, para impedir que o animal ingerisse suas próprias fezes. O comedouro, retirável, de metal inoxidável, externo à gaiola, conecta-se a esta através de tubo de mesma estrutura metálica e se comunica com este por meio de um orifício de 2,9 cm de diâmetro; o tubo, fixo à gaiola, se comunica com esta por intermédio de uma abertura circular de 5,3 cm de diâmetro; tal sistema dificulta o desperdício de alimento e impossibilita o animal de urinar e avacuar no comedou

ro. A água foi oferecida em tubos graduados de Richter.

2.3. Dieta

Foram usados dois tipos de dieta: uma controle, contendo todos os nutrientes e outra sem tiamina (Horwitz, 1965); água de torneira foi fornecida a todos os animais.

A composição da dieta está apresentada na tabe
la 1.

Tabela 1 - Composição da dieta

Componentes	%(g)
Hidratos de carbono	65,8
Caseína livre de vitaminas	20,0
Óleo vegetal	8,0
Mistura salina	5,0
Mistura de vitaminas	1,0
Colina	0,2

A composição da mistura de vitaminas (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, U.S.A.) é mostrada na tabela 2.

Tabela 2 - Composição da mistura de vitaminas

Componentes	Quantidades
Vitamina A	900.000 U.I
Vitamina E	100.000 U.I
Ácido ascórbico	45,00 g
Alfacetocoferol	5,00 g
Ácido paraminobenzóico	5,00 g
Inositol	5,00 g
Nicotinamida	4,50 g
Pantetonato de cálcio	3,00 g
Menadiona	2,25 g
Piridoxina	1,00 g
Riboflavina	1,00 g
Tiamina	1,00 g
Ácido fólico	90,00 mg
Biotina	20,00 mg
Vitamina B ₁₂	1,35 mg
Dextrose q.s.p.	1.000,00 g

A composição da mistura salina (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, U.S.A.) é vista na tabela 3.

Tabela 3 - Composição da mistura salina

Componentes	% (g)
Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)	389,00
Carbonato de cálcio (CaCO_3)	381,40
Cloreto de sódio (NaCl)	139,45
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	57,30
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,00
Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,01
Iodeto de potássio (KI)	0,79
Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,55
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,48
Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,02

2.4. Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos de 10, assim distribuídos: grupo DT - animais alimentados com dieta sem tiamina e água, ad libitum; grupo CP - animais controle pareados com o grupo DT (cada animal deste grupo ingeriu dieta controle e água em quantidades iguais àquelas ingeridas pelos seus respectivos pares do grupo DT); grupo AL - animais alimentados com dieta controle e

água, ad libitum.

De dois em dois dias, os animais foram pesados e as quantidades de ingestão de dieta e de água foram a notadas.

No 19º dia de experimento, quando houve, pela segunda vez consecutiva, diferença de peso corporal es tatisticamente significativa entre os grupos DT e CP, to dos os animais foram sacrificados após terem sido inje tados, intraperitonealmente, com sulfato de vincristina para estudo da proliferação celular (ver item 2.7).

Para as análises do ganho ponderal, da inges tão sólida e da ingestão hídrica (dados clínicos) foi necessária a avaliação dos três grupos (DT, CP e AL) já que o grupo AL servia de controle tanto de DT como de CP. No entanto, como o objetivo deste trabalho foi pes-
quisar o efeito da deficiência aguda de tiamina per se, na morfologia e na cinética do epitélio jejunal, os es tudos morfométrico e de proliferação celular foram fei-
tos apenas nos grupos DT e CP.

Os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical e, em seguida, fragmentos de jejuno proximal, medindo cerca de 1 cm de comprimento, foram retirados logo abaixo do ângulo de Treitz. Os fragemen tos destinados à inclusão em parafina foram fixados em fluido de Carnoy (60% de álcool absoluto, 30% de cloro-
fórmio e 10% de ácido acético glacial) durante 5 horas e, depois, estocados em álcool a 70%. Os espécimes pa-

ra a microdissecção foram fixados em solução de Clarke (75% de álcool absoluto e 25% de ácido acético glacial) por 24 horas e, a seguir, estocados em álcool a 70%.

2.5. Material incluído em parafina

2.5.1. Procedimentos técnicos

Após inclusão em parafina, cortes de quatro micrômetros (4 μ m), longitudinais e perpendiculares à serosa, foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (H-E). Para as medidas morfométricas foram escolhidas apenas aquelas vilosidades e criptas cortadas longitudinalmente sendo as primeiras seccionadas das bases aos ápices e as segundas, das bases às suas aberturas na luz intestinal. Assim, foram avaliados os seguintes dados: altura do enterócito da vilosidade, altura da vilosidade, número de células (população) da vilosidade, profundidade da cripta, número de células da cripta, número de mitoses por cripta e índice mitótico da cripta. As alturas das vilosidades e dos enterócitos, assim como as profundidades das criptas foram determinadas com ocular micrometrada de dez aumentos (10 X) Zeiss KPL em microscópio Zeiss standard. Para a calibração da ocular usou-se uma lâmina micrometrada, calculando-se a distância, em micrômetros, entre dois traços consecutivos na ocular (M), pela fórmula seguinte:

$$M = \frac{a \times c}{b}, \text{ onde}$$

a = número de traços consecutivos e coincidentes na lâmina micrometrada com os traços da ocular micrometrada;
 b = número de traços consecutivos e coincidentes na ocular micrometrada com os traços da lâmina micrometrada;
 c = constante = 10 um (Roulet, 1948; Zucoloto, 1977).

A altura da cripta foi obtida desde o seu ponto mais inferior até a zona de separação entre cripta e vilosidade; a altura da vilosidade foi obtida deste ponto até seu ápice ou zona de extrusão celular; os enterócitos medidos foram aqueles situados no terço médio da vilosidade, região em que estas células têm adquirido seu maior grau de maturidade funcional (Zucoloto, 1982). Com exceção da altura do enterócito, cuja medida foi feita com objetiva de sessenta e três aumentos (63 X), as demais mensurações e contagens foram executadas com objetiva de 16 X.

Foram analisados 30 enterócitos, 30 vilosidades e 30 criptas por rato, após cálculos das médias cumulativas para quantidades estatísticas adequadas (Williams, 1981).

2.5.2. Constante de Tannock

Tannock, em 1967, chamou a atenção para um importante fator geométrico, que deveria ser considerado

nos estudos sobre cinética celular da cripta intestinal (em material incluído em parafina) e que os pesquisadores vinham negligenciando até então. Na cripta, os núcleos em mitose se movem, por razões ainda não explicadas, da posição colunar periférica e justaposta à membrana basal, para lugares mais próximos do eixo (figura 5).

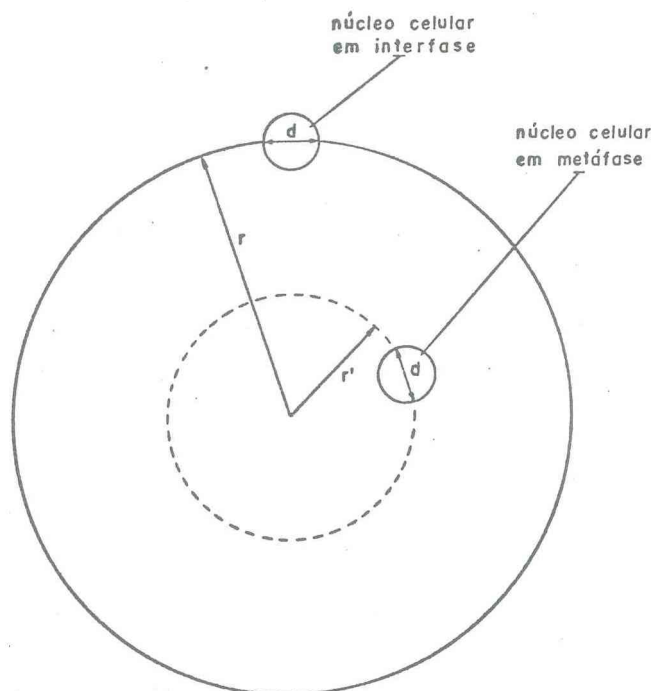


Figura 5: Ilustração diagramática do princípio da constante de Tannock.

Se uma cripta cilíndrica é cortada ao longo do seu eixo, um núcleo em metáfase, de diâmetro d e a uma distância radial r' do eixo, tem uma probabilidade maior de ser contada, pelo cálculo de $d/2\pi r'$ em um dado número n de cortes axiais da cripta, do que um núcleo em interfase, de diâmetro também d e a uma distância r do mesmo eixo, pelo cálculo de $d/2\pi r$ em um mesmo número n de cortes axiais da mesma cripta. Portanto o índice mitótico estará superestimado por r/r' ; o índice mitótico deverá ser, então, multiplicado por um fator r'/r para corrigir a referida superestima na contagem.

2.6. Microdissecção

Fragmentos de cerca de 1 cm de comprimento foram retirados do jejuno proximal e, após terem sido abertos ao nível da implantação do mesentério, foram estendidos em papel de filtro e fixados por imersão em líquido de Clarke, durante 24 horas. Seguindo-se à fixação, os fragmentos foram estocados em etanol a 70% (v/v) até o momento de serem analisados. Para a microdissecção seguiu-se o método de Clarke (1970), modificado por Wright (1980). Para tanto, os fragmentos foram, inicialmente, imersos em álcool a 50% (v/v) durante uma hora, hidrolisados em solução de ácido clorídrico 1N, a 60 °C, por 6 minutos, e corados com reativo de Schiff

por 60 minutos. Durante todo o período de microdissecção os fragmentos foram mantidos numa solução de ácido acético a 45%. Os espécimes foram processados tanto mais rapidamente quanto possível, não se gastando mais do que 6 horas para isso, pois os mesmos descoram e se tornam muito friáveis em tempos maiores. Com auxílio de lupa, pequenas facas (ou bisturis) e finos estiletes foram obtidos conjuntos de vilosidades com suas criptas e criptas isoladas.

Para a contagem das células das criptas, estas foram isoladas na lupa, colocadas uma de cada vez entre lâmina e lamínula e, com leve pressão na lamínula, promoveu-se a esparramação das células, conseguindo-se no microscópio fácil identificação dos enterócitos, esparsamente isolados (Figura 6); para a contagem das células da cripta, isolada pela microdissecção, usou-se retículo com quadrículos ($100 \times 1 \text{ mm}^2$) adaptado à ocular Zeiss standard; desse modo foram obtidos o número de células da cripta, o número de mitoses por cripta e o índice mitótico da cripta.

Ocular de dez aumentos (10 X) foi usada para todas as medidas e contagens; para as medidas de comprimento usou-se ocular micrometrada Zeiss KpL.

A altura da vilosidade foi medida com objetiva 6,3 x; a determinação do número de criptas por vilosidade, a medição da profundidade da cripta e a contagem das células da cripta foram feitas com objetiva 16 X.

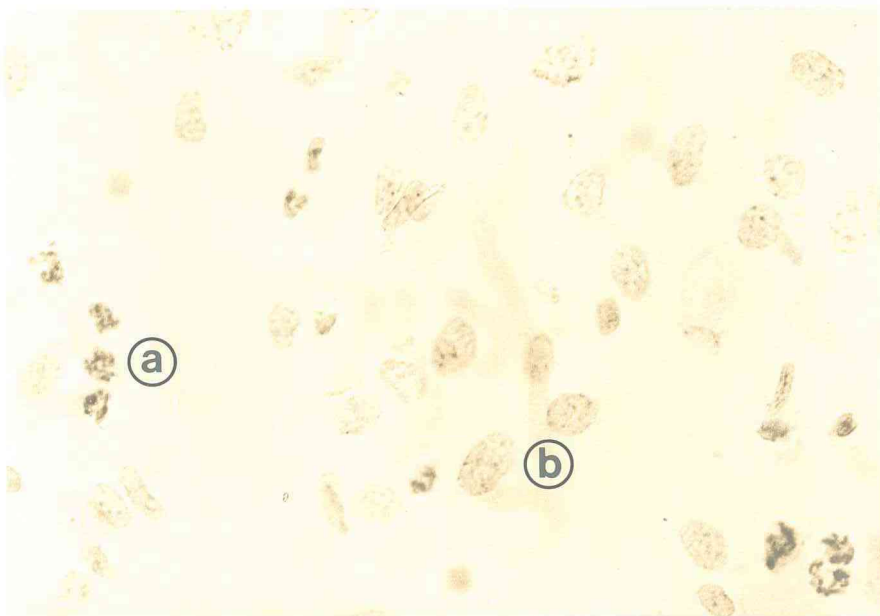


Figura 6: Esparramação celular obtida através da técnica da microdissecção: (a) células em mitose; (b) células em interfase. (Aumentos: 474x).

A altura média da vilosidade e a profundidade média da cripta, de cada animal, foram conseguidas através da contagem de 30 vilosidades e de 30 criptas; para a determinação do número médio de criptas por vilosidade, foram contadas, aproximadamente, 30 vilosidades com suas criptas, por animal.

O número médio de células da cripta, o número médio de mitoses por cripta e o índice mitótico médio da cripta foram obtidos do isolamento e esparramação de 10 criptas por animal (Wright, 1982).

2.7. Estudo da proliferação celular

2.7.1. Uso do bloqueador de mitoses

Todos os ratos foram injetados intraperitonealmente com 1 mg de sulfato de vincristina (Oncovin - Laboratório Eli Lilly) por quilo de peso corporal. Após trinta minutos da injeção de vincristina, foi iniciado o sacrifício dos animais, dois de cada vez (um do grupo DT e um do grupo CP), e a seguir, a cada 15 minutos, durante 2 h 45 min, tempo em que há boa correlação entre o acúmulo de mitoses e o tempo de ação da vincristina (Wright et al., 1972 b; Wright, 1980).

2.7.2. Taxa de produção celular da cripta

A taxa de produção celular da cripta foi calculada tanto a partir do acúmulo de mitoses por cripta, por hora, como a partir do índice mitótico acumulado por cripta, por hora, pelas técnicas de inclusão em parafina e de microdissecção.

Para o cálculo do acúmulo de mitoses/cripta/hora foi necessário conhecer o valor de B que é a declividade da linha de regressão; esta é obtida colocando-se a relação mitoses/cripta em ordenadas e o tempo de ação da vincristina em abcissa. Multiplicando-se o valor de B

por 60 minutos, calculou-se a taxa de acúmulo de mitoses/cripta/hora.

Para o cálculo do índice mitótico acumulado por hora, fez-se necessário o cálculo de B' que é a declividade obtida na análise da linha de regressão, colocando-se o índice mitótico em ordenada e o tempo de ação da vincristina em abcissa.

2.8. Análise estatística

Foram usados, neste trabalho, testes paramétricos com nível de significância de cinco por cento ($\alpha = 0,05$).

Na avaliação dos dados do ganho ponderal foi feita a análise de variância; quando necessário, esta análise foi complementada com o teste de Newman Keuls para três amostras (grupos DT x CP x AL).

Como os animais dos grupos DT e CP ingeriram as mesmas quantidades de dieta e de água, eles foram considerados como um grupo único (DT/CP) quando comparados com o grupo AL (DT/CP x AL), no tocante aos dados da ingestão.

Para análise dos dados das ingestões sólida e hídrica (DT/CP x AL) e dos dados morfométricos (DT x CP) obtidos da inclusão em parafina e da microdissecção, usou-se o teste t de Student.

A taxa de produção celular, tanto do material

incluído em parafina como do da microdissecção, foi calculada através de comparações entre linhas de regressão dos grupos DT e CP (Brownlee, 1960; Snedecor & Cochran, 1973).



3. RESULTADOS

3.1. Dados Clínicos

3.1.1. Ingestão hídrica

A tabela 4 e a figura 7 mostram que, já no 13º dia de experimento, o grupo DT/CP ingeria, significativamente, menor quantidade de água do que o grupo AL; tal diferença persistiu e se acentuou até o final da experiência.

GRUPO	Tempo de experimento (dias)								
	3	5	7	9	11	13	15	17	19
DT/CP	9,30 ±0,37	10,20 ±0,55	10,50 ±0,45	11,00 ±0,62	10,20 ±0,65	10,20 ±0,55	9,70 ±0,96	8,50 ±1,22	7,10 ±0,66
AL	8,70 ±0,42	10,10 ±0,53	8,60 ±0,45	10,50 ±0,48	12,10 ±0,57	13,10 ±0,93	15,30 ±0,76	14,30 ±0,62	12,50 ±0,67
P	NS	NS	NS	NS	NS	<0,025	<0,001	<0,001	<0,001

Média ± erro padrão da média

NS - não significante

Tabela 4: Efeito da deficiência aguda de tiamina na ingestão hídrica média (em mililitros) em ratos: grupos DT/CP e AL.

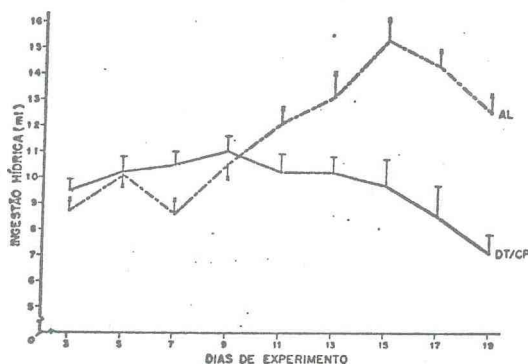


Figura 7: Evolução da ingestão hídrica: grupos DT/CP e AL.

3.1.2. Ingestão da dieta sólida

Nota-se na tabela 5 e na figura 8 que, a partir do 15º dia de observação, o grupo DT/CP passou a ingerir menor quantidade de dieta do que o grupo AL; esta diferença continuou aumentando até o 19º dia do experimento.

GRUPO	Tempo de experimento (dias)								
	3	5	7	9	11	13	15	17	19
DT/CP	7,70 ±0,26	7,30 ±0,37	9,50 ±0,34	9,50 ±0,56	9,80 ±0,55	9,40 ±0,64	7,80 ±0,47	8,10 ±0,53	5,90 ±0,38
AL	7,60 ±0,25	6,95 ±0,74	8,60 ±0,61	9,45 ±0,61	10,05 ±0,47	10,20 ±0,50	10,85 ±0,47	11,40 ±0,69	11,35 ±0,55
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,001	< 0,005	< 0,001

Média ± erro padrão da média

NS - não significativa

Tabela 5: Efeito da deficiência aguda de tiamina na ingestão média de dieta sólida (em gramas) em ratos: grupos DT/CP e AL.

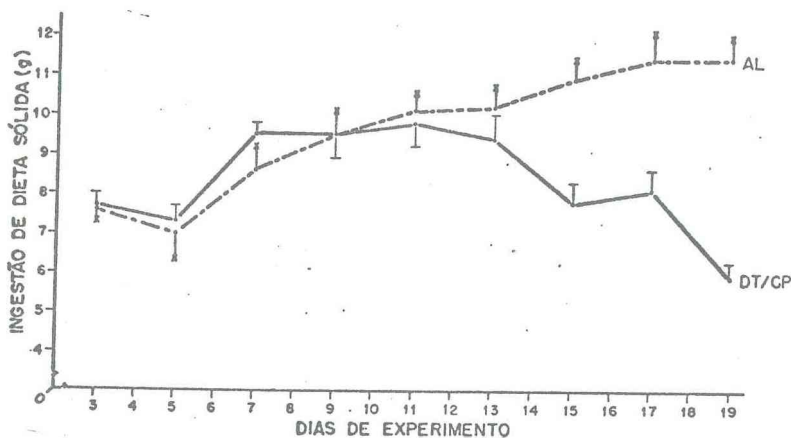


Figura 8: Evolução da ingestão da dieta sólida: grupos DT/CP e AL.

3.2. Morfometria

3.2.1. Material incluído em parafina

Todos os dados morfométricos obtidos do material incluído em parafina (altura do enterócito do terço médio da vilosidade, altura da vilosidade, número de células da vilosidade, profundidade da cripta e população da cripta) mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos DT e CP com DT < CP (tabela 7 e figura 10).

GRUPO	Vilosidade			Cripta	
	Altura(um)	Nº de células	Altura do enterócito(um)	Profundidade(um)	Número de células
DT	353,4 ±11,4	146,1 ±3,7	28,1 ±0,5	153,6 ±5,3	64,9 ±1,3
CP	405,2 ±8,1	160,2 ±1,9	30,1 ±0,4	170,7 ±4,1	73,2 ±1,6
p	< 0,005	< 0,005	< 0,001	< 0,01	< 0,001

Média ± erro padrão

Tabela 7: Efeito da deficiência aguda de tiamina na altura e população da vilosidade, na altura do enterócito da vilosidade e na profundidade e população da cripta no jejuno proximal de ratos: grupos DT e CP. (Técnica de inclusão em parafina).

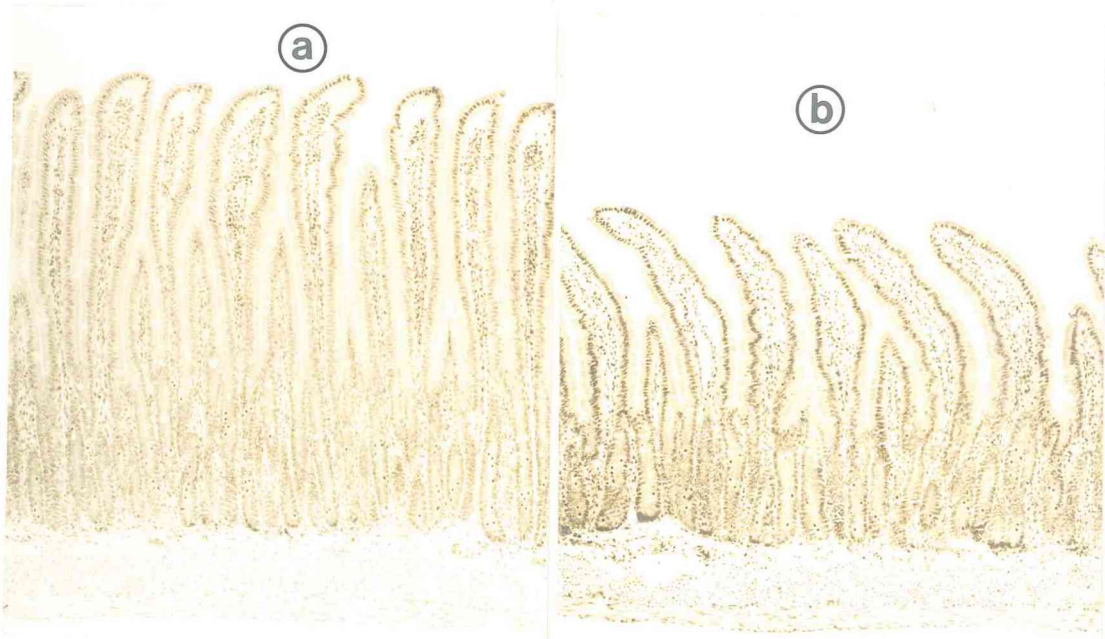


Figura 10: (a) Jejuno proximal do rato controle pareado (CP); (b) jejuno proximal do rato deficiente em tiamina (DT). (Aumento: 86x).

3.2.2. Microdissecção

Com excessão do número de criptas por vilosidade (DT = CP) os demais dados morfométricos (altura da vilosidade, profundidade da cripta e população da cripta) mostraram diferença, estatisticamente, entre os grupos DT e CP (DT < CP) (ver tabela 8).

GRUPO	Altura da vilosidade (um)	Profundidade da cripta(um)	Nº de células da cripta	Nº de criptas por vilosidade
DT	491,93 ±17,95	186,49 ±6,54	378,99 ±15,42	9,56 ±0,74
CP	538,14 ±11,44	194,15 ±6,41	447,65 ±10,64	10,63 ±0,37
P	< 0,025	< 0,025	< 0,001	NS

Média ± erro padrão da média

NS - não significante

Tabela 8: Efeito da deficiência aguda de tiamina na altura da vilosidade, na profundidade e população da cripta e no número de criptas por vilosidade no jejuno proximal de ratos: grupos DT e CP. (Técnica de microdissecção).

3.3. Taxa de produção celular

Não houve diferença, estatisticamente significativa, nas taxas de produção celular, entre os grupos DT e CP, expressas em mitose/cripta/hora e em mitose/1.000 células/hora, tanto pela técnica de inclusão em parafina como pela técnica de microdissecção (tabela 9 e figuras 11, 12, 13 e 14).

	Taxa de produção celular	
	Mitoses/cripta/hora	Mitoses/1.000cél/s/hora
INCLUSÃO EM PARAFINA		
DT	2,56	23,70
CP	4,99	33,20
MICRODISSECÇÃO		
DT	11,12	32,00
CP	16,16	38,20

Tabela 9: Efeito da deficiência aguda de tiamina na taxa de produção celular na cripta do jejuno proximal de ratos: grupos DT e CP. (Técnicas de inclusão em parafina e de microdissecção).

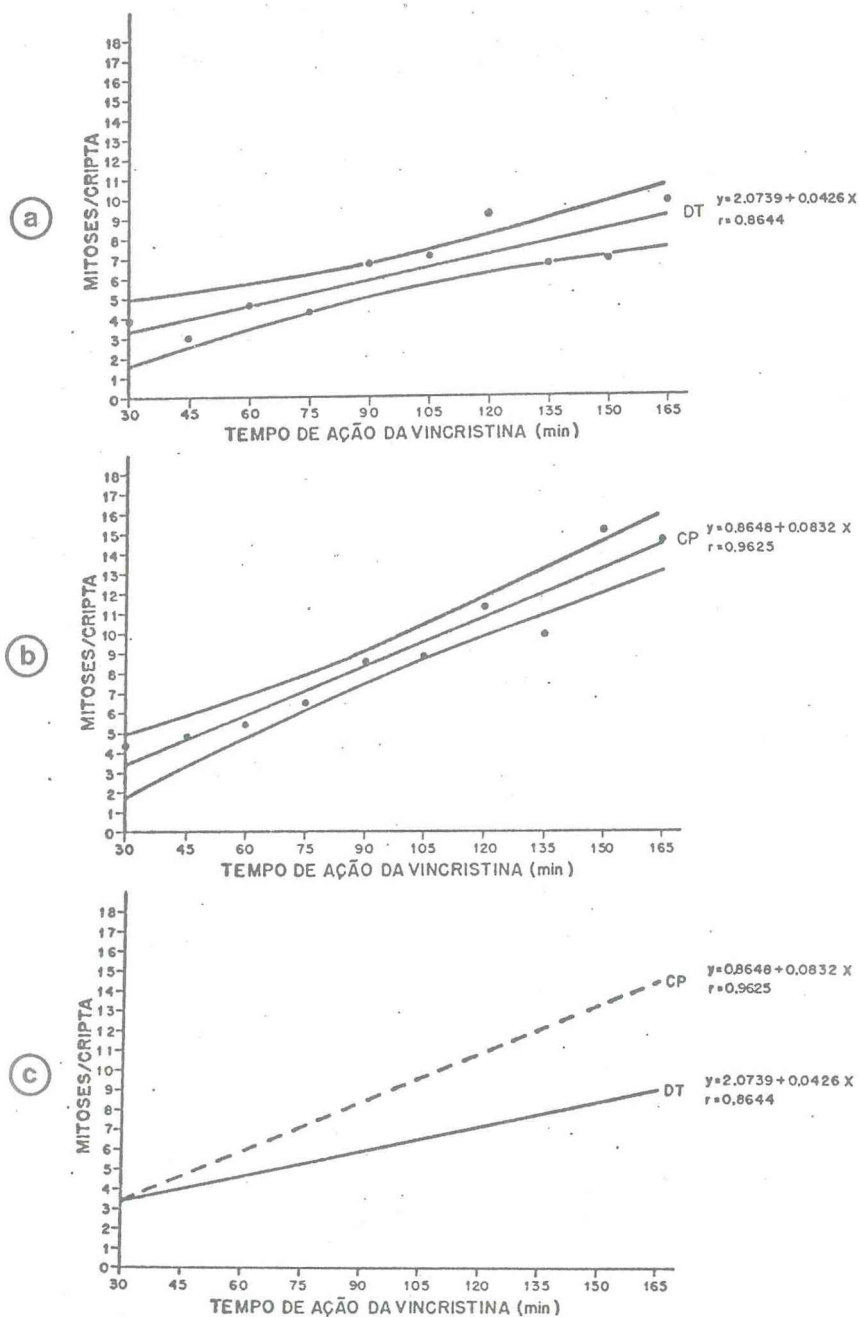


Figura 11: Mitoses acumuladas por cripta no jejuno proximal de ratos: (a) grupo DT; (b) grupo CP; (c) grupos DT e CP. (Técnica de inclusão em parafina).

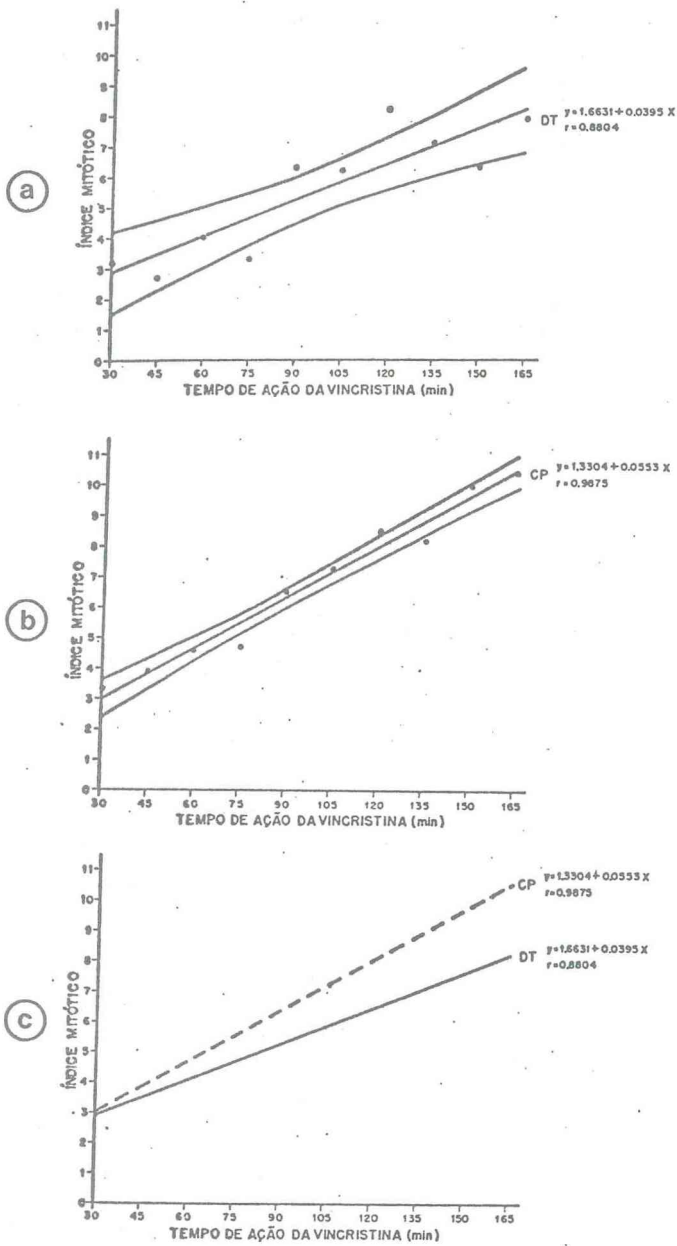


Figura 12: Índice mitótico acumulado na cripta do jejuno proximal de ratos: (a) grupo DT; (b) grupo CP; (c) grupos DT e CP. (Técnica de inclusão em parafina).

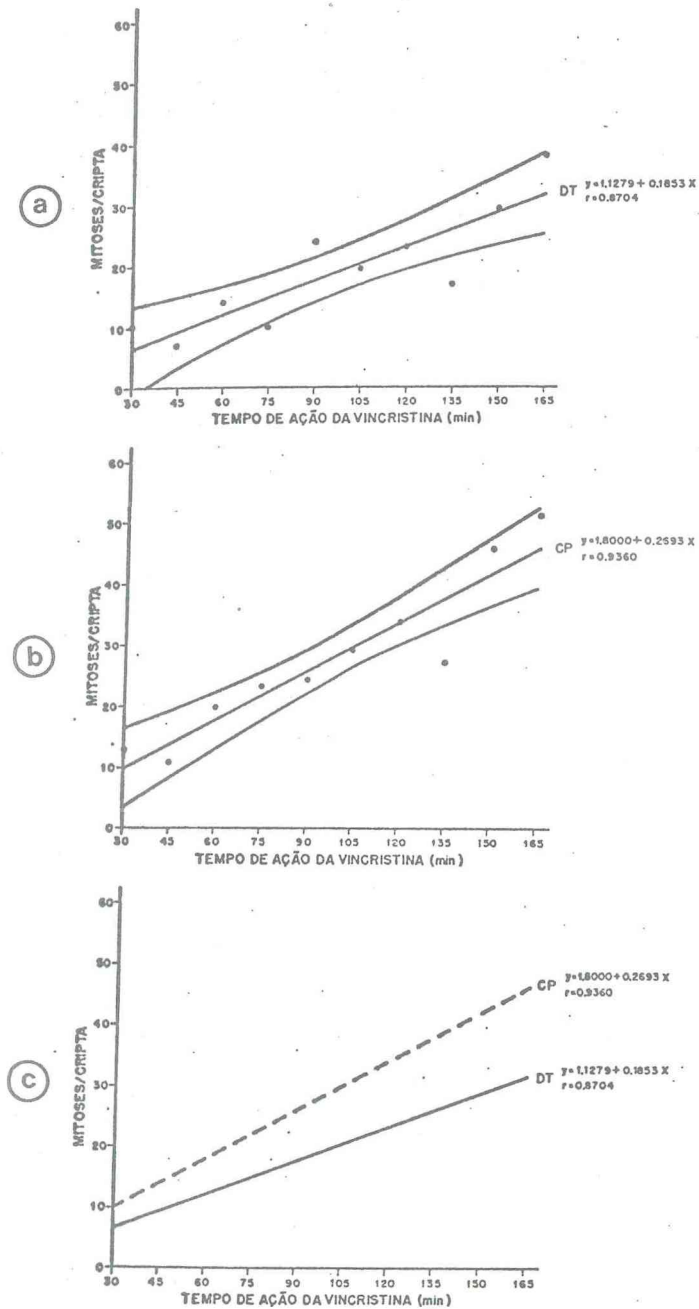


Figura 13: Mitoses acumuladas por cripta no jejuno proximal de ratos: (a) grupo DT; (b) grupo CP; (c) grupos DT e CP. (Técnica de microdissecção).

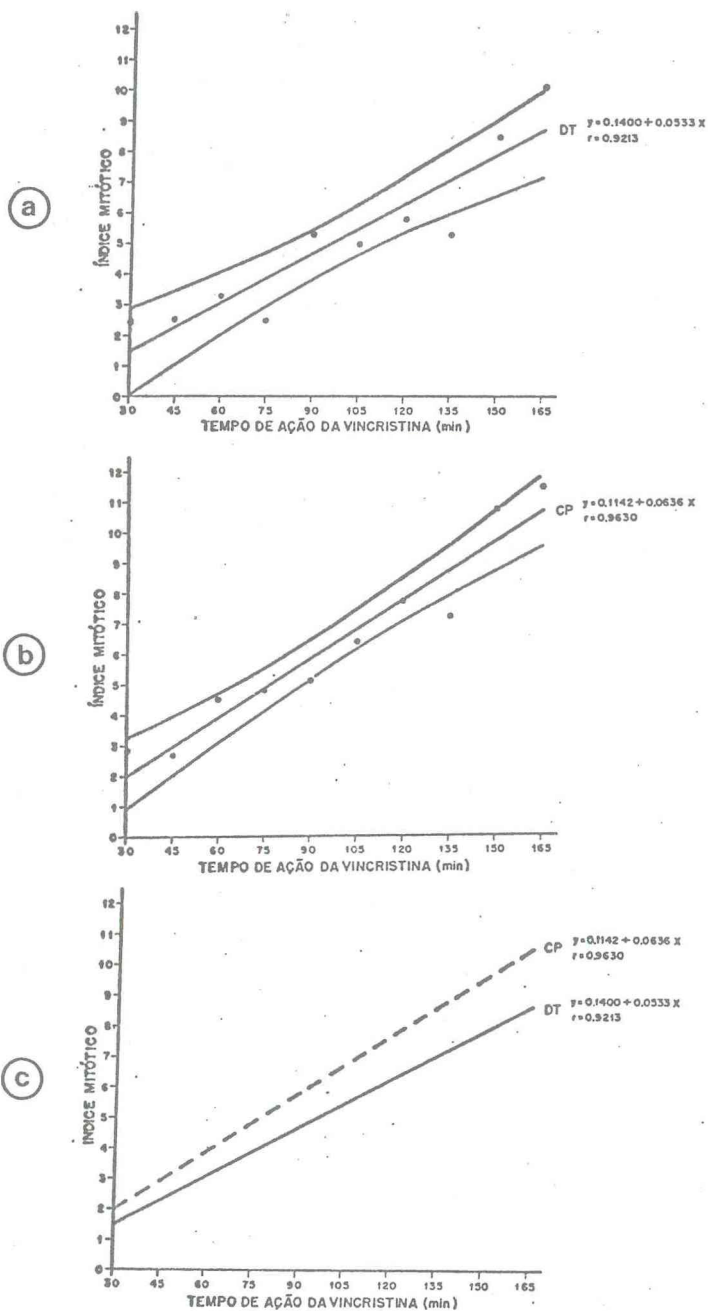


Figura 14: Índice mitótico acumulado na cripta do jejuno proximal de ratos: (a) grupo DT; (b) grupo CP; (c) grupos DT e CP. (Técnica de microdissecção).

4. DISCUSSÃO

O homem raramente apresenta um quadro clínico de deficiência nutricional específica; esta é quase sempre multicarenencial. Na desnutrição proteíco-calórica humana há carência de glicídios, lipídios, sais minerais e vitaminas, estando transtornada de diversos modos a digestão dos alimentos (Chaves, 1978). Em relação à tiamina foi verificado, em hospitais gerais, que a sua deficiência é difícil de ser isolada de outros déficits nutricionais (Leevy et al., 1965). Poucos experimentos sobre deficiência de vitamina B₁ têm sido realizados no ser humano. Brozek (1957), administrando a voluntários dieta cujo teor de tiamina estava 50% abaixo das necessidades mínimas notou alterações sensoriais, motoras, intelectivas e de personalidade quando os comparou com indivíduos controles que ingeriram dieta normal. Todavia estudos no homem são difíceis de serem controlados, sendo importantes os estudos em animais de laboratório.

No presente trabalho, o rato foi o animal escolhido pela facilidade com que reproduz o quadro clínico de deficiência de tiamina, além de ser de fácil manuseio e de baixo custo operacional (Kirsch et al., 1968 a; 1968 b; Edozien, 1968).

Na análise da ingestão de nutrientes e de água foi verificado que, no 13º dia do experimento, o grupo

DT/CP ingeriu menor quantidade de água do que o grupo AL ($p < 0,025$) e que esta diferença aumentou nos dias subsequentes, até a data do sacrifício dos animais; no 15º dia observou-se diferença na ingestão de dieta sólida entre os mesmos grupos (DT/CP < AL). Assim, a adipsia apareceu dois dias antes da anorexia nos animais deficientes em vitamina B₁. A adipsia é um sinal clínico muito raro no homem, sendo referida em algumas formas de dispepsia nervosa (Romeiro, 1968); tal alteração da sede não tem, ainda, explicação. Nos estudos sobre deficiência de vitamina B₁ não tem havido preocupação com o controle da ingestão hídrica dos animais.

O mecanismo patogênético da anorexia e da perda de peso corporal que acontecem no animal carente de tiamina ainda permanece sem explicação na literatura. Alguns pesquisadores tentaram explicar a anorexia como consequência da atonia gástrica (Grana, 1958), do aumento no tempo de esvaziamento gástrico (Veen, 1963), da diminuição da secreção gástrica (Hawk & Hundley, 1951), de alterações metabólicas no intestino delgado (Gubler, 1968), da diminuição da atividade da transcetolase na mucosa intestinal (Bai et al., 1971), do aparecimento da ataxia (Bitter et al., 1969; Brin, 1962; Bai et al., 1971).

Durante todo o período de observação e manuseio clínicos os animais permaneceram com bom aspecto geral. No 19º dia de experimento, quando os animais do grupo DT

apresentaram, definitivamente, menor peso corporal em relação aos do grupo CP e estando os mesmos no estágio clínico inicial da deficiência de tiamina, todos os animais foram sacrificados. A evolução ponderal dos animais desta experiência foi semelhante à relatada na literatura (Bai et al., 1971; Henderson et al., 1976; Plaitakis et al., 1982).

Foram utilizados dois métodos para os estudos morfométrico e de proliferação do epitélio do jejuno proximal: o método de inclusão em parafina, o mais antigo e o mais difundido (Bizzozero, 1888) e o método da microdissecção (Wimber & Lamerton, 1963).

A microdissecção apresenta uma importante vantagem em relação à inclusão em parafina; nela a cripta é "manuseada" como um todo, tridimensionalmente, sendo contadas todas as suas células (as mitóticas e as em interfase), não havendo, portanto, uma superestima do índice mitótico que, conseqüentemente, não precisa ser corrigido pela constante de Tannock (ver item 2.5.2.). Todavia os resultados obtidos com ambos os métodos foram concordes e complementares entre si. No presente trabalho a constante de Tannock foi estimada em 0,56; este valor está próximo dos relatados na literatura, como 0,57 (Tannock, 1967) e 0,62 (Wright, 1972 b).

O jejuno proximal foi escolhido para o presente estudo desde que quase todos os nutrientes e drogas são

absorvidos nesta porção intestinal (Truelove & Reynell, 1972); além disso é a região intestinal mais estudada no homem (Shiner, 1957; Rubin & Dobbins, 1965; Stanfield et al., 1965; Cook & Lee, 1966). Os resultados obtidos demonstraram graves alterações morfológicas (morfométricas) do epitélio do jejuno proximal nos animais alimentados com dieta sem tiamina.

As medidas lineares obtidas da cripta, da vilosidade, do enterócito do terço médio da vilosidade, como também as populações de células destes compartimentos foram menores no grupo DT em comparação com seu controle pareado CP ($p < 0,05$). Em outras palavras, a deficiência aguda de tiamina induziu marcada hipotrofia do epitélio do jejuno proximal quando os animais ainda estavam na fase inicial de perda de peso corporal. É provável que tais alterações epiteliais estejam associadas a uma menor absorção de nutrientes. Vários autores, utilizando diferentes modelos experimentais, demonstraram essa correlação (Leevy et al., 1965; Bollet & Owens, 1973; Prevost & Butterworth, 1974; Bistran et al., 1974; Bistran et al., 1976; Hill et al., 1977; Yates et al., 1977; Weinsier et al., 1979). Sabe-se que a hipotrofia do epitélio do intestino delgado, por si só, induz diminuição na absorção de nutrientes (Dowling, 1982). Stewart et al., (1967), estudando a esteatorréia idiopática humana, observaram correlação positiva entre a absorção de vitamina B₁₂ e a altura do enterócito do terço médio da vilosi

dade. Levine (1982) encontrou, também, correlação positiva entre a absorção de glicose e de galactose e o tamanho da vilosidade. Além disso, o efeito tóxico crônico direto do álcool, induz hipotrofia do epitélio do intestino delgado (Zucoloto, 1977; 1982; Zucoloto & Rossi 1979; Zucoloto et al., 1979) e altera a absorção de diversos nutrientes (Bode, 1980; Rossi et al., 1980). Além da hipotrofia do epitélio uma baixa ingestão de água (adipsia) implicaria numa menor diluição ou numa hiperosmolaridade dos alimentos ingeridos o que promoveria uma passagem de água e de eletrólitos para a luz intestinal, provocando uma perda maior desses elementos (Kaiser, 1976; Schultz, 1981). Por outro lado, a carência de tiamina leva a uma diminuição da motilidade gastrointestinal (Grana, 1958) acarretando, também, diminuição da absorção de nutrientes (Levine, 1982).

A relação número de criptas/vilosidade foi semelhante nos grupos DT e CP; é possível que essa não diferença decorra do fato do experimento ter sido agudo e/ou do fato dos animais terem sido sacrificados numa fase clínica inicial, não dando tempo para o eventual aparecimento de lesões a esse nível.

Para o estudo da proliferação celular intestinal utilizou-se um eficiente bloqueador metafásico, o sulfato de vincristina, com o qual se obtém uma correlação positiva entre o índice mitótico e o tempo de ação da droga (Tannock, 1967; Wright, 1980; 1982; 1984). Ou

tros bloqueadores mitóticos têm sido usados com o mesmo objetivo, como a colchicina (Leblond & Stevens, 1948) e o colcemid (Sawicki & Kieler, 1968).

O epitélio de revestimento da mucosa do intestino delgado apresenta uma das maiores taxas de renovação celular do organismo (Bertalanffy, 1960). As células são continuamente produzidas nas criptas e, a seguir, migram ao longo das vilosidades (Leblond & Stevens 1948; Bertalanffy, 1960; Lipkin, 1973; Wright, 1984). A taxa de produção celular da cripta representa um dos mais importantes parâmetros para os estudos de proliferação celular intestinal (Wright, 1980). A partir dos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que a taxa de produção celular da cripta dos animais do grupo DT não foi estatisticamente diferente da dos animais do grupo CP, a pesar de ter ocorrido hipotrofia do epitélio da vilosidade no grupo DT. A manutenção da taxa de produção celular na cripta dos animais do grupo DT pode ter, basicamente, duas explicações que podem ser independentes ou complementares entre si, a saber: uma, pelo tipo de nutrição do enterócito e, outra, pela sua diferenciação. O enterócito tem dois tipos de nutrição: um que é igual ao de todas as células do organismo, através da corrente sanguínea, via fluido intersticial, e outro que acontece durante a digestão, quando ele recebe considerável suprimento alimentar, chamado nutrição luminal (Levin, 1969); este último tem grande influência na renovação celular

dos enterócitos (Riecken e Menge, 1977; Williamson, 1978 a; 1978 b).

Por outro lado a deficiência de B_1 , per se, a carreta depressão da atividade de três enzimas - transcetolase, piruvato desidrogenase e alfa-cetoglutarato desidrogenase - que necessitam de tiamina (pirofosfato de tiamina - TPP) como coenzima. A diminuição da atividade da transcetolase induz decréscimo das sínteses de pentoses e de NADPH, essenciais para a produção de DNA (Henderson et al., 1973). A diminuição das atividades da piruvato desidrogenase e da alfa-cetoglutarato desidrogenase causam uma queda da produção de ATP pelo enterócito. Estas alterações bioquímicas poderiam contribuir para a hipotrofia da vilosidade, não alterando, no entanto, a taxa de produção celular da cripta no grupo DT (figura 15). O efeito lesivo ao enterócito, decorrente do decréscimo de atividade das enzimas citadas, é função do grau e da duração da carência de tiamina (Bai et al., 1971); diminuição de atividade enzimática acontece em outros órgãos como o coração, o fígado e o rim (Schenker et al., 1969; Schenker et al., 1971). Embora a atividade das supracitadas enzimas não tenha sido medida é lógico se pensar que a taxa de produção celular tenha relação direta com a síntese de DNA. Henderson et al. (1976) verificaram intensa diminuição na síntese de DNA no coração, fígado e rim na fase final (em torno do 28º dia) de deficiência aguda de tiamina, em ratos. Nesta fase

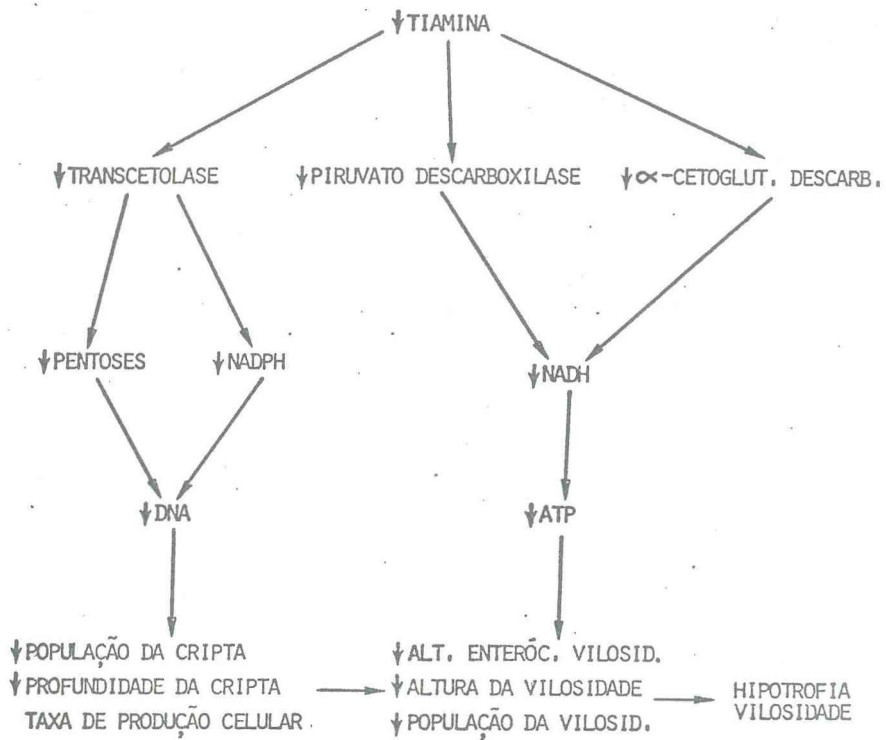


Figura 15: Conceito diagramático hipotético do mecanismo patogenético das alterações do epitélio do jejun proximal de ratos com deficiência aguda de tiamina.

avançada de deficiência de B_{12} , a diminuição de DNA pode ser secundária à somação de múltiplos fatores decorrentes de uma desnutrição multicarenal. No presente trabalho, essa anormalidade secundária não deve ter ocorrido, pois analisamos os animais deficientes numa fase em que começavam a perder peso, ou seja, num estágio clínico inicial; é pois provável, que os efeitos, então observados (19º dia) sejam devidos à deficiência aguda de tiamina, per se. Convém salientar que, na vigência de importantes alterações bioquímicas, como as antes referidas, a maturação do enterócito é defeituosa (Wright, 1984) e é provável que isto tenha ocorrido neste experimento; no entanto, aqui, não foi feita análise da maturação do referido epitélio. Há evidências de que mecanismos de retroalimentação atuem na renovação do epitélio do intestino delgado (Wright & Al-Nafussi, 1982) e de que a taxa de produção celular do compartimento proliferativo da cripta seja função do número de células maduras presentes na vilosidade (Wright, 1984). Isto está de acordo com a hipótese segundo a qual substâncias denominadas calonas controlariam a proliferação celular tecidual (Bullough, 1965), bloqueando a fase de síntese de DNA e/ou a fase mitótica (Thornley & Laurence, 1975).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Trinta ratos albinos Wistar machos, pesando em média 50 g, foram divididos em três grupos de 10: grupo DT - deficiente em tiamina que recebeu dieta, sem vitamina B₁, e água ad libitum; grupo CP - controle pareado que recebeu dieta sólida, com todos os nutrientes, e água nas mesmas quantidades que o grupo DT; grupo AL - controle ad libitum que recebeu dieta sólida, com todos os nutrientes, e água à vontade. De dois em dois dias os animais foram pesados e as quantidades de ingestão de dieta e de água foram anotadas. No 19º dia de experimento, quando houve, pela segunda vez consecutiva, diferença de peso corporal estatisticamente significante entre os grupos DT e CP, todos os animais foram sacrificados após terem sido injetados intraperitonealmente com sulfato de vincristina para estudo da proliferação celular. A altura do enterócito do terço médio da vilosidade, a altura da vilosidade, a profundidade da cripta e as populações celulares da vilosidade e da cripta, foram obtidas.

Os resultados mostraram que:

- 1º) Os animais do grupo DT desenvolveram adipsia a partir do 13º dia e anorexia a partir do 15º dia de experimento;
- 2º) Os animais do grupo DT começaram a ganhar, significamente, menos peso corporal em relação aos dos

grupos CP e AL, a partir do 17º dia de experimento;

3º) Dados morfométricos e de populações celulares das vilosidades e das criptas do grupo DT foram significativamente menores quando comparados com os do grupo CP;

4º) A relação número de criptas por vilosidade e a taxa de produção celular da cripta foram semelhantes entre os grupos DT e CP.

Em síntese, os ratos alimentados com dieta sem tiamina desenvolveram inicialmente adipsia, em seguida a norexia e finalmente perda de peso corporal. A adipsia e a hipotrofia do epitélio jejunal dos ratos deficientes poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, por um eventual distúrbio da absorção de nutrientes. Apesar da hipotrofia epitelial, a taxa de produção celular da cripta em animais deficientes foi mantida, provavelmente, devido à presença de células imaturas na vilosidade, à nutrição luminal e à produção adequada de DNA.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Thirty male Wistar rats weighing an average of 50 g were allocated into three groups of 10 animals: group DT - thiamine-deficient, was fed a thiamine-free diet and water ad libitum; group CP - pair-fed control, was pair-fed with group DT and received a diet with all nutrients and water; group AL - ad libitum control, was fed a diet with all nutrients and water ad libitum. They were weighed each two days and the consumption diet and water recorded. After 19 days on test (beginning of the body weight loss of group DT) the animals were sacrificed and small pieces of proximal jejunum were removed and prepared to study the epithelium through microdissection and parafin inclusion techniques. Before sacrifice the animals were administered vincristina sulphate i.p. to evaluate the crypt cell production rate. The height of the enterocyte from the middle one-third of villi, the depth of crypts, the length of villi and the cellular populations of crypts and villi were determined.

The results showed that:

1. The animals of the DT group showed adipsia from 13th day and anorexia from 15th day of the experiment period;

2. The animals of the DT group started significant body weight loss from 17th day of the

experiment group in comparison to CP and AL;

3. The height of the enterocytes from the middle one-third of villi, the depth of crypts, the length of villi and the cellular populations of crypts and villi from DT group were significantly decreased as compared to CP group;

4. The number of crypts/villus and the crypt cell production rate were similar when comparing DT and CP groups.

In summary, rats fed thiamine free diet developed initially adiposia followed by anorexia and finally body weight loss. The adiposia and the epithelial atrophy observed in deficient rats could be responsible, at least in part, for deficient absorption of nutrients commonly observed in thiamine deprivation. However, even with epithelial atrophy, the crypt cell production rate was maintained in thiamine deficient animals, probably due to the presence of immature villus cells, luminal nutrition and adequate DNA production.

7. REFERÊNCIAS

- Aherne, W.A.; Camplejohn, R.S. & Wright, N.A.: An introduction to cell population kinetics. Edward Arnold Ltd. Londres. P.8 (1977).
- Althausen, T.L.; Eiler, J.J. & Stockholm, M.: The effect of B vitamins on intestinal absorption and food utilization. Studies in rats on diets deficient in certain B vitamins and during recovery from such diets. Gastroenterology. 7 : 469 (1946).
- Appleton, D.; Morley, A.R. & Wright, N.A.: Cell proliferation in the castrate mouse seminal vesicle in response to testosterone proprionate. II. Theoretical observations. Cell. Tiss. Kinet. 6 : 247 (1973).
- Bai, P.; Bennion, M. & Gubler, C.J.: Biochemical factors involved in the anorexia of thiamine deficiency in rats. J. Nutr. 101 : 731 (1971).
- Baserga, R.: Biochemistry of the cell cycle: A review. Cell. Tiss. Kinet. 1 : 167 (1968).
- Baserga, R.: The cell cycle. New Engl. J. Med. 304 (8) : 453 (1981).
- Bertalanffy, F.D.: Mitotic rates and renewal times of the digestive tract epithelia in the rat. Acta. Anat. 40 : 130 (1960).

- Bistran, B.R.; Blackburn, G.L.; Hallowell, E. & Heddle, R.: Protein status of general surgical patients. J. Am. Med. Assoc. 230 : 858 (1974).
- Bistran, B.R.; Blackburn, G.L.; Vitale, J.; Cochran, D. & Naylor, J.: Prevalence of malnutrition in general medical patients. J. Am. Med. Assoc. 235 : 1567 (1976).
- Bitter, R.A.; Gubler, C.J. & Heninger, R.W.: Effects of forced feeding on blood levels of piruvate, glucocorticoids and glucose and on adrenal weight in thiamine deprived and thiamine antagonist treated rats. J. Nutr. 98 : 147 (1969).
- Bizzozero, G.: Ueber die regeneration der elemente der schlauchformigen drusen und des epithels des magendarmkanals. Anat. Anz. Ant. 3 : 781 (1888).
- Blackburn, G.L.: Hospital malnutrition - A diagnostic challenge. Arch. Intern. Med. 139 : 278 (1979).
- Bode, J.Ch.: Alcohol and the gastrointestinal tract. In: Advances in internal medicine and pediatrics. Eds: Frick, H.V.P.; Harnock, G.A.; Martini, G.A. & Prader, A.. Springer-Verlag. Berlin. P.31 (1980).
- Bollet, J.B. & Owens, S.: Evaluation of nutrition status of selected hospitalized patients. Amer. J. Clin. Nutr. 26 : 931 (1973).
- Brin, M.: Effects of thiamine deficiency and of

- oxithiamine on rat tissue transketolase. J. Nutr. 78 : 179 (1962).
- Brownlee, K.A.: Statistical theory and methodology in science and engineering. John Weley and Sons, Inc. New York. London. (1960).
- Brozek, J.: Psychologic effects of thiamine restriction and deprivation in normal young men. Amer. J. Clin. Nutr. 5 : 109 (1957).
- Bullough, W.S.: Mitotic and functional homeostasis. Cancer Res. 25 : 1683 (1965).
- Cairnie, A.B.; Lamerton, L.F. & Steel, G.G.: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. Experimental observations. Exp. Cell. Res. 39 : 528 (1965 a).
- Cairnie, A.B.; Lamerton, L.F. & Steel, G.G.: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. II. Theoretical aspects. Exp. Cell. Res. 39 : 539 (1965 b).
- Cameron, I.L. & Greulich, R.C.: Evidence for essentially constant duration of DNA syntesis in renewing epithelial of the adult mouse. J. Cell. Biol. 18 : 31 (1963).
- Chaves, N.: Desnutrição calórica-protéica. In: Nutrição básica e aplicada. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro P.280 (1978).

- Clarke, R.M.: Mucosal architecture and epithelium cell production rate in the small intestine of the albino rat. *J. Anat.* 107 : 519 (1970).
- Clarke, R.M.: Progress in measuring epithelium turnover on the villus in the small intestine. *Digestion.* 8 : 161 (1973).
- Cook, G.C. & Lee, F.D.: The jejunum after kwashiorkor. *Lancet.* 2 : 1263 (1966).
- Dowling, R.H.: Small bowell adaptation and its regulation. In: Basic science in gastroenterology. Structure of the gut. Glaxo Group Research Limited. Ware. Herts. U.K. P.369 (1982).
- Edozien, J.C.: Experimental kwashiokor and marasmus. *Nature.* 220 : 917 (1968).
- Gelfant, S.: Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle. *Exp. Cell. Res.* 26 : 395 (1962).
- Gelfant, S.: Patterns of epidermal cell division. *Exp. cell. Res.* 32 : 521 (1963).
- Goldberg, M.L. & Racker, R.: Formation and isolation of a glycolaldehyde phosphaketolase intermediate. *J. Biol.Chem.* 237 : 3841 (1962).
- Goldsmith, G.H.: The B vitamins: thiamine, riboflavin, niacin. In: Nutrition. Eds: Beaton, G.H. & McHenry, E.W.. Academic Press. New York. London. P.109 (1964).

- Grana, R.: Influenza della avitaminose B₁ alimentare e chimica sull'intestino di ratto. Arch. Fisiol. 58 : 86 (1958).
- Gubler, C.J.: Enzymes studies in thiamine deficiency. Int. J. Vit. Nutr. 38 : 287 (1968).
- Harper, H.A.: Carbohydrate metabolism in thiamine deficiency. J. Biol. Chem. 142 : 239 (1942).
- Hawk, E.A. & Hundley, J.M.: Effect of certain B vitamin deficiencies on gastric secretion in the rat. Proc. Exp. Biol. Med. 78 : 318 (1951).
- Henderson, G.I.; McCandless, D.W. & Schenker, S.: Intestinal metabolism in thiamine deficiency. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144 (2): 596 (1973).
- Henderson, G.I.; Dillon, M. & Schenker, S.: Effect of diet-induced thiamine deficiency on visceral DNA synthesis and tissue composition. Bioch. Pharm. 25 : 2275 (1976).
- Hill, G.L.; Pickford, I.; Young, G.A.; Schorah, C.J.; Blackett, R.L.; Burkinshaw, L.; Warren, J.U. & Morgan, D.B.: Malnutrition in surgical patients. An unrecognized problem. Lancet. 1 : 689 (1977).
- Horwitz, W.: Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. Washington, U.S.A. Tenth edition (1965).
- Howard, A. & Pelc, S.: Synthesis of deoxiribonucleic

acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (Suppl.)* 6 : 261 (1953).

- Jansen, B.C.P. & Donath, W.F.: Mededeel. Dienst. Volksgezondheid. Ned. Indie. 16 : 186 (1927) (Cit. in Sauberlich, 1967).
- Jelliffe, D.B.: Evaluation del estado de nutrition de la comunidade. Organizacion Mundial de la Salude (Série de Monografias). 53 : 291 (1968).
- Kalser, M.H.; Water and mineral transport. In: *Gastroenterology*. Ed.: Bockus, H. L.. W. B. Saunders Company. Philadelphia. London. Toronto. 2 : 79 (1976).
- Kirsh, R.E.; Saunders, S.J. & Brock, J.F.: Animal models and human protein caloric malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21 : 1225 (1968 a).
- Kirsch, R.E.; Block, J.F. & Saunders, S.J.: Experimental protein caloric malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21: 820 (1968 b).
- Lajtha, L.G.; Oliver, R. & Ellis, F.: Incorporation of ^{32}P and adenine ^{14}C into DNA by human bone marrow cells in vitro. *Brit. J. Cancer.* 8 : 367 (1954).
- Lajtha, L.G.: On the concept of the cell cycle. *J. Cell. Comp. Physiol. (Suppl. 1)* 62 : 43 (1963).
- Leevy, C.M.; Cardi, L.; Oscar, F.; Frank, D.; Gelline, R. & Backer, H.: Incidence and significance of

- hipovitaminemia in a randomly selected municipal hospital population. *Am. J. Clin. Nutr.* 17 : 259 (1965).
- Leblond, C.P. & Stevens, C.: The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *Anat. Rec.* 150 : 357 (1948).
- Levin, R.J. The effects of hormones on the absorption, metabolic and digestive functions of the small intestine. *J. Endocr.* 45 : 315 (1969).
- Levine, R.J.: Assessing small intestinal function in health and disease in vivo and in vitro. In: *Basic science in gastroenterology. Structure of the gut.* Glaxo Group Research Limited. Ware. Herts. U.K. P. 347 (1982).
- Lipkin, M.: Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells. *Physiol. Rev.* 53 : 891 (1973).
- Morley, A.R.; Wright, N.A. & Appleton, D.: Cell proliferation in the castrate mouse seminal vesicle in response to testosterone propionate. I. Experimental observations. *Cell Tiss. Kinet.* 6 : 239 (1973).
- Nakada, H.I. & Sund, L.P.: Glyoxylic acid oxidation by rat liver. *J. Biol. Chem.* 233 : 8 (1958).
- Plaitakis, A.; Hwang, E.C.; Van Woest, M.; Szilagui, P.

- I. A. & Berl, S.: Effect of thiamin deficiency on brain neurotransmitter systems. *Ann. Acad.* 378 : 367 (1982).
- Prescott, D.M.: Regulation of cell reproduction. *Cancer Res.* 38 : 1815 (1968).
- Prevost, E.A. & Butterworth, C.E.Jr.: Nutritional care of hospitalized patients. *Clin. Res.* 22:579 (1974).
- Quastler, H. & Sherman, F.G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell. Res.* 17 : 420 (1959).
- Riecken, E.O. & Menge, H.: Nutritive effects of food constituents and the structure and function of the intestine. *Acta Hepatogastroenterol.* 24 : 381 (1977).
- Romeiro, V.: *Semiologia médica*. Ed. Guanabara-Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2 : 464 (1968).
- Rossi, M.A.; Zucoloto, S. & Carillo, S.V.: Impairment of fat absorption induced by alcohol in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 50 : 315 (1980).
- Roulet, I.: *Methoden der pathologischen histologie*. Springer - Verlag. Wien (1948).
- Rubin, C.E. & Dobbins, W.O.: Peroral biopsy of the small intestine. *Gastroenterology.* 49 : 676 (1965).
- Sauberlich, H.E.: Biochemical alterations in thiamine deficiency; their interpretation. *Am. J. Clin. Nutr.* 20 : (6) 528 (1967).

- Sawicki, W. & Kieler, J.: The use of N-Deacetyl-N-methyl colchicine (colcemid) for the determination of the replication time of non-malignant and malignant cells cultured in vitro. Acta Path. et Microbiol. Scand. 72 : (1968).
- Schenker, S.; Qualls, R.M.; Butcher, R. & McCandless, D. W.: Regional renal adenosine triphosphate metabolism in thiamine deficiency. J. Nutr. 99 : 168 (1969).
- Schenker, S.; Chen, D.; Speeg, V.; Walker, C.O. & McCandless, D.W.: Hepatic metabolism and transport in thiamine deficiency. Amer. J. Dig. 16 : 255 (1971).
- Schultz, S.G.: Salt and water absorption by mammalian small intestine. In: Physiology of the gastrointestinal tract. Ed.: Johnson, L.R.. Raven Press. New York. 2 . 983 (1981).
- Schultze, B.; Haak, V.; Schmeer, A.C. & Maurer, W.: Autoradiographic investigation on the cell kinetics of crypt epithelium in the jejunum of the mouse. Cell Tiss. Kinet. 5 : 131 (1972).
- Shiner, M.: Duodenal jejunal biopsies. Gastroenterology. 33 : 64 (1957).
- Snedecor, G.W. & Cochran, W.G.: Statistical methods. The Iowa University Press. Iowa. U.S.A. Sixth edition (1973).
- Stanfield, J.P.; Hutt, M.S.R. & Tunnicliffe, R.:

- intestinal biopsy in kwashiorkor. *Lancet*. 11 : 519 (1965).
- Stewart, J.S.; Pollack, D.J.; Hoffbrand, A.V.; Mollin, D.L. & Booth, C.C.: A study of proximal and distal intestinal structure and absorptive function in idiopathic steatorrhoea. *Q.J. Med.* 143 : 425 (1967).
- Tannock, I.F.: A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. *Exp. Cell. Res.* 47 : 345 (1967).
- Thornley, A.L. & Laurence, E.: Chalone regulation of the epidermal cell cycle. *Experimentia*. 31 : 1024 (1975).
- Trasher, J.D. & Greulich, R.C.: The duodenal progenitor population. I. Age-related increase in the duration in the cryptal progenitor cycle. *J. Exp. Zool.* 159 : 39 (1965 a).
- Trasher, J.D. & Greulich, R.C.: The duodenal progenitor population. II. Age-related changes in size and distribution. *J. Exp. Zool.* 159 : 385 (1965 b).
- Truelove, S.C. & Reynell, P.C.: Small intestinal function and its assessment. In: *Disease of the digestive system*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. Edinburgh. Second edition. P. 271 (1972).
- Veen, M.J.: Anorexia and gastric emptying in thiamine deficient rats. *Can. J. Bioch. and Physiol.* 41 : 826 (1963).
- Walker, P.M.B. & Yates, H.B.: Nuclear components of

- dividing cells. Proc. Roy. Soc. B. 140 : 274 (1952).
- Weinsier, R.L.; Hunker, E.M.; Krumdieck, C.L. & Butterworth C.E.: Hospital malnutrition. A prospective evaluation of general medical patients during the course of hospitalization. Amer. J. Clin. Nutr. 32 : 418 (1979).
- Willard, M.D.; Gilsdorf, R.B. & Price, R.A.: Protein-caloric malnutrition in a community hospital. J. Am. Med. Assoc. 243 (17): 1720 (1980).
- Williams, M.A.: Quantitative methods in biology. Practical methods in electron microscopy. Ed.: Glauert, M.A.. North - Holland Publishing Company. Amsterdam. New York. Oxford. 6 : 35 (1981).
- Williams, R.R.: Toward the conquest of beriberi. Cambridge, Mass. Harvard Univer. Press (1936) (Cit. in Sauberlich, 1967).
- Williamson, R.C.N.: Intestinal adaptation. I. Structural, functional and cytokinetic aspects. New Engl. J. Med. 298 : 1393 (1978 a).
- Williamson, R.C.N.: Intestinal adaptation. II. mechanisms of control. New Engl. J. Med. 298 : 1393 (1978 b).
- Wimber, D.E. & Lamerton, L.F.: Cell population studies in the intestine of continuously irradiated rats. Radiat. Res. 18 : 137 (1963).

- Wright, N.A.; Morley, A.R. & Appleton, D.R.: The effect of testosterone on cell proliferation and differentiation in the small bowel. *J. Endocr.* 52 : 161 (1972 a).
- Wright, N.A.; Morley, A.R. & Appleton, D.R.: Variation in the duration of mitosis in the crypts of Lieberkühn of the rat; a cytokinetic study using vincristina. *Cell. Tiss. Kinet.* 5 : 351 (1972 b).
- Wright, N.A.: Cell proliferation in the normal gastrointestinal tract. Implications for proliferative responses. In: *Cell proliferation in the gastrointestinal tract*. Eds: Appleton, D.R.; Sunter, J.P. & Watson, A.J.. Pitman Medical. Bath. Great Britain (1980).
- Wright, N.A.: The experimental analysis of changes in proliferative and morphological status on studies on the intestine. In: *Basic science in gastroenterology. Structure of the gut*. Eds.: Polak, J.M.; Bloom, S.R.; Wright, N.A. & Daly, M.J.. Glaxo Group Research Limited. Ware. Herts. U.K., P.319 (1982).
- Wright, N.A. & Al-Nafussi, A.I.: The kinetics of villus cell populations in the mouse small intestine. II. *Cell. Tiss. Kinet.* 15 : 673 (1982).
- Wright, N.A.: Cell proliferation in health and disease. In: *Recent advances in histopathology*. Eds: Antony, P.P. & Macsween, R.N.M. Churchill. Livingstone.

- Edinburgh. London. Melbourne. New York, P.17 (1984).
- Yates, B.; Lopez, S.A. & Jackson, S.: Nutrition status of hospitalized patients. Clin. Res. 25 : 20 (1977).
- Zucoloto, S.: Efeitos da ingestão prolongada de álcool no intestino delgado de ratos bem nutridos. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P. (1977).
- Zucoloto, S. & Rossi, M.A.: Effect of chronic ethanol consumption on mucosal morphology and mitotic index in the rat small intestine. Digestion. 19 (5) : 277 (1979).
- Zucoloto, S.; Rossi, M.A. & Becker, P.F.L.: Efeito da ingestão prolongada do álcool no intestino delgado de ratos bem nutridos. Ciência e Cultura 31 (9) : 1023 (1979).
- Zucoloto, S.: Ruptura do mecanismo de controle da unidade cripta-vilosidade do epitélio do intestino delgado induzido pelo álcool em ratos alimentados com dieta sólida e em ratos alimentados com dieta líquida. Tese de Livre-Docência - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P. (1982).

