

• U



C •

FMUC

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# **PÂNCREAS E TECIDO ADIPOSE NA ADMINISTRAÇÃO EXPERIMENTAL DE VINHO**

PANCREAS AND ADIPOSE TISSUE IN EXPERIMENTAL BOARD OF WINE

Diana Sofia Alexandre Santos  
Mestrado Em Patologia Experimental  
**Coimbra, Outubro de 2016**



*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários a obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando Capela e Silva (Universidade de Évora) e supervisão do Doutor António Manuel Silvério Cabrita (Universidade de Coimbra).*





Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos Projectos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011, PEst-OE/AGR/UI0115/2014 e do Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo), Operação ALENT-07-0262-FEDER-001871/ Laboratório de Biotecnologia Aplicada e Tecnologias Agro-Ambientais.



## **Agradecimentos**

As minhas realizações pessoais são fruto de um considerável esforço individual, mas são imprescindíveis de contribuições, apoios, comentários ou críticas levando estes a um resultado digno de menção. Os responsáveis por esta ajuda são de referência para o resto da minha vida, deste modo mencionar aqui o nome dessas pessoas contribui um preito de justiça e uma homenagem sentida.

Os meus primeiros e profundos agradecimentos têm de ir para os meus Pais, irmão e ao 1º Cabo Guilherme Cruz, que com amor e carinho, me apoiaram nos momentos mais difíceis e contribuíram para a minha educação e para a minha formação. Não quero deixar de também mencionar o meu agradecimento aos meus amigos, colegas e familiares, em especial à Dra. Maria João Salsa, que estiveram sempre presentes ao longo deste projeto, quer pessoalmente ou por via telefónica, para me motivarem, aconselharem e auxiliarem em tudo o que precisava.

Expresso a minha sincera gratidão ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva, pela oportunidade que me deu de trabalhar e colaborar num projeto possibilitando – me a minha iniciação científica na área da investigação em animais de laboratório, levando à realização deste trabalho final. Á sua sempre pronta disponibilidade, aliada à grande capacidade de trabalho e de transmissão de conhecimentos, contribuindo sem dúvida para o meu enriquecimento e desenvolvimento teórico e prático em termos científicos, sendo decisivo para a realização desta tese.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita pela oportunidade concedida, pela confiança e pelo apoio ao longo de todo o curso de mestrado, assim como na co-orientação da presente dissertação. Agradeço também ao Senhor Professor as ideias e os preciosos ensinamentos que me iram sempre acompanhar.

À Professora Doutora Sandra Branco, responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, pela disponibilidade na utilização dos recursos deste laboratório, que fora essenciais para realização prática da dissertação.

À Eng<sup>a</sup> Luísa Fialho, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, o meu reconhecimento pela recetividade e por todo o apoio prestado no contexto laboratorial.

Ainda o meu sincero agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.



## Índice

<b>Abreviaturas</b>	XI
<b>Lista de Figuras</b>	XII
<b>Lista de Tabelas</b>	XIII
<b>Abstract</b>	XV
<b>Resumo</b>	XVII
<b>1. Introdução</b>	1
A Dieta Mediterrânea e o Consumo de Vinho	1
O Pâncreas	5
<b>2. Objectivos</b>	8
<b>3. Material e Métodos</b>	9
Animais	9
Histologia e Imuno-histoquímica	12
Análise estatística dos dados	16
<b>4. Resultados</b>	17
<b>5. Discussão</b>	24
<b>6. Conclusões</b>	28
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	30



## Abreviaturas

<b>µm</b>	Micrómetro
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>FELASA</b>	Federação Europeia das Associações de Ciências em Animais de Laboratório
<b>FMUC</b>	Faculdade De Medicina Da Universidade De Coimbra
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido De Hidrogénio
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>IP</b>	Via Intraperitoneal
<b>LEA II</b>	Laboratório De Experimentação Animal II
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OCDE</b>	Organização Para A Cooperação E Desenvolvimento Económico
<b>PBS</b>	Solução Tampão Salina
<b>PCNA</b>	Antigénio De Proliferação De Células Nucleares
<b>SPSS</b>	Software Sigmascan Pro 5.0
<b>UNESCO</b>	Organização Das Nações Unidas Para A Educação, Ciência E Cultura

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Pirâmide da Dieta Mediterrânea.....	2
<b>Figura 3.1</b> - A – Administração do vinho por via endogástrica (gavagem); B – pesagem dos animais com o auxílio da balança digital.....	12
<b>Figura 4.1</b> - Fotomicrografia do pâncreas de animal do grupo controlo (A) e animal do grupo experimental (B) .....	17
<b>Figura 4.2</b> - Fotomicrografia do pâncreas de animal do grupo das 28 semanas.....	18
<b>Figura 4.3</b> - Expressão da glucagina, evidenciada pela cor castanha.....	19
<b>Figura 4.4</b> - Expressão da insulina, evidenciada pela cor castanha.....	21
<b>Figura 4.5</b> - Expressão da insulina, evidenciada pela cor castanha, grupo III.....	22
<b>Figura 4.6</b> - Expressão do PCNA, evidenciada pela cor castanha.....	23



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 3.1</b> - Anticorpos utilizado nas marcações imuno-histoquímicas.....	15
<b>Tabela 4.1</b> - Áreas e perímetros dos ácinos pancreáticos dos ratos pertencentes aos três grupos analisados.....	17
<b>Tabela 4.2</b> - Áreas dos ilhéus pancreáticos e expressão relativa (%) da glucagina.....	19
<b>Tabela 4.3</b> - Áreas dos ilhéus pancreáticos e expressão relativa (%) da insulina.....	20
<b>Tabela 4.4</b> - Imunomarcção para PCNA (%) nos ilhéus e nos ácinos pancreáticos.....	22



## **Abstract**

Wine production in Portugal was assumed always as an extremely important sector of socio-cultural, economic and agricultural points of view, so the symbolism and consumption of this drink, by the Portuguese, it is sedimented in their way of life. The red wine has a constitution in high levels of phenolics, constituting one of the most important parameters of wines quality, since they contribute to its organoleptic characteristics, such as color, astringency, bitter taste and aroma. Moreover, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, the phenolic compounds are associated with several beneficial physiological effects derived from the moderate consumption of wine. However, alcohol consumption is a serious public health problem worldwide due to obvious physical and psychosocial problems caused by excessive use, even moderate. By this is considered a risk factor associated with over 200 diseases, including chronic pancreatitis.

The aim of this study was to evaluate, by histological and immunohistochemical methods, the effects of experimental administration of red wine in Wistar rats in histomorphometry pancreatic acini and insulin expression of glucagon and cell proliferation marker PCNA . The results demonstrated that chronic consumption of wine consumption caused the development of fibrotic process, acini hypertrophy and disruption of the architecture of the pancreatic islets without structural recovery after 20 weeks. For the expression of glucagon and insulin was observed a decrease and an increase, respectively, in animals that were administered the wine. The results of this study suggest that wine administration, at least during the period considered, changed the architecture of the pancreatic islets and the expression of insulin and glucagon, making suppose a direct effect on alpha and beta cells. Not knowing the alcohol content of wine, or the levels of the other constituents, it was not possible to know which of these were responsible for the observed changes.

**Keywords:** wine, exocrine pancreas, endocrine pancreas, islets, acini, insulin, glucagon, PCNA



## Resumo

A produção vinícola em Portugal assumiu-se sempre como um setor de extrema importância, dos pontos de vista sociocultural, económico e agrícola, pelo que o simbolismo e o consumo desta bebida, por parte dos portugueses, está enraizado no seu modo de vida. O vinho tinto possui na sua constituição níveis elevados de compostos fenólicos, constituindo um dos parâmetros de qualidade mais importantes dos vinhos, uma vez que contribuem para as suas características organolépticas, como a cor, a adstringência, sabor amargo e aroma. Por outro lado, e devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, os compostos fenólicos estão associados com vários efeitos fisiológicos benéficos derivados do consumo moderado de vinho. No entanto, o consumo de álcool é um grave problema de saúde pública em todo o mundo devido aos problemas físicos e psicossociais evidentes causados pelo seu uso excessivo, e mesmo moderado, sendo considerado um fator de risco associado a mais de 200 patologias, incluindo a pancreatite crónica

Pretende-se com o presente estudo avaliar, através de técnicas histológicas e imuno-histoquímicas, os efeitos da administração experimental de vinho tinto a ratos Wistar na histomorfometria dos ácinos pancreáticos e na expressão da insulina, da glucagina e do marcador de proliferação celular PCNA. Os resultados demonstraram que o consumo crónico de vinho provocou o desenvolvimento de processo fibrótico, a hipertrofia dos ácinos e a disrupção da arquitectura dos ilhéus pancreáticos, sem recuperação estrutural ao fim de 20 semanas. Quanto à expressão da glucagina e da insulina observou-se uma diminuição e um aumento, respectivamente, nos animais aos quais foi administrado o vinho. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a administração de vinho, pelo menos durante o período considerado, alterou a arquitectura dos ilhéus pancreáticos e a expressão da insulina e da glucagina, fazendo supor um efeito direto nas células alfa e beta. Não sabendo o teor alcoólico do vinho, nem os níveis dos seus outros constituintes, não foi possível saber quais destes foram responsáveis pelas alterações observadas.

**Palavras-chave:** vinho, pâncreas exócrino, pâncreas endócrino, ilhéus, ácinos, insulina, glucagina, PCNA



# 1. Introdução


## **A Dieta Mediterrânica e o Consumo de Vinho**

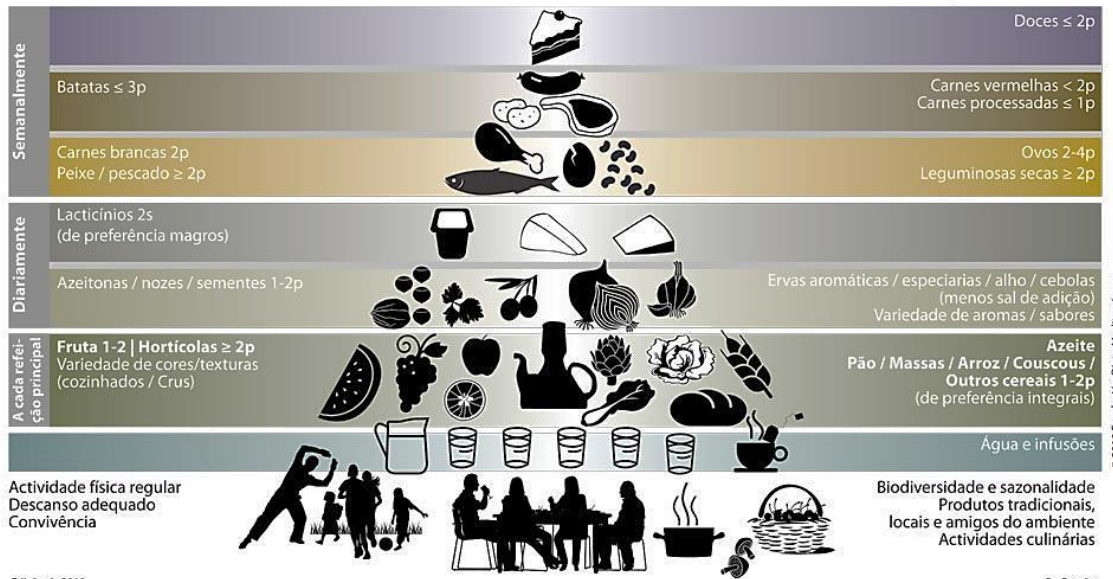
A dieta mediterrânica é considerada através de diversos estudos como a mais saudável e mais sustentável do mundo, estando associada a uma maior longevidade e à proteção contra diversas doenças, como cancro, cardiovasculares, hipertensão arterial, entre outras (Pinho *et al.*, 2015). Para além de um regime alimentar, e de um modo de vida, a dieta mediterrânica foi classificada como Património Imaterial da Humanidade pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura) em Baku, no Azerbaijão, em 4 de Dezembro de 2013.

A pirâmide da dieta mediterrânica (Fig.1.1) evidencia um estilo de vida saudável, que incorpora os hábitos alimentares, mas também a prática de atividade física diária, o descanso recomendado, a biodiversidade e a convivência interpessoal garantindo uma base essencial à sustentabilidade (Bach-Faig *et al.*, 2011; Burlingame e Dernini, 2011; Medina, 2011). Nesta dieta, os alimentos estão organizados pelas porções diárias recomendadas, estando na base os alimentos que auxiliam na proteção e regulação do organismo e, no topo, as porções dos alimentos que devem ser consumidos em menor quantidade e menos frequentemente (Bach-Faig *et al.*, 2011). A pirâmide funciona como um guia para uma escolha de um modo de vida saudável, devendo ser adaptada às necessidades específicas de determinados grupos sociais e etários. Em Portugal, devido ao clima e à geografia do país, a dieta mediterrânica encontra-se completamente sedimentada, embora se tenha verificado um decréscimo na adesão a este tipo de padrão alimentar em Portugal e em outros países mediterrânicos (Rodrigues *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2009). Os alimentos que a integram são produzidos no País, na maior parte dos casos localmente, os princípios da sazonalidade são sustentados, e a tradição nos modos alimentares é respeitada. As características e o enquadramento da dieta mediterrânica, ou do padrão alimentar mediterrânico, as razões para a sua promoção, do ponto de vista das tradições e cultura, da sua sustentabilidade e como modelo de saúde, encontram-se desenvolvidas de forma exaustiva no documento “*Padrão Alimentar Mediterrânico: Promotor de Saúde*” (Pinho *et al.*, 2015).

**A Pirâmide da Dieta Mediterrânica: um estilo de vida para os dias de hoje**  
 Recomendações para a população adulta

Porções de alimentos baseadas na frugalidade e nos hábitos locais

 Vinho em moderação e de acordo com as crenças sociais



© 2010 Fundación Dieta Mediterránea. O uso e promoção desta pirâmide é recomendado sem qualquer restrição.

Edição de 2010 P= Porção

**Figura 1.1** Pirâmide da Dieta Mediterrânica (Fundación Dieta Mediterránea; [http://dietamediterranea.com/piramidedm/piramide\\_PORTUGUES.pdf](http://dietamediterranea.com/piramidedm/piramide_PORTUGUES.pdf), consultado em Junho de 2016).

Ainda não é claro quais os componentes da dieta mediterrânica mais importantes para a promoção da saúde, mas o azeite, os alimentos de origem vegetal e o consumo moderado de vinho são prováveis candidatos (Trichopoulou e Critselis, 2004). Entre os 10 princípios da dieta mediterrânica em Portugal encontra-se o consumo baixo, a moderado, de vinho e apenas nas refeições principais (Bach-Faig *et al.*, 2011; Barros *et al.* 2013; Artero *et al.*, 2015). Deste modo, a produção vinícola em Portugal assumiu-se sempre como um setor de extrema importância, dos pontos de vista sociocultural, económico e agrícola, pelo que o simbolismo e o consumo desta bebida, por parte dos portugueses, está enraizado no seu modo de vida (Cardeiras, 2009). Este estilo de vida tornou-se essencial ao longo de séculos para a acentuada produção, transformação e comercialização vinícola (Balsa *et al.*, 2011). Em Portugal, a produção de vinho é bastante superior aos valores de consumo, tendo evoluído com o avanço de novas tecnologias. A nível da União Europeia, Portugal encontra-se abaixo da Itália, França e Espanha na produção vinícola, ficando em 4º lugar (Balsa *et al.*, 2011; Guedes, 2013).



Relativamente ao consumo de álcool *per capita* nos membros da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico), Portugal encontra-se em 9º lugar com maior consumo, embora tenha reduzido a quantidade consumida ao longo de 20 anos, de acordo com o relatório da OCDE sobre o consumo nocivo de álcool, e o seu impacto na saúde pública relativo ao período entre 1992 e 2012. Em 2012, o consumo de bebidas alcoólicas em Portugal rondou os 11 litros *per capita*, muito superior à média da OCDE (9.1%) (OECD, 2015). Quanto à avaliação dos padrões de consumo de álcool, tendo uma escala de 1, para o consumo associado às refeições, e 5, para o consumo nocivo em grandes quantidades ocasionalmente, Portugal encontra-se com o nível mais baixo, de 1. Ainda no mesmo relatório, salienta-se que Portugal é um dos países onde o vinho é a bebida mais consumida, seguindo-se a cerveja e as bebidas ditas espirituosas (OECD, 2015).

O vinho tinto possui na sua constituição níveis elevados de compostos fenólicos, que são provenientes da casca e das sementes das uvas (Baiano *et al.*, 2009; Lingua *et al.*, 2016). Os polifenóis das uvas vermelhas e do vinho tinto são principalmente flavonóides (antocianinas, flavonóis e flavonóides) e compostos não flavonóides (ácidos fenólicos, como estilbenos e ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico) (Monagas *et al.*, 2005; Giacosa *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos constituem um dos parâmetros de qualidade mais importantes dos vinhos, uma vez que contribuem para as suas características organolépticas, como a cor, a adstringência, sabor amargo e aroma (Monagas *et al.*, 2005).

Devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, os compostos fenólicos estão associados com vários efeitos fisiológicos benéficos derivados do consumo moderado de vinho (Monagas *et al.*, 2005; Rebelo *et al.*, 2014). Os polifenóis das uvas e do vinho, de que o resveratrol é, provavelmente, um dos principais agentes dos efeitos benéficos (Martín *et al.*, 2006; Garcia-Alonso *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2012), parecem prevenir o desenvolvimento de doenças através da modulação dos efeitos prejudiciais de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e o desenvolvimento de doenças relacionadas com stresse oxidativo (Giovinazzo e Grieco, 2015). Tem sido amplamente sugerido que a ingestão regular e moderada de vinho é capaz de aumentar a longevidade e diminuir o risco de doenças cardiovasculares (German e Walzem, 2000; Mezzano *et al.*, 2001; Cordova e Sumpio, 2009; Arranz *et al.*, 2012; Giacosa *et al.*, 2016) e pode estar

associada com um menor risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (Wannamethee *et al.*, 2003; Koppes *et al.*, 2005).

No entanto, o consumo de álcool é um grave problema de saúde pública em todo o mundo devido aos problemas físicos e psicossociais evidentes causados pelo seu uso excessivo, e mesmo moderado (Thakker, 1998; Standridge *et al.*, 2004; WHO, 2014), sendo considerado um fator de risco associado a mais de 200 patologias (WHO, 2014). O consumo de vinho faz aumentar a secreção gástrica, por acção dos ácidos málico e láctico (Liszt *et al.*, 2012) e dos compostos fenólicos amargos e adstringentes, podendo causar irritação da mucosa gástrica. Adicionalmente, e embora o epitélio gástrico seja intrinsecamente resistente aos efeitos prejudiciais do HCl (ácido clorídrico), o mesmo não acontece com o epitélio do esófago, pelo que o refluxo de ácido do estômago para o esófago, chamado de azia, pode causar dor e, em condições crónicas, levar a lesões do epitélio (Katz e Johnson, 2011). A ingestão elevada de álcool encontra-se relacionada com o desenvolvimento de determinados tipos de cancro (Shield *et al.*, 2014; Giacosa *et al.*, 2016), incluindo coloretal, mama, cavidade oral, faringe, laringe, fígado e esófago e, possivelmente, com risco elevado no estômago, pulmão, bexiga e pâncreas; com a cirrose hepática (Cao *et al.*, 2015); e com a pancreatite crónica (Ammann e Muellhaupt, 1994; Ammann, 2001).

Tendo em conta os efeitos favoráveis e desfavoráveis do álcool na saúde, são aconselhados como limites para o consumo de álcool, não exceder 30 g de etanol por dia (ou seja, cerca de dois copos de cerveja, vinho ou bebidas espirituosas) para homens, e 15 g (uma bebida) para mulheres (Giacosa *et al.*, 2012). No entanto, este é um assunto complexo e não existem ainda recomendações consistentes internacionalmente aceites (Furtwængler e de Visser, 2013). No Relatório da OCDE “*Tackling Harmful Alcohol Use: Economics and Public Health Policy*” aparecem, para Portugal, os valores de 12g, como a quantidade em gramas de álcool puro contido em uma bebida padrão, e como limites de consumo de risco (limite acima do qual a saúde das pessoas está em risco): Homens: > 2-3 bebidas/dia (24-36g), Mulheres: > 1-2 bebidas/dia (12-24 g).

## **O Pâncreas**

O pâncreas, um dos órgãos do aparelho digestivo, está localizado no abdómen e possui uma parte exócrina (97% da massa total) e outra endócrina (3% da massa total). A porção exócrina produz as enzimas digestivas (ou pancreáticas) necessárias para digerir os alimentos ingeridos, convertendo-os em nutrientes (Young *et al.*, 2006). A lipase e a  $\alpha$ -amilase são algumas das enzimas digestivas produzidas pela componente exócrina do pâncreas (Young *et al.*, 2006). A lipase pancreática interage com a bÍlis do fÍgado fazendo com que as moléculas de gordura sejam fragmentadas, de forma a poderem ser absorvidas e usadas pelo organismo. A  $\alpha$ -amilase ajuda a quebrar os carboidratos (amido e glicogénio) originando açúcares, que são mais facilmente absorvidos pelo organismo (Young *et al.* 2006). Desta forma, é essencial uma dieta equilibrada para a produção regular destas enzimas digestivas, levando ao bom funcionamento do organismo. Em casos de subnutrição tem sido observado que ocorre uma disfunção e alterações morfológicas do pâncreas exócrino (Pitchumoni, 1973; El-Hodhod *et al.*, 2005).

A componente endócrina, organizada em cordões de células de dimensão variada, é responsável pela secreção de várias hormonas. As células beta são as mais numerosas, constituindo 50-80% das células dos ilhéus em humanos e 60-80% em ratos, e secretam a insulina (reduz a taxa de açúcar no sangue). As células alfa compõem 20-40% e 10-20% do número total de células em humanos e ratos, respectivamente, e secretam a glucagina (aumenta a taxa de açúcar no sangue). As células delta correspondem a menos de 10% em humanos e 5% em ratos, respectivamente, e secretam a somatostatina (inibe o pâncreas endócrino); e as células PP, que constituem menos de 1% das ilhotas, secretam o polipeptídeo pancreático (inibe o pâncreas exócrino) (Reichert e Rustgi, 2011). Em estudos recentes, verificou-se que é difícil relacionar a arquitetura dos ilhéus com o tamanho do corpo, sendo que esta pode ser influenciada pela dieta ou pelos padrões circadianos. Em ratos e em humanos a arquitetura dos ilhéus depende também do tamanho dos mesmos, tendo os de menor diâmetro uma organização menos complexa que os de dimensões acima dos 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Wang *et al.* 2013; ver Kim *et al.*, 2009; Dolenšek *et al.*, 2015). Em ratos os ilhéus encontram-se principalmente na zona interlobular e nos humanos localizam-se regularmente nas

extremidades dos lóbulos, na zona intralobular, existindo diversas tentativas de explicação para esta situação (Saito et al., 1978).

No pâncreas várias são as patologias que podem ocorrer, sendo a pancreatite, de origem inflamatória, a doença mais comum neste órgão, podendo levar a alterações morfológicas irreversíveis ou mesmo à perda da função. Como anteriormente referido, o vinho tinto, um componente importante da dieta mediterrânica, quando consumido moderadamente pode ter um papel protector da saúde humana, mas quando consumido em excesso pode causar danos graves e irreversíveis. A cirrose hepática (Rehm *et al.*, 2010) e a pancreatite (tanto aguda como crónica; Irving *et al.*, 2009) são causalmente relacionadas com o consumo de álcool, sendo que níveis elevados de consumo criam um aumento exponencial de risco para o desenvolvimento destas patologias. O consumo excessivo de álcool é um factor de risco comum para a pancreatite aguda e crónica podendo danificar as células pancreáticas (Kristiansen *et al.*, 2008; Irving *et al.*, 2009; Apte *et al.*, 2010; Samokhvalov *et al.*, 2015), existindo relações dose-resposta diferenciadas entre o volume médio de consumo de álcool e o risco de diferentes tipos de pancreatite em homens e mulheres, (Samokhvalov *et al.*, 2015). Uma das características da pancreatite crónica é a destruição fibrótica progressiva do parênquima secretor (Apte *et al.*, 2011; Brock *et al.*, 2013).

Apesar dos vários estudos realizados a patogénese da pancreatite alcoólica não está ainda bem esclarecida (Lerch *et al.*, 2003; Chowdhury e Gupta, 2006). O álcool e os seus metabolitos podem produzir alterações na secreção exócrina através de vários mecanismos (Niebergall-Roth *et al.*, 1998), designadamente efeitos directos nas células acinares, promovendo uma activação enzimática intracelular prematura, predispondo a glândula para lesões auto-digestivas (Apte *et al.*, 2010). As lesões acinares incluem: (1) aumento do conteúdo glandular de enzimas digestivas, como resultado do aumento dos níveis de mRNA para estas enzimas; (2) aumento do teor glandular da enzima lisossómica catepsina B (conhecida por ser capaz de activar o tripsinogénio); (3) aumento da fragilidade dos lisossomas possivelmente mediada por ésteres de colesterol e ésteres etílicos de ácidos gordos; e (4) aumento da fragilidade dos grânulos de zimogénio (Apte *et al.*, 1994). Mutações do gene tripsinogénio catiónico e do inibidor da tripsina pancreática secretora (SPINK-1) têm sido implicadas na patogénese da pancreatite alcoólica (Gullo *et al.*, 2005), enquanto outros trabalhos sugerem alterações

funcionais mitocondriais e outras respostas do retículo endoplasmático (Criddle *et al.*, 2015). Alterações morfológicas e funcionais induzidas pelos componentes não-alcoólicos na componente exócrina do pâncreas, não estão ainda bem esclarecidas, sendo interessante a sua avaliação (Gerloff *et al.*, 2010).

Apesar de o consumo moderado de álcool ser associado com uma diminuição nas concentrações de insulina no plasma, relativamente poucos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito do álcool sobre a sensibilidade à insulina, particularmente em indivíduos não diabéticos, resistentes à insulina. Zilkens *et al.* (2003) observaram que uma redução substancial no consumo de álcool em homens saudáveis não alterou a sensibilidade à insulina. Os dados de Kim *et al.* (2009) demonstraram que 8 semanas de consumo moderado de álcool tiveram um impacto mínimo sobre a sensibilidade à insulina em indivíduos não diabéticos, resistentes à insulina. Os resultados de Avogaro *et al.* (2004) sugerem que o consumo agudo de álcool melhora a acção da insulina, sem afectar a secreção das células- $\beta$ , o que pode ser devido, em parte, ao efeito inibitório do álcool sobre a lipólise. Relativamente à componente endócrina estão estudados alguns efeitos do resveratrol, polifenol constituinte do vinho, nas células beta e na secreção da insulina (Palsamy *et al.*, 2010; Ku *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2014).

Dados clínicos e experimentais recentes evidenciam uma associação clara entre a flora bacteriana do tracto gastro-intestinal, e os produtos bacterianos (tais como endotoxinas), e as complicações derivadas da pancreatite, e os resultados de estudos em modelos animais reforçam o conceito de que as endotoxinas bacterianas são um factor importante na iniciação e na progressão da pancreatite alcoólica (Vonlaufen *et al.*, 2014).

## **2. Objetivos**

Com base nos fundamentos descritos, pretende-se avaliar os efeitos da administração de vinho tinto no pâncreas de ratos Wistar machos, com 4 semanas, através da análise histopatológica do pâncreas e da imuno-histoquímica com anticorpos primários contra a insulina, a glucagina e o PCNA.

### **3. Material e Métodos**

O presente estudo foi realizado em colaboração com o Serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo sido autorizado pela Comissão de Ética competente tal como previsto na alínea b) do nº49 da Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro e seguiu todas as normas vigentes de bem-estar animal. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas nas condições ambientais e de manutenção determinadas pela legislação em vigor na União Europeia, relativa à experimentação animal (FELASA, <http://www.felasa.eu>) e em Portugal (Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro). A metodologia do estudo experimental que originou este trabalho está descrita abaixo, particularmente as condições de manutenção dos animais, as suas características, o modo de administração do vinho, o método de necrópsia e da recolha e processamento dos tecidos.

#### **Animais**

No presente trabalho foram usados 30 animais saudáveis da espécie *Rattus norvegicus albinus* da estirpe Wistar, machos com a idade de 8 semanas, provenientes do biotério Charles-River, Barcelona, Espanha e, posteriormente transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal II (LEA II), no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra do Pólo I. Todos os animais foram submetidos a um período de quarentena de sete dias, a fim de aclimatizar e de excluir qualquer tipo de patologia, garantindo o seu estado de saúde. No LEA II, os animais ficaram em condições de manutenção e manipulação padrão de experimentação animal.

A manutenção e alojamento dos animais foram realizados de acordo com as condições padronizadas de climatização e controladas permanentemente pelos técnicos qualificados do biotério, pela monitorização e registo das condições diárias, mantendo os valores de intervalo recomendados, isto é, temperatura de 20°C a 24°C, humidade relativa de 45% a 65% e a luminosidade em ciclos de 12h de luz e 12h de escuro. Estas condições permitem garantir a comparabilidade, a reprodutibilidade, a possibilidade de

efectuar generalizações e, conseqüentemente, possibilitar a validação científica da investigação experimental.

Os animais foram alojados de modo aleatório em grupos de dois, em gaiolas retangulares, transparentes de policarbonato tipo III, de dimensões padronizadas para ratos, dispostas em estantes. Estas são gaiolas leves, de fácil limpeza e auto-claváveis, possuem tampas de arame de aço galvanizado com espaçamento de 7 mm, possuindo uma superfície plana e uma superfície mais baixa com inclinação de 45° e uma divisória interna amovível para colocar a ração e o bebedouro. As gaiolas são compostas por tampas filtrantes ou micro isoladoras para manter um microambiente adequado.

Utilizou-se corola de milho como material de cama, que tinha como função a da absorção da urina e da água derramada do bebedouro, proporcionando um ambiente confortável no período estabelecido entre as trocas. Dentro da gaiola foi colocado papel e rolo de papel como enriquecimento ambiental, permitindo ao animal brincar, escavar e esconder-se, manifestando tanto quanto possível o seu comportamento normal como seria em condições naturais.

As gaiolas foram limpas, higienizadas e autoclavadas três vezes por semana, para que os animais se mantivessem limpos e secos, e para que a concentração de poluentes (ex. amoníaco) fosse mantida em níveis que não irritassem as mucosas dos animais. Durante a limpeza das gaiolas a ração, a água e o substrato da cama eram removidos e substituídos por materiais frescos.

Os animais foram sustentados e alimentados com água e ração comercial peletizada de manutenção para ratos (Referência 4 RF21) oferecida *ad libitum* por meio de bebedouro e comedouro, respectivamente, suspensos na tampa de arame da gaiola. A ração e a água foram confirmadas diariamente de forma a permitir que os animais tivessem sempre água e ração disponíveis. A água foi tratada com ácido clorídrico (HCl) diluído para se obter um pH entre 2.5 e 3.2, evitando-se o crescimento bacteriano.

As gaiolas foram todas identificadas com uma placa de cartão plastificado, onde se encontravam as informações do código da experiência, número da gaiola, grupo, número de animais na gaiola, espécie, estirpe, data de nascimento, data de entrada, data



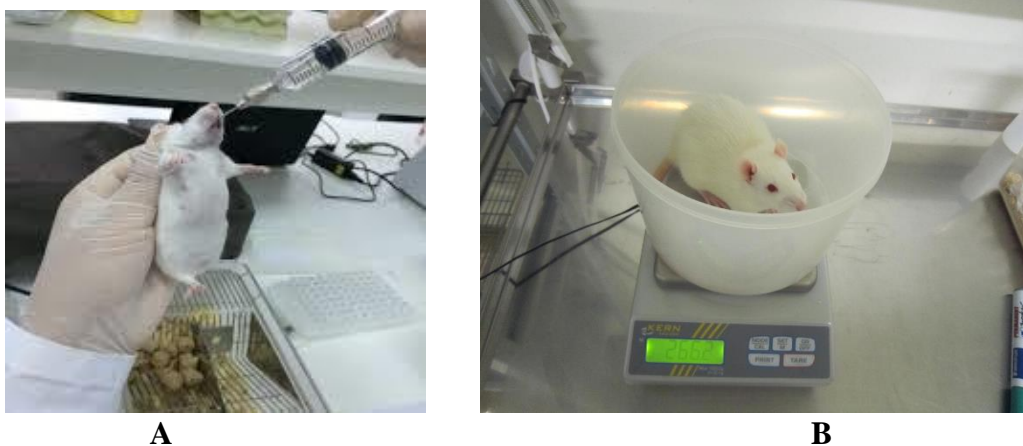
de saída e do utilizador. Já os animais foram identificados por marcação na cauda, através de uma marca individual temporária (traço na base da cauda), realizada com uma caneta de tinta não tóxica.

Os animais foram examinados, diariamente, quanto ao seu estado de saúde e bem-estar e quanto a eventuais alterações patológicas ao longo da experiência, de modo a reduzir a gravidade e duração da dor e do sofrimento aplicado, sendo que todos os animais que pudessem chegar a fronteiras humanamente aceitáveis, “*humane endpoints*”, isto é, expostos a sofrimento extremo que não era possível ser aliviado, fossem sacrificados antes do término do estudo.

Foram constituídos três grupos experimentais, aleatoriamente, com 10 animais. O grupo I correspondeu ao grupo controlo, composto por animais mantidos sem qualquer manipulação experimental. Estes foram observados diariamente e pesados semanalmente. O sacrifício e necrópsia foram efetuados às 28 semanas (n=10). O grupo II corresponde ao primeiro grupo teste, composto por animais submetidos durante o período experimental à administração de 1 ml de vinho tinto por via endogástrica (gavagem), 5 vezes por semana, durante 8 semanas, e foram ainda observados e pesados três vezes por semana. O sacrifício foi realizado às 8 semanas (n=10). O grupo III corresponde ao segundo grupo teste, composto por animais submetidos durante o período experimental à administração de 1 ml de vinho tinto por via endogástrica (gavagem), 5 vezes por dia, durante 8 semanas. Ao fim das 8 semanas mantiveram-se sem qualquer manipulação experimental. Os animais foram ainda observados e pesados três vezes por semana. O sacrifício foi realizado às 28 semanas (n=10).

Para a administração do vinho foi necessária a contenção do animal, devido ao procedimento ser realizado quando os ratos estavam conscientes e não anestesiados, garantindo-se, deste modo, a ingestão devido aos reflexos de deglutição. A contenção realizou-se com a mão: o indicador e o dedo médio são posicionados em ambos os lados atrás da mandíbula e os dedos do polegar, anelar e mínimo são colocados ao redor do tórax. O dedo polegar desliza-se para a frente dos membros anteriores, limitando os movimentos com a cabeça. O dedo mínimo foi usado para imobilizar um membro posterior juntamente com a cauda. A administração do vinho foi realizada através de sondas metálicas endogástricas rígidas com ponta arredondada acopladas a uma seringa

de 1 ml. A sonda foi introduzida na cavidade oral, através do diastema e usando o reflexo da ingestão, a sonda foi passivamente inserida. O conteúdo do seringa foi administrado lentamente, sendo todas as administrações assinaladas na folha de registo de cada um dos animais do Serviço de Patologia Experimental.



**Figura 3.1** A – Administração do vinho por via endogástrica (gavagem); B – pesagem dos animais com o auxílio da balança digital

### **Histologia e Imuno-histoquímica**

No final do procedimento experimental, os animais foram eutanasiados e necropsiados. A eutanásia é um procedimento rápido sem *stress*, sofrimento, dor e sem que o animal tenha consciência do processo. Esta leva à rápida perda de consciência, paragem respiratória e cardíaca e perda da função cerebral, com o fim de ser considerada uma morte humanamente aceitável. Este método obedeceu aos critérios da espécie animal em causa, do tamanho, da idade, e do número de animais a serem sacrificados, tendo ainda em conta o protocolo experimental e as condições técnicas existentes no Serviço de Patologia Experimental, isto é, a disponibilidade de recursos e a perícia e segurança do operador. O método escolhido para a realização da eutanásia deverá garantir sempre o bem-estar do animal e a segurança do operador.

Para realizar a eutanásia preparou-se uma solução anestésica de 12 ml com cetamina (Ketalar® 500mg/ml, Pfizer) e cloropromazina (Largatil® IV 50mg/2ml, Laboratórios Vitória), tendo sido administrado 0.1 ml por 100 g de peso vivo de rato, por via intraperitoneal. A sobredosagem anestésica seguida do deslocamento cervical foi o método utilizado para a eutanásia, confirmando-se que a morte do animal ocorreu. Esta

certificação é realizada com a permanente cessação dos batimentos cardíacos e da circulação, perda de cor nas membranas mucosas, ausência de reflexos da córnea ou palpebrais e confirmação do *rigor mortis*. Este método tem como vantagem a velocidade da absorção ser elevada, ser de fácil execução e utilização, constituindo uma alternativa à via intravenosa em animais de pequeno porte.

Após ter sido executada a eutanásia, todos os animais foram necropsiados, numa sala própria com segurança biológica e sem a presença de outros animais. A necrópsia consiste num exame pós-morte a qualquer espécie animal, tendo como objectivo a obtenção de informação e a recolha de órgãos ou tecidos para fins científicos.

Durante a necropsia foram vários os pré-requisitos a cumprir, desde o material a usar, à identificação do material e a execução da própria necrópsia. O operador usou como material de protecção bata, máscara, touca e luvas, tendo sido realizado um procedimento individual para cada animal com a devida planificação, programação e preparação prévia, para que todas as tarefas da necropsia fossem realizadas em sequência, tentando, assim, minimizar a existência de falhas que pudessem comprometer a investigação. Em cada necrópsia montou-se a mesa de necrópsia composta por material de registo (fichas de registo de números de necrópsia no Serviço de Patologia Experimental, ficha de necrópsia, ficha de blocos histológicos), material de acondicionamento e reagentes (cassetes histológicas, tubos de Eppendorf para acondicionamento a -20°C, contentor com formol tamponado a 10% e contentor com soro fisiológico, contentor de azoto líquido, contentor para lixo biológico – materiais cortantes e para materiais não cortantes), material de apoio à necrópsia (placa fria, placa para efectuar os cortes, alfinetes, elásticos, balança de precisão, régua (15 cm), fita métrica, craveira digital, compressas e algodão) e material para dissecação (tesoura recta de 18 cm, tesoura recta de 16 cm, tesoura Metz, pinça de dissecação recta de 14 cm, pinça comum, cabo de bisturi nº4 com lâmina descartável e alicate para crânio).

Após a pesagem do animal sacrificado procedeu-se à observação do hábito externo, avaliando a condição corporal (caquexia, magreza ou excesso de peso), a condição do pêlo, da pele (alopecia, aumento da densidade do pêlo ou presença de feridas) e unhas, o tecido subcutâneo e mamário por palpação (tumores), as mucosas e orifícios naturais do corpo (feridas, secreções no pavilhão auricular, narinas, ânus e genitais).

Após os procedimentos anteriormente referidos, o pâncreas foi removido e fixado em formaldeído neutro a 10%, tamponado (pH 7.4), durante 24 horas.

A inclusão dos fragmentos em blocos de parafina foi executada após processamento automático (processador automático de tecidos do Serviço de Patologia Experimental; Shadon Citadel 1000), através da passagem dos fragmentos para um molde rectangular metálico que continha parafina fundida. Após a sua solidificação na placa de frio periférica, foi desenformada e deu origem ao bloco de parafina com o material incluído, tendo sido armazenado à temperatura ambiente.

Estes blocos foram dispostos no micrótomo para efectuar cortes histológicos seriados com a espessura mínima de 3 µm, após o que foram colocados em banho-maria de água morna para serem estendidos e transferidos para uma lâmina de vidro de 75×25mm. Esta foi identificada com lápis de carvão com o nº de registo de cada animal e, depois, colocada numa estufa a 60°C para retirar o excesso de parafina e melhorar a adesão do corte à lâmina.

No final os cortes foram corados através das técnicas da Hematoxilina & Eosina (H&E) e Tricrómico de Masson [Masson Trichrome Stain Kit (Methyl Blue), Atom Scientific Cod. RRSK20].

As secções do pâncreas exócrino foram observadas através de microscopia fotónica com um microscópio equipado com máquina fotográfica digital. Para cada animal obtiveram-se 10 fotomicrografias com a ampliação de 250X, de áreas exócrinas escolhidas aleatoriamente. As áreas e os perímetros de, pelo menos, 100 ácidos foram medidos através do *software* SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA), em cada animal. Apenas as estruturas histológicas cujos limites estivessem claramente definidos foram consideradas na medição.

A imuno-histoquímica foi efectuada pelo método da Streptavidina-biotina-peroxidase utilizando os anticorpos primários contra o PCNA, a insulina e a glucagina, de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** Anticorpos utilizado nas marcações imuno-histoquímicas

<b>Anticorpo</b>	<b>Referência</b>	<b>Diluição</b>	<b>Incubação</b>
PCNA <sup>1,2,*</sup>	PC10, mouse monoclonal, MS-106	1:100	<i>Overnight</i> , 4°C
Insulina <sup>3,4</sup>	Insulin B (N-20), goat polyclonal, sc-7838	1:50	2h, temp. ambiente
Glucagina <sup>3,4</sup>	Glucagon (C-18), goat polyclonal, sc-7779	1:50	2h, temp. ambiente

<sup>1</sup>Thermo Scientific, LAB-SA Detection System Kit, ref. TP-015-HD; <sup>2</sup>Thermo Scientific;

<sup>3</sup>ImmunoCruz goat LSAB Staining System, ref. SC-2053; <sup>4</sup>Santa Cruz Biotechnology.

\*Controlo positivo: intestino delgado de Hamster.

Secções de 5 µm de espessura, dos mesmos blocos da análise histológica, foram estendidas em lâminas de vidro de 75x25 mm, tratadas com polilisina, desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em graduações decrescentes de álcool até água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol (1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%, para 9 partes de metanol absoluto), durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*; pH 7,4), três vezes por dois minutos. Antes da incubação com o anticorpo primário, os cortes foram pré-tratados para recuperação antigénica, em solução tampão citrato (pH 6,0), a 98°C durante 20 minutos, após o que foram arrefecidos, durante 20 minutos, à temperatura ambiente e lavados em PBS, três vezes por dois minutos. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com a solução de bloqueio durante 5 min à temperatura ambiente, após o que foram incubados, em câmara húmida com o respectivo anticorpo primário. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com anticorpo secundário biotilado durante 15 minutos, em câmara húmida à temperatura ambiente. Logo a seguir foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase durante 15 minutos em câmara húmida à temperatura ambiente, sendo lavados novamente em PBS, três vezes por dois minutos, e submetidos à revelação com o cromogénio castanho [DAB, Diaminobenzidina], durante 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, posteriormente lavados em água corrente, durante 1-2 minutos, e desidratados em graduações de álcool, clarificados em xilol e montados com Entellan (Merck, n.º. 107961). Para a interpretação dos resultados foi incubada secção adjacente como controlo negativo, sem o anticorpo primário.

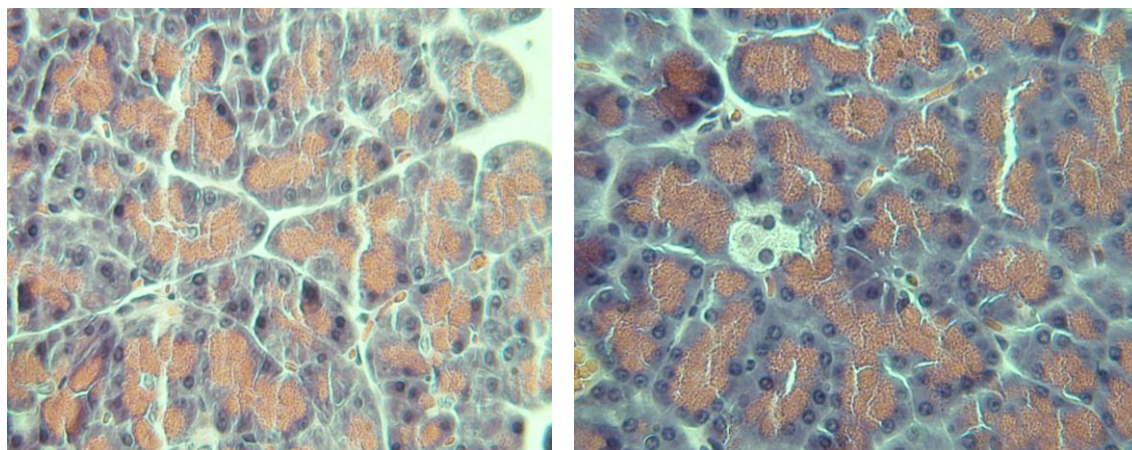
Relativamente à expressão dos marcadores em estudo, as lâminas examinaram-se em microscópio fotónico equipado com máquina fotográfica digital, com uma ampliação de 100X. No caso da insulina e da glucagina, para cada animal obtiveram-se 10-20 fotomicrografias dos ilhéus presentes e foram calculados os perímetros e as áreas totais e da imunomarcção, evidenciada pela cor castanha, através do *software* SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA). Com os valores das áreas foram calculadas os ratios correspondentes às células beta e células alfa, respectivamente. No caso do PCNA, para cada animal obtiveram-se 10-20 fotomicrografias dos ilhéus presentes, e de 50 ácinos, e foram calculados o número total de células e de células positivas, evidenciadas pela cor castanha, através do *software* SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA). Com estes valores foram calculadas os correspondentes ratios.

### **Análise estatística dos dados**

Todos os dados histomorfométricos foram analisados estatisticamente. A normalidade e homocedasticidade foram testadas através dos métodos de Kolmogorov-Smirnov e Levene. No nosso caso, não se verificaram os pressupostos portanto efectuaram-se testes não paramétricos Kruskal-Wallis, para avaliar a existência de diferenças entre os grupos no que diz respeito aos perímetros e áreas acinares. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ . Toda a análise estatística foi efectuada com recurso ao *software* SPSS.

## 4. RESULTADOS

Relativamente à componente exócrina do pâncreas observou-se o desenvolvimento de fibrose, em níveis de gravidade diferenciado, nos animais aos quais foi administrado vinho (Figs. 4.1 e 4.2).



**Figura 4.1** – Fotomicrografia do pâncreas de animal do grupo controlo (A) e animal de grupo experimental (B), em áreas em que não se observam alterações histopatológicas aparentes [H&E, 250X].

Na tabela 4.1 podem ser observados os valores das áreas e dos perímetros acinares dos animais dos 3 grupos.

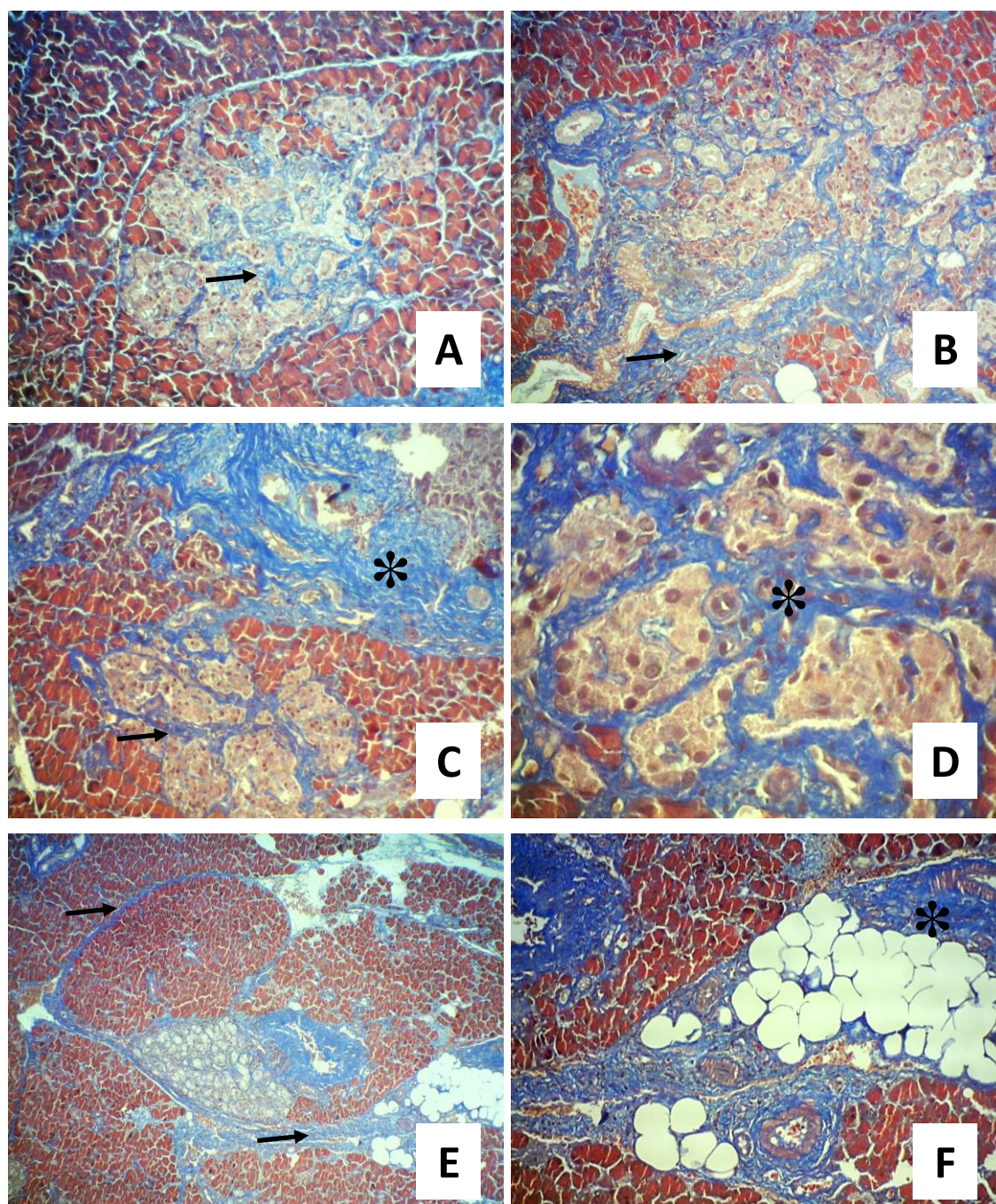
**Tabela 4.1.** Áreas (pixéis<sup>2</sup>) e perímetros (pixéis) dos ácinos pancreáticos dos ratos pertencentes aos três grupos analisados (média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Grupo</b>	<b>Área dos ácinos</b>	<b>Perímetro dos ácinos</b>
Grupo I (n =600)	14793,9 $\pm$ 8339,4 <sup>a</sup>	519,5 $\pm$ 172,6 <sup>a</sup>
Grupo II (n =900)	18716,5 $\pm$ 9844,1 <sup>b</sup>	585,4 $\pm$ 178,4 <sup>b</sup>
Grupo III (n =1199)	26780,2 $\pm$ 22601,8 <sup>c</sup>	662,9 $\pm$ 253,2 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna afectados por letras diferentes em índice superior diferem significativamente para  $P < 0,05$ .

De acordo com estes resultados foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos três grupos estudados, relativamente à área e ao perímetro dos ácinos pancreáticos.





**Figura 4.2** Fotomicrografias do pâncreas dos animais do grupo das 28 semanas, onde é possível observar fibrose (setas e \*) distribuída nas áreas interlobulares (B, C, E, F), em alguns casos com aparência lobular (E), e nos ilhéus pancreáticos (A, C, D) [E: 40x; A, B, C, F: 100x; D: 400x; Tricrômico de Masson].

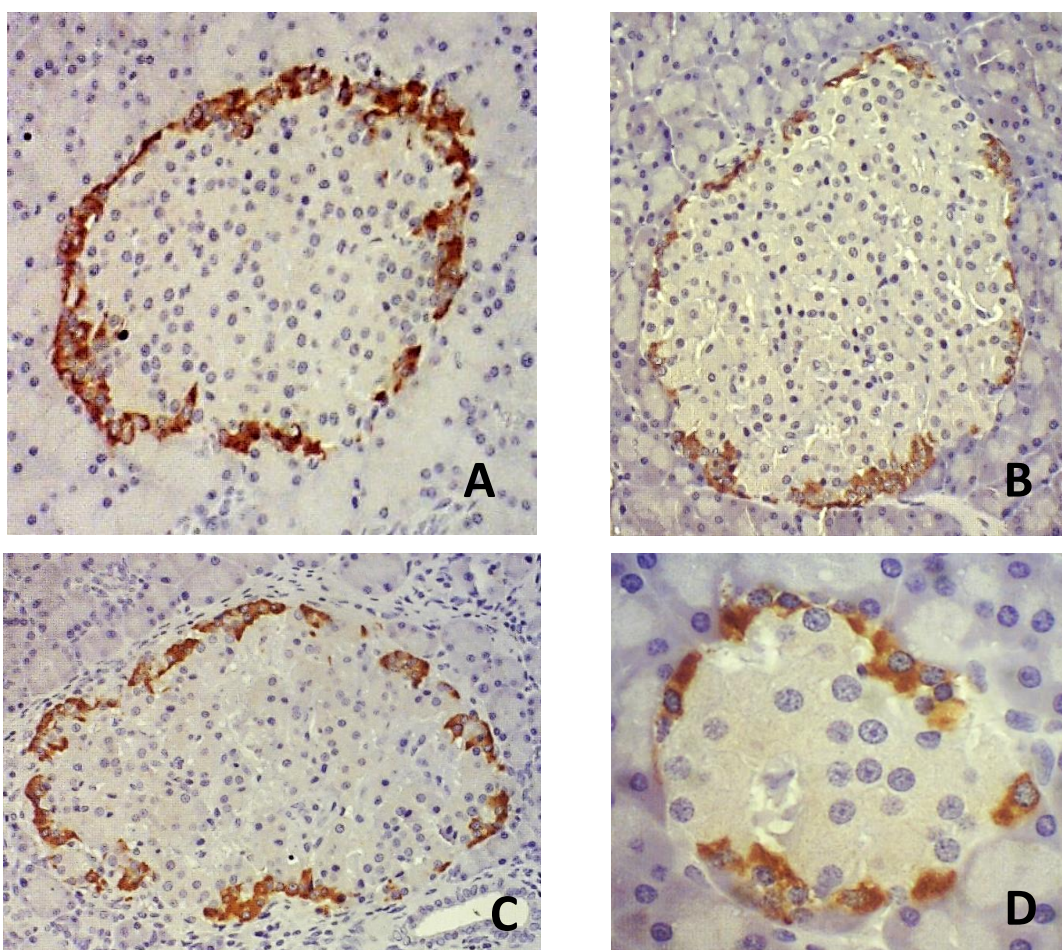
Na tabela 4.2 podem ser observados os valores das áreas dos ilhéus pancreáticos e da expressão relativa da glucagina (Fig. 4.3) nos ratos pertencentes aos três grupos analisados.



**Tabela 4.2** Áreas (pixéis<sup>2</sup>) dos ilhéus pancreáticos e expressão relativa (%) da glucagina nos ratos pertencentes aos três grupos analisados (média ± desvio padrão)

<b>Grupo</b>	<b>Área do ilhéu</b>	<b>Ratio</b>
Grupo I (n = 47)	86479,8 ± 70593,4	14,4 ± 8,8 <sup>a</sup>
Grupo II (n = 72)	105504,4 ± 68942,9	11,4 ± 7,2 <sup>b</sup>
Grupo III (n = 43)	96683,9 ± 78286,8	10,4 ± 7,6 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna afectados por letras diferentes em índice superior diferem significativamente para  $P < 0,05$ .



**Figura 4.3** Expressão da glucagina, evidenciada pela cor castanha. É possível observar a distribuição das células alfa na periferia dos ilhéus notando-se uma continuidade nos animais do grupo controlo (A), relativamente aos animais dos grupos das 8 semanas (B) e 28 semanas (C e D). [A, B, C 100x; D, 400x; contracoloração com hematoxilina de Meyer].

De acordo com estes resultados foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos três grupos estudados, relativamente à expressão da glucagina.

Na tabela 4.3 podem ser observados os valores das áreas dos ilhéus pancreáticos e da expressão relativa da insulina (Figs. 4.4 e 4.5) nos ratos pertencentes aos três grupos analisados.

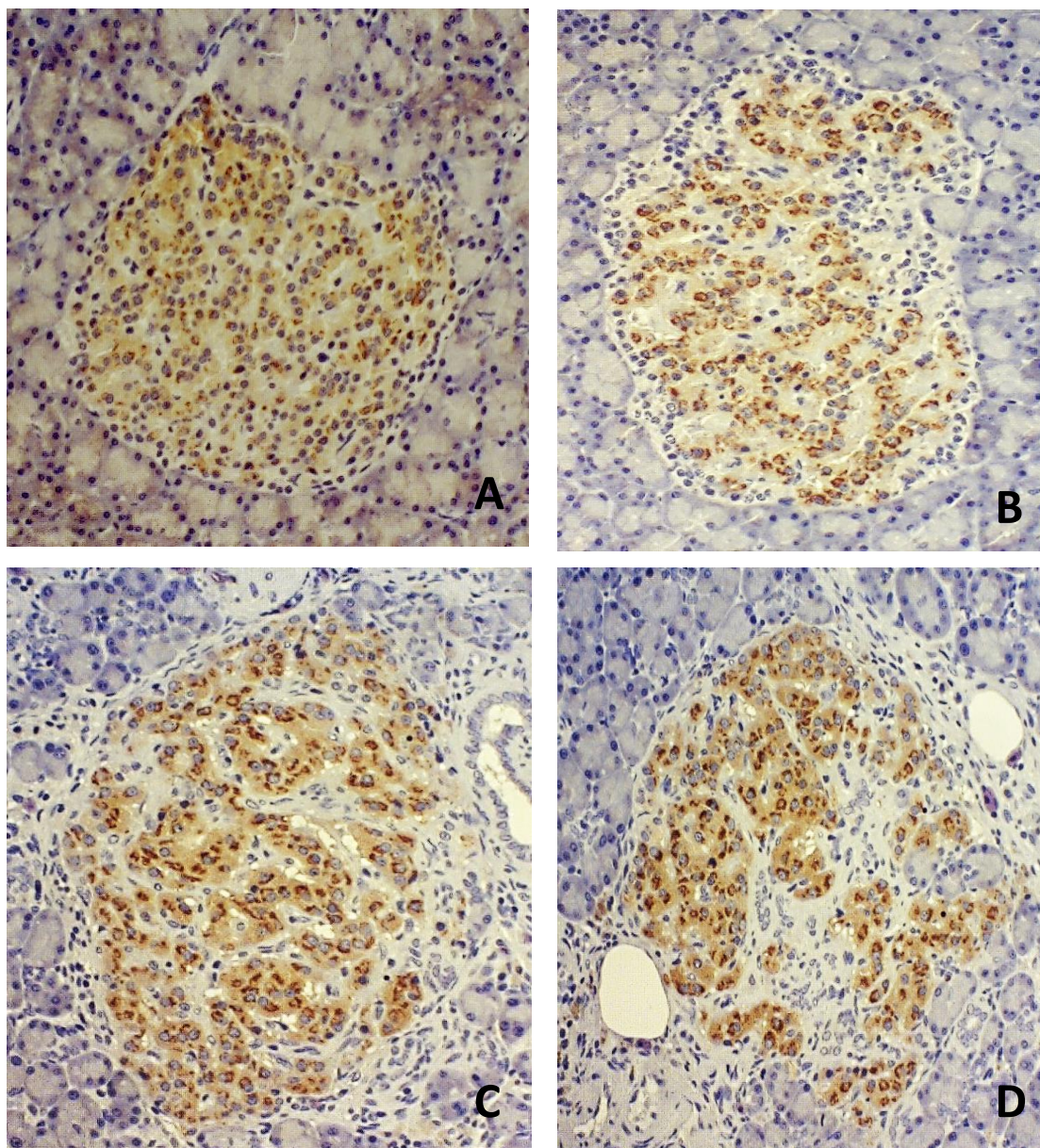
**Tabela 4.3** Áreas (pixéis<sup>2</sup>) dos ilhéus pancreáticos e expressão relativa (%) da insulina nos ratos pertencentes aos três grupos analisados (média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Grupo</b>	<b>Área do ilhéu</b>	<b>Ratio</b>
Grupo I (n =02)	74852,9 $\pm$ 53623,5 <sup>a</sup>	53,0 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>
Grupo II (n =20)	38109,3 $\pm$ 21754,4 <sup>b</sup>	63,1 $\pm$ 12,6 <sup>b</sup>
Grupo III (n =20)	65042,9 $\pm$ 55199,3 <sup>a</sup>	67,1 $\pm$ 12,6 <sup>b</sup>

Valores na mesma coluna afectados por letras diferentes em índice superior diferem significativamente para  $P < 0,05$ .

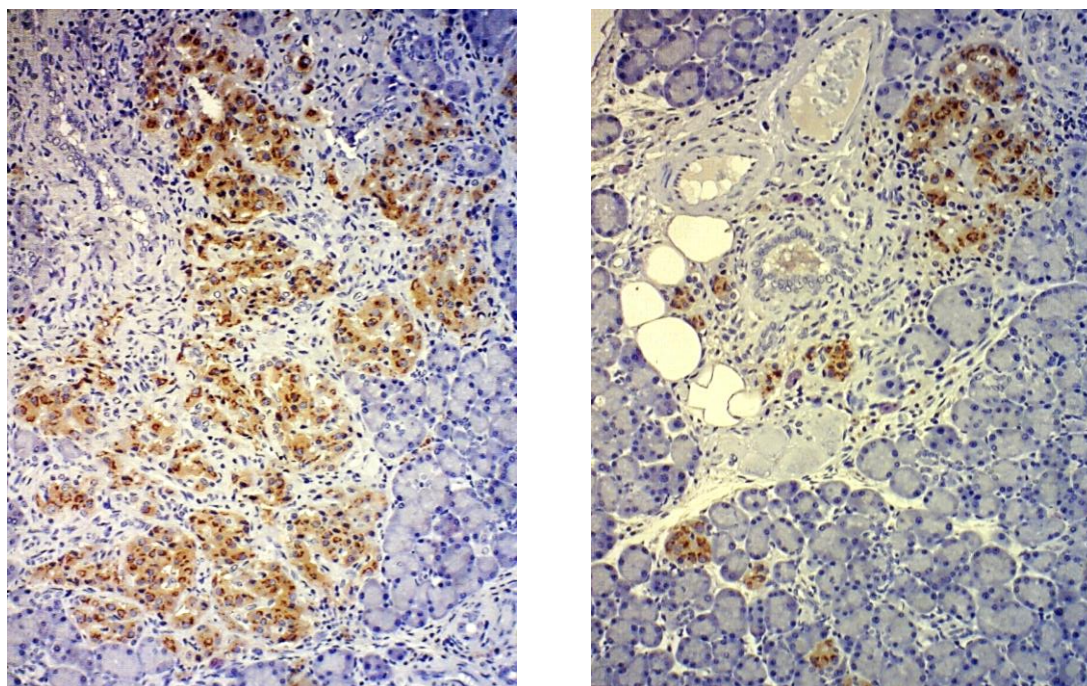
De acordo com estes resultados foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os animais do grupo controlo e os dos outros dois grupos estudados, relativamente à expressão da insulina.





**Figura 4.4** Expressão da insulina, evidenciada pela cor castanha. É possível observar a distribuição das células beta ocupando a maior parte dos ilhéus nos animais do grupo controlo (A), das 8 semanas (B) e das 28 semanas (C, D). É possível observar uma aparente disrupção na arquitectura dos ilhéus, mais evidente nos animais do grupo das 28 semanas (C e D) [100x; contracoloração com hematoxilina de Meyer].





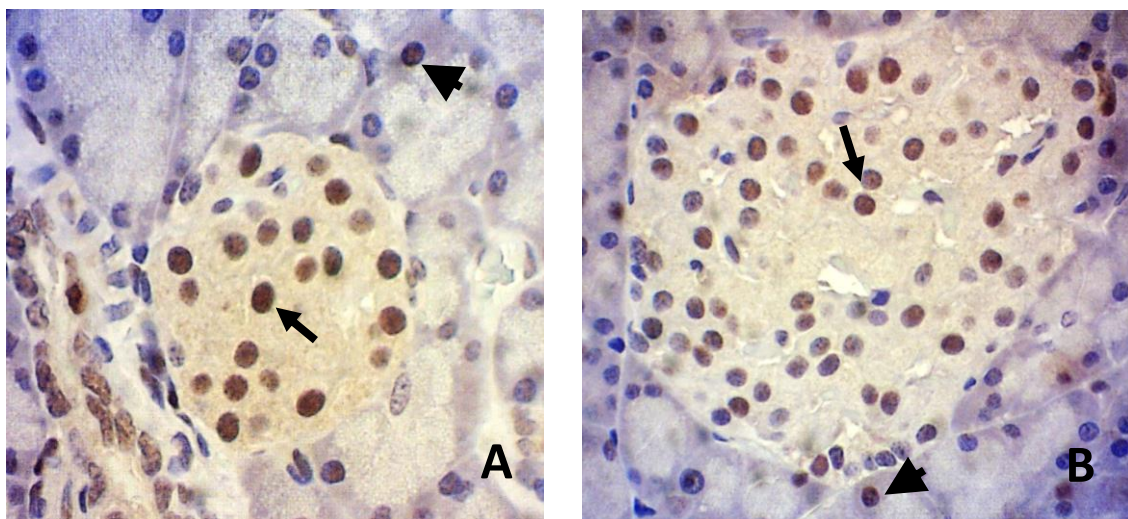
**Figura 4.5** Expressão da insulina, evidenciada pela cor castanha. Estas imagens são de um rato do grupo das 28 semanas, sendo possível observar uma aparente dispersão das células positivas para a insulina, com disrupção na arquitectura dos ilhéus [100x; contracoloração com hematoxilina de Meyer].

Na tabela 4.4 podem ser observados os valores dos ratios correspondentes às células positivas (Fig. 4.6) nos ratos pertencentes aos três grupos analisados, utilizando o PCNA como marcador de proliferação.

**Tabela 4.4** Imunomarcção para PCNA (%) nos ilhéus e nos ácidos pancreáticos (média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Grupo</b>	<b>Ilhéus</b>	<b>Ácidos</b>
Grupo I	33,1 $\pm$ 11,3 <sup>a</sup>	14,5 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>
Grupo II	10,1 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
Grupo III	21,8 $\pm$ 9,4 <sup>c</sup>	8,7 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna afectados por letras diferentes em índice superior diferem significativamente para  $P < 0,05$ .



**Figura 4.6** Expressão do PCNA, evidenciada pela cor castanha. É possível observar células endócrinas (seta) e exócrinas (cabeça de seta) positivas, exemplificadas com seções de pâncreas de animal do grupo controlo (A) e das 28 semanas (B). [400x; contracoloração com hematoxilina de Meyer].

De acordo com estes resultados foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os animais do grupo controlo e os dos outros dois grupos estudados, relativamente à expressão do PCNA, nos ilhéus e nos ácinos pancreáticos.

## 5. DISCUSSÃO

A pancreatite é a doença mais comum no pâncreas, é de origem inflamatória e pode levar a alterações morfológicas irreversíveis ou mesmo à perda da função. O consumo crónico de vinho, e em quantidades excessivas, pode danificar as células pancreáticas, causando pancreatite (Kristiansen *et al.*, 2008; Apte *et al.*, 2010). O álcool e os seus metabolitos podem produzir alterações na secreção exócrina através de vários mecanismos (Niebergall-Roth *et al.*, 1998), designadamente efeitos diretos nas células acinares, promovendo uma activação enzimática intracelular prematura, predispondo a glândula para lesões auto-digestivas (Apte *et al.*, 2010). Uma das características da pancreatite crónica é a destruição fibrótica progressiva do parênquima secretor (Apte *et al.*, 2011; Brock *et al.*, 2013).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a administração de vinho nas doses experimentais utilizadas causou pancreatite crónica, evidenciada pela destruição do parênquima do pâncreas e também na morfologia dos ilhéus, não tendo sido recuperada a sua arquitectura normal ao fim de 28 semanas, após ter terminado a ingestão de vinho (20 semanas de recuperação). A pancreatite crónica é caracterizada pela destruição do parênquima pancreático, por infiltrados de células inflamatórias e fibrose irregular, acompanhada por funções endócrinas e exócrinas insuficientes, sendo que cerca de 70% dos casos de pancreatite crónica são causados pelo abuso de álcool (Shimizu, 2008). Para além da coloração do Tricrómico de Masson teria sido interessante ter analisado a expressão imuno-histoquímica da actina para músculo liso para evidenciar eventuais diferenças entre grupos quanto à presença de células pancreáticas estreladas (Suda *et al.*, 2000; Detlefsen *et al.*, 2006; He *et al.*, 2009). As células estreladas pancreáticas são células similares a miofibroblastos, com forma estrelada, que podem mudar de um estado quiescente a um estado activado. Tal como acontece no fígado a produção e síntese do tecido conjuntivo é atribuído a estas células as quais, quando activadas por citocinas, são transformadas em miofibroblastos (ver Klöppel *et al.*, 2004), localizando-se em redor dos ácinos (nos espaços periacinares), nas regiões perivasculares e periductais (Omari *et al.*, 2007). Quando se activam migram para o lugar onde se produziu dano no tecido, e participam nas actividades da sua reparação, secretando componentes da matriz extracelular como colagénio de tipo I e III, fibronectina e

laminina (Omari *et al.*, 2007). Uma vez que no processo fibrinogénico na pancreatite crónica alcoólica a activação das células estreladas pode envolver a libertação de TGF $\beta$  pelas células acinares danificadas (Haber *et al.*, 1999), e as citocinas parecem igualmente activar macrófagos (Detlefsen *et al.*, 2006), seria interessante estudar a expressão destes marcadores nas condições experimentais deste trabalho. De referir ainda que o padrão difuso e interlobular, com uma aparência lobular, observado no presente trabalho foi igualmente referido por outros autores (Suda *et al.*, 2000). No entanto, o fato de que apenas uma minoria (< 10%) dos consumidores de bebidas alcoólicas desenvolve pancreatite alcoólica (Chowdhury e Gupta, 2006), e que o etanol por si só pode não induzir inflamação pancreática em modelos animais (Schneider *et al.*, 2002), fez com que se tenham investigado possíveis cofatores do desenvolvimento de pancreatite crónica, designadamente dieta, tipo de bebida alcoólica consumida, padrão de ingestão, intolerância a lípidos, factores hereditários (Apte *et al.*, 2005; 2008). No caso do presente trabalho algumas das diferenças encontradas dentro dos grupos experimentais, no que diz respeito à gravidade das lesões, podem dever-se à predisposição individual e à componente genética, uma vez que as outras estavam padronizadas.

Ao nível morfológico os resultados do presente trabalho sugerem uma hipertrofia dos ácinos em resposta à ingestão de vinho. Com efeito, a alteração morfológica mais significativa foi um aumento na área e no perímetro dos ácinos pancreáticos dos ratos que ingeriram vinho quando comparados com os ratos controlo o que pode ter sido uma consequência da obstrução dos ductos em consequência do desenvolvimento do processo fibrótico. Uma vez que a hipersecreção de enzimas pancreáticas tem sido observada em alcoólicos crónicos a impressão geral é que o etanol estimula a secreção pancreática basal (Niebergall-Roth *et al.*, 1998; Kono *et al.*, 2001), o que pode ser feito através da hipertrofia e/ou da hiperplasia das estruturas acinares (Siegmond *et al.*, 1994).

No presente trabalho foram também observadas alterações na forma dos ilhéus nos animais que ingeriram vinho, quando comparados com os ilhéus mais arredondados, de estrutura normal, dos animais do grupo controlo. O consumo moderado de álcool parece estar associado com uma diminuição nas concentrações de insulina no plasma. Os resultados de Avogaro *et al.* (2004) sugerem que o consumo agudo de álcool melhora a

acção da insulina, sem afectar a secreção das células- $\beta$ , o que pode ser devido, em parte, ao efeito inibitório do álcool sobre a lipólise. No presente trabalho através da expressão imuno-histoquímica foi observada uma maior expressão das células beta nos animais que ingeriram vinho, o que não quer dizer que se tenha traduzido nos níveis de insulina, pelo que se sugere, em trabalhos futuros o doseamento sérico desta hormona, para condições similares às do presente trabalho. Kokavec e Halloran (2010) observaram um decréscimo significativo nos níveis de insulina sérica nos indivíduos (humanos) que consumiram vinho fora das refeições. No entanto, os mesmos autores referem um decréscimo significativo nos níveis de glucose post-prandial, e ausência de alterações significativas nos níveis séricos de insulina quando o vinho foi ingerido após a refeição (Kokavec e Halloran, 2011). Este dado, para além de não permitir especular acerca dos nossos resultados, uma vez que os animais foram alimentados *ad libitum*, enfatiza a importância, e como já referido, do papel de possíveis cofatores no desenvolvimento de pancreatite crónica, designadamente a dieta, o tipo de bebida alcoólica consumida e o padrão de ingestão (Kokavec e Crowe, 2003; Kokavec e Halloran, 2010, 2011). DE assinalar que vários estudos analisaram os efeitos do resveratrol, polifenol constituinte do vinho, nas células beta e na secreção da insulina. Os resultados de Palsamy *et al.* (2010a) demonstraram que o resveratrol apresenta um significativo potencial antidiabético atenuando a hiperglicemia, aumentando a secreção de insulina e a competência antioxidante em células beta pancreáticas de ratos diabéticos, enquanto que, e de acordo com Ku *et al* (2012), esse efeito benéfico poderá estar associado a diminuição da apoptose das células beta.

Quanto à expressão da glucagina, os resultados obtidos confirmam as dúvidas ainda existentes quanto à resposta desta hormona à administração de álcool. Esta resposta tem sido descrita de forma inconsistente, em parte, e muito provavelmente, devido aos efeitos da hipoglicemia e da hiperinsunilemia nas células alfa não serem atribuídos de forma diferenciada ao álcool e aos seus metabolitos (Aagaard *et al.*, 2004). Tiengo *et al.* (1981) não observaram alterações significativas na secreção de insulina e de glucagina por acção do álcool e seus metabolitos enquanto Kolaczynski *et al.* (1988) observaram uma diminuição nos níveis de glucagina, por efeito do álcool durante uma situação de hipoglicemia em indivíduos normais, enquanto em indivíduos com diabetes de tipo 2, Rasmussen *et al* (2001) registaram que o consumo de álcool fez diminuir o pico de glucagina. As diferenças de expressão da glucagina observadas nas condições do



presente trabalho poderão estar associadas a uma alteração da arquitectura do ilhéu sem a correspondente alteração na sua produção.

Quanto à expressão do marcador de proliferação os resultados do presente trabalho vão em sentido contrário aos obtidos por Wiśniewska *et al.* (2013) que verificaram um aumento na expressão de PCNA nas células pancreáticas de animais que ingeriram etanol. Estas diferenças podem ser devidas a eventuais efeitos benéficos dos diferentes componentes do vinho, como referido por Ding e Adrien (2002) relativamente aos efeitos antiproliferativos do resveratrol.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a administração de vinho, pelo menos durante o período considerado, alterou a arquitectura dos ilhéus pancreáticos e a expressão da insulina e da glucagina, fazendo supor um efeito direto nas células alfa e beta. Não sabendo o teor alcoólico do vinho, nem os níveis dos seus outros constituintes, não foi possível saber quais os responsáveis pelas alterações observadas.

Relativamente à componente endócrina estão estudados alguns efeitos do resveratrol nas células beta e na secreção da insulina. Contudo, alterações morfológicas e funcionais induzidas pelos componentes não-alcoólicas na componente exócrina do pâncreas merecem ser avaliadas em trabalhos futuros.

Nesse sentido em ensaios futuros seria interessante e importante dosear estas hormonas no sangue e avaliar expressão de outros marcadores associados ao desenvolvimento de fibrose designadamente actina, colagénio de tipo I e III, fibronectina, laminina e macrófagos.

Em trabalho futuro e para a constituição dos grupos experimentais sugerimos a utilização de animais repartidos segundo o sexo e a idade, e em condições alimentares diferenciadas.

Outro aspecto interessante a considerar é o estudo dos efeitos do álcool sobre a flora intestinal, a barreira intestinal, fígado e pâncreas e tentar compreender eventuais interações entre estes órgãos no sentido de fornecer informações valiosas sobre a fisiopatologia da pancreatite alcoólica.

Finalmente, e uma vez que o tecido adiposo desempenha um papel importante na regulação/desregulação da homeostase metabólica, tendo um papel chave na obesidade, pois é um tecido de armazenamento de gordura e um tecido sensível à insulina; e uma vez que vários trabalhos evidenciam que o metabolismo do tecido adiposo e, consequentemente os níveis das adipocinas e a sua função nos tecidos-alvo, são afetados pelo consumo de vinho, tanto moderado como crónico - sugere-se que em trabalhos

futuros se avalie o efeito do consumo de vinho no tecido adiposo, e a sua relação com o pâncreas, como estava programado mas que não foi possível realizar.

## **7. Referências Bibliográficas**

- Aagaard NK, Thøgersen T, Grøfte T, Greisen J, Vilstrup H. Alcohol increases glucagon secretion in normal man. *Alcoholism: Clinical and Experimental Res* 2004; 28:1643-7.
- Ammann RW. The natural history of alcoholic chronic pancreatitis. *Intern Med*. 2001; 40:368-75.
- Ammann RW, Muellhaupt B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut* 1994; 35:552-6.
- Apte MV, Norton ID, Wilson JS. Ethanol induced acinar cell injury. *Alcohol Alcohol Suppl*. 1994; 2:365-8.
- Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Molecular mechanisms of alcoholic pancreatitis. *Dig Dis*. 2005; 23:232-40.
- Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Individual susceptibility to alcoholic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23:S63-S68.
- Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25:1816-26.
- Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15:2711-22.
- Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients* 2012; 4:759-81.
- Artero A, Artero A, Tarín JJ, Cano A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas* 2015; 80:3-13.
- Avogaro A, Watanabe RM, Dall'Arche A, De Kreutzenberg SV, Tiengo A, Pacini G. Acute alcohol consumption improves insulin action without affecting insulin secretion in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2004; 27:1369-74.
- Balsa C, Vital C, Pascueiro L. O Consumo de Bebidas Alcoólicas em Portugal. Prevalências e Padrões de Consumo, 2001-2007. Universidade de Lisboa, Portugal, 2011.
- Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, Medina FX, Battino M, Belahsen R, Miranda G, Serra-Majem L; Mediterranean Diet

- Foundation Expert Group. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr.* 2011; 14:2274-84.
- Baiano A, Terracone C, Gambacorta G, La Notte E. Phenolic content and antioxidant activity of Primitivo wine: comparison among winemaking technologies. *J Food Sci.* 2009; 74:C258-67.
- Barros V, Carrageta M, Graça P, Queiroz J, Sarmiento M. *Dieta Mediterrânica - Um Património Civilizacional Partilhado*, Turismo de Portugal, 2013.
- Brock C, Nielsen LM, Lelic D, Drewes AM. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19:7231-40.
- Burlingame B, Dernini S. Sustainable diets: the Mediterranean diet as an example. *Public Health Nutr.* 2011; 14:2285-7.
- Cao Y, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci EL. Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies. *BMJ* 2015; 351:h4238. doi:10.1136/bmj.h4238.
- Cardeiras RF. *Factores Críticos de Sucesso no Mercado do Vinho em Portugal e a Sustentabilidade do Sector Vitivinícola*, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2009.
- Chowdhury P, Gupta P. Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: An overview. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:7421-7.
- Cordova AC, Sumpio BE. Polyphenols are medicine: Is it time to prescribe red wine for our patients? *Int J Angiol.* 2009; 18:111-7.
- Criddle DN, Waldron R, Lugea A, Pandol S. Alcohol-related mechanisms of acute pancreatitis: the roles of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, doi:10.3998/panc.2015.28
- da Silva R, Bach-Faig A, Raidó Quintana B, Buckland G, Vaz de Almeida MD, Serra-Majem L. Worldwide variation of adherence to the Mediterranean diet, in 1961-1965 and 2000-2003. *Public Health Nutr.* 2009; 12:1676-84.
- Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, Klöppel G. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. *Mod Pathol.* 2006; 19:1019-26.
- Ding XZ, Adrian TE. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Pancreas.* 2002; 25(4):e71-6.

- Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 2015; 7(1):e1024405. doi:10.1080/19382014.2015.1024405.
- El-Hodhod MA, Nassar M, Hetta O, Gomaa S. Pancreatic size in protein energy malnutrition: a predictor of nutritional recovery. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 59: 467-73.
- Furtwängler NAFF, de Visser RO. Lack of international consensus in low-risk drinking guidelines. *Drug Alcohol Rev.* 2013; 32:11-8.
- Garcia-Alonso M, Minihane AM, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, de Pascual-Teresa S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemo attractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *J Nutr Biochem.* 2009; 20:521-9
- German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr.* 2000; 20:561-93.
- Giacosa A, Adam-Blondon AF, Baer-Sinnott S, Barale R, Bavaresco L, Di Gaspero G, Dugo L, Ellison RC, Gerbi V, Gifford D, Janssens J, La Vecchia C, Negri E, Pezzotti M, Santi L, Santi L, Rondanelli M. Alcohol and wine in relation to cancer and other diseases. *Eur J Cancer Prev.* 2012; 21:103-8.
- Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva MA, Gerbi V, La Vecchia C, Negri E, Opizzi A, Perna S, Pezzotti M, Rondanelli M. Mediterranean way of drinking and longevity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56:635-40.
- Giovinazzo G, Grieco F. Functional properties of grape and wine polyphenols. *Plant Foods Hum Nutr.* 2015; 70:454-62.
- Guedes JR. *Efeitos Sobre a Saúde do Consumo Moderado de Vinho Tinto.* Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.
- Gullo L, Migliori M, Brunetti MA, Manca M. Alcoholic pancreatitis: new insights into an old disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005; 7: 96-100.
- Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol.* 1999;155:1087-95.
- He J, Sun X, Qian KQ, Liu X, Wang Z, Chen Y. Protection of cerulein-induced pancreatic fibrosis by pancreas-specific expression of Smad7. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792:56-60.
- Irving HM, Samokhvalov AV, Rehm J. Alcohol as a risk factor for pancreatitis. A systematic review and meta-analysis. *JOP.* 2009; 10:387-92.

- Katz PO, Johnson DA. Control of intragastric pH and its relationship to gastroesophageal reflux disease outcomes. *J Clin Gastroenterol.* 2011; 45: 748-54.
- Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets* 2009; 1:129-36.
- Kim SH, Abbasi F, Lamendola C, Reaven GM. Effect of moderate alcoholic beverage consumption on insulin sensitivity in insulin-resistant, nondiabetic individuals. *Metabolism.* 2009; 58:387-92.
- Klöppel G, Detlefsen S, Feyerabend B. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch.* 2004; 445:1-8.
- Kolaczynski JW, Ylikahri R, Härkönen M, Koivisto VA. The acute effect of ethanol on counterregulatory response and recovery from insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67:384-8.
- Kono H, Nakagami M, Rusyn I, Connor HD, Stefanovic B, Brenner DA, Mason RP, Arteel GE, Thurman RG. Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280(6):G1178-86.
- Koppes LL, Dekker JM, Hendriks HF, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care.* 2005; 28:719-25.
- Kokavec A, Crowe SF. Effect on plasma insulin and plasma glucose of consuming white wine alone after a meal. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003; 27:1718-23.
- Kokavec A, Halloran MA. Consuming a small-moderate dose of red wine alone can alter the glucose-insulin relationship. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88:1147-56.
- Kokavec A, Halloran MA. Red wine alters the glucose-insulin relationship when consumed alone after a meal. *Int J of Diabetes and Metabolism* 2011; 19:1-9.
- Kristiansen L, Grønbaek M, Becker U, Tolstrup JS. Risk of pancreatitis according to alcohol drinking habits: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008; 168:932-7.
- Ku CR, Lee HJ, Kim SK, Lee EY, Lee MK, Lee EJ. Resveratrol prevents streptozotocin-induced diabetes by inhibiting the apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cell and the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Endocr J.* 2012; 59:103-9.
- Lerch MM, Albrecht E, Ruthenbürger M, Mayerle J, Halangk W, Krüger B. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas.* 2003; 27:291-6.

- Lin TK, Huang LT, Huang YH, Tiao MM, Tang KS, Liou CW. The effect of the red wine polyphenol resveratrol on a rat model of biliary obstructed cholestasis: involvement of anti-apoptotic signalling, mitochondrial biogenesis and the induction of autophagy. *Apoptosis*. 2012; 17:871-9.
- Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni MV. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chem*. 2016; 208:228-38.
- Liszt KI, Eder R, Wendelin S, Somoza V. Identification of catechin, syringic acid, and procyanidin b2 in wine as stimulants of gastric acid secretion. *J Agric Food Chem*. 2015; 63:7775-83.
- Liszt KI, Walker J, Somoza V. Identification of organic acids in wine that stimulate mechanisms of gastric acid secretion. *J Agric Food Chem*. 2012; 60:7022-30.
- Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M, de la Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol*. 2006; 147:873-85.
- Medina FX. Food consumption and civil society: Mediterranean diet as a sustainable resource for the Mediterranean area. *Public Health Nutr*. 2011;14:2346-9.
- Mezzano D, Leighton F, Martínez C, Marshall G, Cuevas A, Castillo O, Panes O, Muñoz B, Pérez DD, Mizón C, Rozowski J, San Martín A, Pereira J. Complementary effects of Mediterranean diet and moderate red wine intake on haemostatic cardiovascular risk factors. *Eur J Clin Nutr*. 2001; 55:444-51.
- Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45:85-118.
- Niebergall-Roth E, Harder H, Singer MV. A Review: Acute and chronic effects of ethanol and alcoholic beverages on the pancreatic exocrine secretion in vivo and in vitro. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22:1570-83.
- OECD. *Tackling Harmful Alcohol Use: Economics and Public Health Policy*, OECD Publishing, 2015 [disponível em <http://dx.doi.org/10.1787/9789264181069-en>]
- Oh YS, Jun H-S. Role of bioactive food components in diabetes prevention: effects on beta-cell function and preservation. *Nutr Metab Insights* 2014; 7:51-9.
- Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007; 117:50-9.
- Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell



- dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol.* 2010; 224:423-32.
- Pinho I, Rodrigues S, Franchini B, Graça P. *Padrão Alimentar Mediterrânico: Promotor de Saúde*. Editor: Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável, Direção-Geral da Saúde. Lisboa, Portugal, 2015.
- Pitchumoni CS. Pancreas in primary malnutrition disorders. *Am J Clin Nutr.* 1973; 26:374-9.
- Rasmussen BM, Orskov L, Schmitz O, Hermansen K. Alcohol and glucose counterregulation during acute insulin-induced hypoglycemia in type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2001; 50:451-7.
- Rebelo MJ, Sousa C, Valentão P, Rego R, Andrade PB. Phenolic profile of Douro wines and evaluation of their NO scavenging capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem.* 2014; 163:16-22.
- Rehm J, Baliunas D, Borges GL, Graham K, Irving H, Kehoe T, Parry CD, Patra J, Popova S, Poznyak V, Roerecke M, Room R, Samokhvalov AV, Taylor B. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease – an overview. *Addiction* 2010; 105:817-43.
- Reichert M, Rustgi AK. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest.* 2011; 121:4572-8.
- Rodrigues SS, Caraher M, Trichopoulou A, de Almeida, MD. Portuguese households' diet quality (adherence to Mediterranean food pattern and compliance with WHO population dietary goals): trends, regional disparities and socioeconomic determinants. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62:1263-72.
- Saito K, Iwama N, Takahashi T. Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J Exp Med.* 1978; 124:177-86.
- Samokhvalov AV, Rehm J, Roerecke M. Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-analyses. *EBioMedicine.* 2015; 2:1996-2002.
- Schneider A, Whitcomb DC, Singer MV. Animal models in alcoholic pancreatitis—what can we learn? *Pancreatology* 2002; 2:189-203.
- Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res Curr Rev.* 2014; 35:155-71.

- Shimizu K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 2008; 43:823-32.
- Siegmund E, Jonas L, Dummler W. [Modification of alcohol-induced pancreatic damage in rats by soybean diet][Artigo em alemão, Abstract] *Z Gastroenterol*. 1994; 32:81-6.
- Standridge JB, Zylstra RG, Adams SM. Alcohol consumption: an overview of benefits and risks. *South Med J*. 2004; 97:664-72.
- Suda K, Takase M, Takei K, Kumasaka T, Suzuki F. Histopathologic and immunohistochemical studies on the mechanism of interlobular fibrosis of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124:1302-5.
- Thakker KD. An overview of health risks and benefits of alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22:285S-298S.
- Tiengo A, Valerio A, Molinari M, Meneghel A, Lapolla A. Effect of ethanol, acetaldehyde, and acetate on insulin and glucagon secretion in the perfused rat pancreas. *Diabetes*. 1981; 30:705-9.
- Trichopoulou A, Critselis E. Mediterranean diet and longevity. *Eur J Cancer Prev*. 2004; 13:453-6.
- Vonlaufen A, Spahr L, Apte MV, Frossard J-L. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014; 5:82-90.
- Zilkens RR, Burke V, Watts G, Beilin LJ, Puddey IB. The effect of alcohol intake on insulin sensitivity in men: a randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2003; 26:608-12.
- Wang X, Misawa R, Zielinski MC, Cowen P, Jo J, Periwal V, Ricordi C, Khan A, Szust J, Shen J, Millis JM, Witkowski P, Hara M. Regional differences in islet distribution in the human pancreas - preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2013; 8(6):e67454. doi:10.1371/journal.pone.0067454.
- Wannamethee SG, Camargo CA Jr, Manson JE, Willett WC, Rimm EB. Alcohol drinking patterns and risk of type 2 diabetes mellitus among younger women. *Arch Intern Med*. 2003; 163:1329-36.
- Wiśniewska E, Dylík A, Kulza M, Florek E, Piekoszewski W, Seńczuk-Przybyłowska M, Marszałek A. Exposure to ethanol and tobacco smoke in relation to level of PCNA antigen expression in pancreatic and hepatic rat cells. *Pharmacol Rep*. 2013; 65:914-26.

WHO. Global Status Report on Alcohol and Health 2014 [disponível em [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf)].

Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. Wheater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas. 5th Edition. Elsevier, 2006.