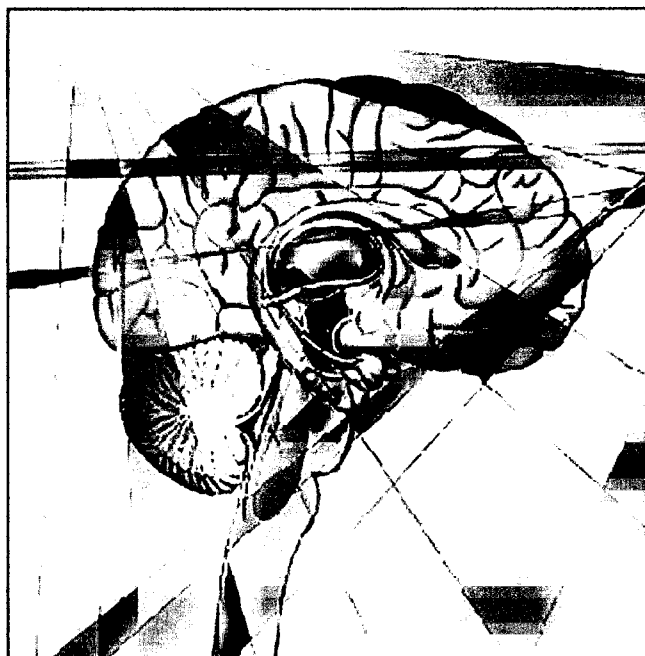


Marco Manuel Batista Assunção

**COMPOSTOS POLIFENÓLICOS DO VINHO E FORMAÇÃO DE LIPOFUSCINA
NO CÉREBRO DO RATO – ESTUDO MORFOMÉTRICO**



**Porto
2003**

Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

**COMPOSTOS POLIFENÓLICOS DO VINHO E FORMAÇÃO DE LIPOFUSCINA
NO CÉREBRO DO RATO – ESTUDO MORFOMÉTRICO**

Trabalho complementar de investigação para a
obtenção do grau de licenciatura em Ciências da
Nutrição apresentado à Faculdade de Ciências da
Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Trabalho realizado no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
e Centro de Morfologia Experimental – Unidade 121/94

"We are an intelligent species, and the use of our intelligence quite properly gives us pleasure. In this respect, the brain is like a muscle. When we think well, we feel good. Understanding is a kind of ecstasy."

Carl Sagan, In: *Broca's Brain: Reflections on the Romance of Science*, 1979.

Para a Rosário

AGRADECIMENTOS

Decorrido o meu estágio académico, sinto agora a necessidade de agradecer a quem tornou possível a sua realização. O contributo que deram foi imprescindível e determinante para o sucesso deste ano lectivo. De uma forma ou de outra, ajudaram-me a concretizar um sonho, a minha licenciatura.

Começo por agradecer ao Professor Doutor Manuel Paula Barbosa, director do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto, pelo facto de me ter aceite prontamente nesta instituição, permitindo deste modo a realização do meu estágio referente ao último ano do curso. Fico grato pela confiança depositada em mim, ao propor-me um trabalho de investigação de tamanha beleza e complexidade. Espero ter-me empenhado o suficiente na sua elaboração e ter cumprido as minhas responsabilidades. Agradeço ainda pelos conhecimentos e conselhos que me transmitiu, que foram sem dúvida cruciais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Paulo Andrade, meu orientador, os meus reconhecidos agradecimentos. O modo como desempenhou esta função merece realce. O espírito crítico que me incutiu proporcionou-me a integração dos conhecimentos para que pudesse atingir uma visão mais abrangente dos factos e da forma de ultrapassar os obstáculos. As suas observações atentas e as sugestões e críticas oportunas contribuíram de forma determinante para a realização de um melhor trabalho. Espero ao longo dos anos poder vir a demonstrar a minha gratidão por todos os momentos em que me acompanhou e guiou.

Um agradecimento a todos os colaboradores e investigadores do Instituto de Anatomia com especial relevo para o Professor Doutor António Cadete Leite pela sua acessibilidade e pelos ensinamentos práticos prestados e para a Professora Doutora Maria Dulce Madeira pela disponibilidade das suas preciosas explicações no domínio da Estereologia.

Ao Professor Doutor Vítor de Freitas do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto agradeço pela colaboração prestada e pelos esclarecimentos úteis que sempre se dispôs a facultar.

Não posso deixar de agradecer à Susana, ao Pedro e à Susana Isabel pelos bons momentos que me proporcionaram dentro e fora do Instituto de Anatomia. O modo como me receberam faz com que sejam para mim mais do que colegas de trabalho.

A todos os funcionários e aos técnicos do Instituto de Anatomia, particularmente ao Senhor Artur Pereira e à Senhora D. Maria Manuela, agradeço a amabilidade e disponibilidade que sempre tiveram para comigo e pela forma imediata com que satisfizeram os meus pedidos.

À minha mãe, ao meu pai e irmã agradeço todo o apoio e carinho que me prestaram. O esforço que dispenderam foi determinante para que pudesse chegar até aqui.

Um agradecimento muito especial à Rosário por me ter contagiado com a magia do espírito científico. Espero poder retribuir por toda a sua atenção, dedicação e compreensão.

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{cit} – Área de citoplasma celular

A_{cl} – Área de compartimento lisossómico

A_{lip} – Área de lipofuscina

ADH – *Alcoholic dehydrogenase* (desidrogénase alcoólica)

ANOVA – Análise de variância

COX-2 – Cicloxigenase

CP – Catequinas e procianidinas oligoméricas

NAD^+ – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – forma oxidada

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina – forma reduzida

NMDA – N-metil-D-aspartato

PLA2 – Fosfolípase A2

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigénio)

SNC – Sistema Nervoso Central

UI – Unidades Internacionais

V_{cit} – Volume citoplasmático

V_{cl} – Volume citoplasmático ocupado pelo compartimento lisossómico

V_{lip} – Volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina

V_v – Densidade volumétrica

$V_v (cl)$ – Densidade volumétrica do compartimento lisossómico

$V_v (lip)$ – Densidade volumétrica da lipofuscina

VP – Vinho do Porto

ÍNDICE

Resumo	1
Introdução	3
Objectivos	8
Material e Métodos	9
1. Animais e dietas	9
2. Extracção e isolamento dos polifenóis das grainhas das uvas	10
3. Técnicas de fixação e processamento do material	11
4. Análise esterológica	14
5. Doseamento de etanol no soro sanguíneo	17
6. Análise estatística	17
Resultados	18
1. Animais e dietas	18
2. Análise morfológica do volume citoplasmático ocupado pela lipofusцина e pelo compartimento lisossómico	23
Discussão	28
Conclusão	41
Bibliografia	42
Anexos	55

RESUMO

A ingestão crónica de uma solução etanólica conduz a um aumento da deposição de lipofuscina nos neurónios do sistema nervoso central (SNC) relacionada provavelmente com o stress oxidativo. Esta situação, descrita num modelo de alcoolismo crónico no Rato adulto, pode ser considerada equivalente a um processo de envelhecimento cerebral precoce e é acompanhada de défices funcionais, especialmente a nível da memória e da aprendizagem.

Se, por um lado, existe consenso sobre as consequências deletérias da ingestão de grandes quantidades de etanol no SNC, não parece haver acordo em relação às acções neuronais da ingestão moderada de bebidas alcoólicas. Na base desta discrepância poderão estar os compostos polifenólicos, como as catequinas e as procianidinas oligoméricas (CP) presentes em abundância no vinho tinto, bebida com alegadas propriedades protectoras do SNC.

Assim, o objectivo deste trabalho foi averiguar, utilizando o mesmo modelo animal, o efeito destes compostos polifenólicos adicionados a uma solução etanólica na acumulação de lipofuscina nas células piramidais de CA1 e CA3 da formação do hipocampo e nas células de Purkinje do cerebelo do Rato.

Para tal, o volume de lipofuscina e do compartimento lisossómico no citoplasma dos neurónios foi quantificado utilizando métodos morfométricos adequados. Sujeitaram-se então ratos à ingestão prolongada (6 meses) de diferentes regimes líquidos: 1) água, 2) água com 200 mg/l de CP, 3) 20% de etanol, 4) 20% de etanol com 200 mg/l de CP e 5) controlo nutricional *pair-fed*. Para além destes grupos, estudou-se ainda um grupo de ratos que ingeriram vinho do Porto (VP), cuja concentração de CP e etanol é semelhante ao grupo 4. Como controlos deste último grupo, submeteram-se animais à ingestão de 20% de etanol com 90

g/l de glicose ou água com glicose para substituir de forma isocalórica a ingestão energética a partir do VP.

Observou-se, em concordância com outros autores, um aumento da acumulação de lipofuscina em todos os tipos de neurónios nos animais tratados com etanol e foi verificado que as CP em solução etanólica foram capazes de inibir o aumento da deposição de lipofuscina. O VP, apesar de não ter tido qualquer efeito quando comparado com o grupo etanol, foi capaz de exercer protecção na acumulação de lipofuscina, quando comparado com os animais que ingeriram etanol com 90 g/l de glicose.

Os presentes resultados indicam que existem compostos no vinho com potencialidade protectora em relação às lesões oxidativas induzidas nos neurónios pelo consumo crónico de etanol. No entanto, estes resultados são insuficientes para justificarem a recomendação da ingestão moderada de vinho como profilaxia de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Lipofuscina, Formação do Hipocampo, Cerebelo, Etanol, Polifenóis, Vinho do Porto, Morfometria, Rato.

INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) é um dos principais sistemas responsáveis pelo controlo do funcionamento do organismo humano. Uma das suas principais funções consiste na manutenção do meio interno constante. Esta tendência para a promoção do equilíbrio designa-se por homeostasia (1). Assim, para além de se debater com as influências internas, o SNC é constantemente sujeito a estímulos e desafios complexos provenientes do meio ambiente. O etanol constitui um exemplo de uma substância exógena capaz de alterar as funções deste sistema e desencadear numerosos efeitos deletérios por perturbação da homeostasia (2).

Os efeitos do etanol sobre o SNC têm vindo a ser amplamente investigados no Homem (3, 4) e em animais de laboratório (4-11) e muitos destes estudos referem que o consumo crónico desta substância conduz ao envelhecimento cerebral precoce (9, 10, 12-14). Com efeito, a metabolização do etanol, através de três vias principais (desidrogénase alcoólica (ADH), catálase e citocromo P450 2E1) origina a produção de metabolitos reactivos e formação de radicais livres oxidativos que estão envolvidos na lesão prematura de diversos componentes celulares originando uma aceleração dos processos metabólicos que conduzem ao envelhecimento (5, 15).

De todos os organelos celulares, as mitocôndrias e o compartimento lisossomal, constituído pelos corpos multivesiculares e pelos lisossomas, são os mais afectados pelo envelhecimento e consumo crónico de etanol (6, 9). As mitocôndrias entram em tumefacção e desorganização estrutural enquanto que os lisossomas, organelos celulares envolvidos no processo de renovação mitocondrial, acumulam material polimérico não degradável no seu interior. A acumulação deste material indigerível, que ocorre durante a degradação

autofagocitária nos lisossomas, está na base da formação de corpos densos com propriedades de autofluorescência e abundância em fosfatase ácida, denominados de lipofuscina. Este pigmento, conhecido há mais de 150 anos, consiste numa mistura de substâncias proteicas (30-70%), lipídicas (20-50%) e glicídicas (até 7%), contendo ainda vestígios de metais pesados, principalmente ferro (16).

Embora alguns autores defendam que a acumulação de lipofuscina conduz à morte neuronal, outros são de opinião que este pigmento pode funcionar como um reservatório de material oxidado, protegendo a célula das lesões potencialmente provocadas por esse material. No entanto, apesar de poder ser uma substância inócua, a sua acumulação excessiva conduzirá à ocupação de uma grande área de citoplasma, o que pode perturbar o funcionamento normal do neurónio (16-19).

Estudos experimentais no Rato adulto, demonstraram que este pigmento é um dos sinais mais consistentes correlacionados com o envelhecimento e, apesar de não ser o único, é um parâmetro morfométrico útil na avaliação da sua extensão (12, 13, 16). Assim, verificou-se que a acumulação de lipofuscina no cérebro é evidente a partir dos 12 meses de idade, aumentando após esse período de tempo, tornando-se proeminente após os 24 meses. Por outro lado, em ratos sujeitos a alcoolização crónica, a acumulação de lipofuscina ocorre precoce e progressivamente após os 3-6 meses de ingestão de etanol (12-14).

Uma parte destes estudos morfométricos foi efectuado no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto, utilizando um modelo que se caracteriza por períodos prolongados de alcoolização com soluções etanólicas a 20% (v/v), controlando-se simultaneamente quer os aspectos nutricionais, quer a quantidade

e duração de ingestão do etanol (6, 8-14, 20, 21). Foi demonstrado por investigadores deste Instituto que o cerebelo é uma das áreas do SNC mais vulneráveis ao etanol (10, 14), tendo sido encontrado no córtex cerebeloso do Rato adulto submetido a alcoolização crónica um aumento da deposição de lipofuscina (13) e outras alterações degenerativas, particularmente ao nível dos corpos celulares e dos prolongamentos dendríticos e contactos sinápticos das células de Purkinje. Verificou-se que a organização estrutural do circuito cerebeloso é profundamente afectada pela acção prolongada do etanol fornecendo o substrato morfológico às dramáticas alterações funcionais cerebelosas que se encontram no alcoolismo crónico (10, 14). Também o circuito neuronal dependente da formação do hipocampo, implicado nas actividades cognitivas e com um papel importante na aprendizagem e memória (22, 23) está morfológica e funcionalmente alterado com este modelo de alcoolismo crónico (7, 12, 21). Assim, utilizando o mesmo modelo experimental, foi demonstrado que na formação do hipocampo, as células piramidais das subdivisões CA1 e CA3 apresentam também um aumento precoce e progressivo na deposição de lipofuscina (12). Esta acumulação de lipofuscina foi também acompanhada por profundas actividades degenerativas que envolvem alterações dendríticas, perda de contactos sinápticos e morte celular das principais populações neuronais da formação do hipocampo (6, 8, 21).

Admite-se que a morte neuronal verificada no decurso da alcoolização crónica é devido a fenómenos de excitotoxicidade resultante de uma cadeia de eventos com origem na hiperregulação de receptores glutamatérgicos e stress oxidativo (4, 5). Este tipo de mecanismos são idênticos aos envolvidos nos fenómenos de envelhecimento (24-26), na patogénese de lesões isquémicas cerebrais (27), da

epilepsia experimental (28) e de algumas doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e Parkinson (29-31).

Em contraste com os estudos morfológicos sobre as lesões induzidas pelo consumo crónico de soluções etanólicas no SNC, investigações mais recentes no Homem demonstraram paradoxalmente, que o consumo moderado de alguns tipos de bebidas alcoólicas, pode induzir um efeito protector a nível cardiovascular e também ao nível do SNC (32-37). Este efeito protector parece estar relacionado com propriedades anti-oxidantes, anti-trombóticas, anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas (34, 38-41) das bebidas alcoólicas. No entanto, não parecem estar exclusivamente relacionados com o etanol, mas também com um grupo de substâncias abundantes em algumas bebidas, especialmente no vinho tinto: os compostos fenólicos (42, 43). Estes compostos, produtos do metabolismo secundário das plantas, existem nas películas e nas grainhas das uvas, de onde são extraídos durante a fermentação alcoólica na produção do vinho (39-41). Já foram identificados mais de 200 compostos fenólicos no vinho, na sua maioria pertencentes à classe dos flavonóides que apresentam uma potente acção antioxidante (39).

Entre estes flavonóides, destacam-se as catequinas e as procianidinas oligoméricas (CP), pertencentes à categoria dos 3-flavanóis. As catequinas podem existir quer na forma livre, quer associadas através de ligações interflavonólicas, dando origem a procianidinas oligoméricas, caracterizadas pelo número e pelo tipo de monómeros de 3-flavanóis (44, 45). No vinho tinto, a quantidade destes compostos pode variar entre 48 e 440 mg/l, sendo em média de 168 mg/l (39). O vinho do Porto (VP) tinto é também uma boa fonte destes flavonóides, chegando a conter cerca de 108 mg/l de 3-flavanóis. O VP distingue-

se dos restantes vinhos tintos pelo processo tecnológico envolvido na sua produção, do qual resulta um vinho com uma composição muito distinta. Na produção do VP a fermentação decorre até à transformação de cerca de metade dos açúcares do mosto em álcool, momento em que é adicionado de aguardente vínica (46). Deste modo, obtém-se um vinho com um teor alcoólico de 19 a 22% (v/v) e 40 a 160 g/l de açúcares redutores (anexo 1).

Apesar do crescente interesse e do grande número de trabalhos produzidos relacionados com os possíveis efeitos protectores deste tipo de bebidas e dos seus compostos fenólicos (32-41), esta é ainda uma área que carece de atenção e esclarecimento.

OBJECTIVOS

O presente trabalho foi motivado por estudos que sugerem a existência de efeitos não só protectores mas também benéficos de vários compostos fenólicos do vinho tinto em situações degenerativas e de stress oxidativo no SNC (35, 36, 42, 47-49). Foi colocada a hipótese de que as catequinas e procianidinas oligoméricas seriam alguns dos compostos responsáveis por esse efeito protector quando adicionadas a uma solução etanólica ou também incluídas numa matriz biológica complexa como o vinho do Porto.

Assim, pretendeu-se avaliar o efeito da ingestão crónica e prolongada (6 meses) de uma solução etanólica a 20% (v/v) suplementada com catequinas e procianidinas oligoméricas na formação e acumulação de lipofuscina e estudar também as alterações ocorridas no compartimento lisossomal. Estes parâmetros foram avaliados morfometricamente nas células de Purkinje do cerebelo e nas células piramidais de CA1 e CA3 da formação do hipocampo do Rato adulto. As mesmas estruturas neuronais, foram ainda quantificadas em animais que ingeriram, durante o mesmo período de tempo, vinho do Porto que apresenta uma quantidade de etanol e de 3-flavonóis semelhante à da solução ingerida pelo grupo anterior.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e dietas

Neste trabalho, utilizaram-se ratos Wistar machos (Charles-River, Barcelona), com 6 meses de idade. Os animais permaneceram no biotério do Instituto de Anatomia sob condições de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura (20-22°C) controladas.

Até ao início do tratamento, todos os animais tiveram à sua disposição água e uma ração própria para ratos de laboratório (Letica, Barcelona). Em termos analíticos esta ração continha 15,4% de proteínas, 2,9% de gorduras, 4,1% de celulose, 5,3% de sais minerais, sendo o restante glícidos. Possuía ainda como suplementos 15000 UI de vitamina A, 1500 UI de vitamina D₃, 20 mg de vitamina E e 12 mg de cobre por quilograma e fornecia 377 kcal por 100 gramas de ração.

1.1. Tratamento de animais com etanol e com CP. Para o tratamento dos animais com etanol e com CP usaram-se 30 ratos que foram divididos em grupos de 6 elementos e colocados 3 por gaiola. Iniciado o tratamento, os ratos dos diferentes grupos continuaram a ter à sua disposição o mesmo tipo de ração. Os animais foram submetidos a diferentes regimes líquidos:

- água;
- solução aquosa de 200 mg/l de extracto polifenólico das grainhas das uvas (Água+CP);
- solução aquosa de sacarose para substituir a ingestão energética do grupo tratado com etanol (*Pair-fed*);
- solução aquosa de etanol a 20% (v/v) (Etanol);

- solução aquosa de etanol a 20% (v/v) com 200 mg/l de extracto polifenólico das grainhas das uvas (Etanol+CP).

1.2. Tratamento de animais com VP. Neste caso, trataram-se 15 animais que foram divididos em 3 grupos de 5 elementos e mantidos em gaiolas individuais. Estes grupos também não tiveram qualquer restrição de ração, sendo no entanto, sujeitos a diferentes regimes líquidos:

- solução aquosa de glicose para substituir a ingestão energética do grupo tratado com VP (*Pair-fed* VP);
- solução aquosa de etanol a 20% (v/v) com 90 g/l de glicose (Etanol+Glicose);
- vinho do Porto (fornecido pelas caves Taylor's) envelhecido 2 anos em casco, ainda não sujeito a provas de classificação mas considerado um potencial *Late Bottled Vintage* (VP).

Não houve restrição de líquidos ou de ração excepto nos grupos *Pair-fed* e *Pair-fed* VP, em que a quantidade e o valor energético das soluções ingeridas foram semelhantes aos dos animais tratados com etanol e com VP, respectivamente.

A quantidade de ração e bebida ingeridas pelos ratos foi registada cada 2 a 4 dias, tendo as soluções de polifenóis sido renovadas. A pesagem dos animais foi efectuada semanalmente durante todo o período experimental. Os ratos foram submetidos a 6 meses de tratamento, no fim dos quais, foram mortos e analisados.

2. Extracção e isolamento dos polifenóis das grainhas das uvas

Para este trabalho, usou-se uma mistura de polifenóis extraídos das grainhas das uvas que consistia de catequinas ((+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-

epicatequina-3-O-galato) e procianidinas oligoméricas (CP). A composição mais detalhada da mistura está evidenciada no anexo 2.

O processo utilizado para efectuar a extracção dos polifenóis foi o adaptado da metodologia descrita por Michaud *et al.* (50). Para se efectuar o fraccionamento e a purificação dos compostos a partir dos precipitados obtidos recorreu-se ao método descrito por de Freitas *et al.* (51) que envolveu o fraccionamento do extracto assim obtido por cromatografia em gel TSK Toyopearl HW 40(S) e a detecção e purificação dos compostos por cromatografia líquida de alta pressão.

Tanto a extracção como o isolamento dos polifenóis das grainhas das uvas foram realizados pelo Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

3. Técnicas de fixação e processamento do material

3.1. Fixação

Terminado o período de tratamento (12 meses de idade), todos os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (80 mg/kg de peso corporal). Após abertura da cavidade abdominal e compartimento torácico, procedeu-se à perfusão por via transcardíaca de um líquido fixador (300 a 400 ml/animal) durante 10-15 minutos, constituído por uma mistura de 1% de glutaraldeído (v/v) e 1% de paraformaldeído (p/v) em solução tampão de fosfatos 0,12 M a pH 7,2 (52). Todos os animais foram perfundidos às 14 horas.

No final da perfusão, procedeu-se à abertura da cavidade craniana e à remoção do encéfalo, do qual se isolaram o cérebro e o cerebello que foram pesados e devidamente codificados para permitir análise cega sem identificação do animal. As estruturas permaneceram imersas em solução fixadora durante 2 horas a 4°C. Decorrido aquele tempo, os hemisférios cerebrais foram separados por corte

mediosagital. O hemisfério esquerdo, destinado à medição dos volumes dos neurónios das várias regiões da formação do hipocampo, continuou mergulhado na solução fixadora de perfusão durante 15 dias a 4°C, no final dos quais foi incluído em glicolmetacrilato. O hemisfério direito, utilizado para observação ultrastrutural das diferentes regiões da formação do hipocampo, foi incluído em resina epóxica.

3.2. Processamento do material

3.2.1. Processamento do material para inclusão em resina epóxica (Epon)

Após separação dos hemisférios cerebrais de todos os animais, procedeu-se à dissecação cuidadosa da formação do hipocampo do hemisfério direito. O hipocampo foi seccionado segundo o plano coronal, enquanto que o vermis do cerebelo foi seccionado sagitalmente. Obtiveram-se em média 3 blocos de cada região, com aproximadamente 1 mm de espessura, sendo processados posteriormente para observação ultrastrutural de acordo com o protocolo de rotina usado no Instituto de Anatomia, que pouco difere das técnicas descritas por Palay e Chan-Palay (52).

Os blocos da formação do hipocampo e do cerebelo assim obtidos, foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,4 e submetidos a pós-fixação numa solução de tetróxido de ósmio a 1% (p/v) no mesmo tampão, durante 2 horas. Em seguida, foram imersos durante 1 hora numa solução de acetato de uranilo a 1% (p/v) preparado em álcool a 70% e posteriormente desidratados através de passagens sucessivas por soluções alcoólicas de concentração crescente. Terminada a desidratação, os blocos foram incluídos em resina epóxica definitiva e mantidos na estufa a 60°C durante pelo menos 24 horas para permitir a polimerização da resina.

3.2.2. Microscopia electrónica

Dos 3 blocos obtidos da formação do hipocampo, seleccionaram-se aleatoriamente 2 pertencentes à porção média desta formação: um destinado ao estudo das células piramidais de CA1 e o outro ao estudo das células piramidais de CA3. Seleccionou-se ainda 1 dos 3 blocos do vermis cerebeloso, contendo os lóbulos 4 a 6, segundo a classificação de Larsell (53), destinado ao estudo das células de Purkinje.

Efectuaram-se cortes semifinos (2 μ m) contendo as subdivisões CA1 e CA3 da formação do hipocampo e os lóbulos do vermis cerebeloso (anexo 3). Estes cortes foram obtidos paralelamente à superfície do corte do bloco e corados pelo azul de toluidina. Tendo como referência os cortes semifinos, realizaram-se os ultrafinos (70 nm) que foram recolhidos em grelhas de cobre de orifício único revestidas por membrana de formvar e contrastados pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo.

A partir dos cortes ultrafinos, fotografaram-se de forma aleatória, ao microscópio electrónico, células piramidais das subdivisões CA1 e CA3 (ampliação primária: 2700x; ampliação final: 8100x) e células de Purkinje (ampliação primária: 1800x; ampliação final: 5400x). Utilizaram-se os neurónios seccionados equatorialmente, uma vez que a lipofuscina se acumula preferencialmente no pólo apical das células.

3.2.3. Processamento do material para inclusão em metacrilato

Após a remoção do respectivo pólo frontal, os hemisférios esquerdos foram sujeitos a uma desidratação por passagens sucessivas em soluções alcoólicas de concentração crescente (70%, 90%, 95%) e álcool absoluto, durante 60 minutos cada. Após desidratação, os hemisférios foram submetidos a uma pré-infiltração, com uma mistura de álcool absoluto e glicolmetacrilato (2-hidroxietil-metacrilato;

Technovit 7100, Alemanha) durante 3 horas a 4°C. Terminada esta fase, iniciou-se a infiltração propriamente dita que inclui uma fase inicial de infiltração e uma fase de polimerização do glicolmetacrilato, em cerca de 2 horas à temperatura ambiente.

As formações do hipocampo foram então seccionados de forma seriada no plano coronal, em cortes de 40 µm de espessura nominal. Para tal, usou-se um micrótomo rotativo Jung Multicut (Leica, Alemanha) com faca de tungstato de carbono. Os cortes obtidos foram montados em lâminas de vidro, secos em estufa a 60°C durante 24 horas e corados pelo método de Giemsa modificado para material incluído em glicolmetacrilato (54). Depois de corados, foram cobertos com lamelas de vidro, utilizando como meio de montagem Histomount® (National Diagnostics, EUA)

O material incluído em glicolmetacrilato foi usado para a determinação do volume somático e nuclear das células piramidais das subdivisões CA1 e CA3 da formação do hipocampo (anexo 3).

4. Análise estereológica

4.1. Determinação do volume de células piramidais de CA1 e CA3

O volume neuronal e nuclear médio de células piramidais das subdivisões CA1 e CA3 da formação do hipocampo foram estimados através do *optical rotator* (55), utilizando o sistema de análise estereológica video C.A.S.T.-GRID (Olympus Danmark A/S, Dinamarca) e um microscópio Olympus BH-2 acoplado a uma câmara de vídeo Sony CCD-Iris MTV-3. Esta câmara estava ligada a um monitor a cores, onde se visualizavam os cortes histológicos, através de um adaptador de video Sony e um computador IBM. Os movimentos da platina do microscópio ao longo dos eixos x e y foram controlados através de um sistema motorizado e a

medição dos movimentos verticais, isto é, ao longo do eixo z, era efectuada com o auxílio de um *microcator* digital Heidenhain MT-12 (Heidenhain GmbH, Alemanha) também ligado à platina do microscópio.

Os neurónios nos quais se procedeu à determinação do volume neuronal e nuclear, foram seleccionados de modo simultaneamente sistemático e aleatório através do *optical disector* (54, 56-58), utilizando-se um *disector* com uma área de 506 e 911 μm^2 para as células piramidais de CA1 e CA3 e cuja altura foi de 15 μm para ambas.

Para a determinação do volume neuronal e nuclear das células piramidais, definiu-se como “ponto único” o centro do corpo celular. No plano óptico que continha este ponto, determinou-se o valor aproximado do diâmetro neuronal e, a partir deste parâmetro, a distância entre os planos ópticos nos quais se procedeu à marcação dos pontos de intersecção do perfil de cada célula, corpo celular ou núcleo, com linhas-teste (59), que em cada plano óptico assumiam direcções aleatórias. Para cada neurónio, foram utilizados dois planos ópticos e, em cada um deles, marcados os pontos de intersecção do perfil celular com as linhas-teste. Os volumes foram calculados pelo *software*. O coeficiente de erro da estimativa do volume nuclear das células piramidais de CA1 e de CA3 foi de 0,09 e 0,10, respectivamente.

4.2. Determinação do volume de células de Purkinje

A determinação do volume neuronal e nuclear médio de células de Purkinje do cerebelo foi feita através do *nucleator* (56, 59), utilizando o sistema C.A.S.T.-GRID. A partir das lâminas contendo os cortes semifinos seriados do cerebelo, procedeu-se à identificação dos lóbulos 4 a 6. Determinaram-se os volumes de todas as células com nucléolo, presentes ao longo de um mesmo lóbulo em

quatro cortes distintos. O *nucleator* permite estimar volumes a partir de um único plano de focagem, sendo necessário apenas definir como “ponto único” o centro do nucléolo e proceder à marcação dos pontos de intersecção do perfil do corpo celular ou núcleo, com as linhas-teste (59). Os volumes foram calculados pelo *software*. O coeficiente de erro da estimativa do volume nuclear das células de Purkinje foi de 0,10.

4.3. Quantificação de lipofuscina, lisossomas e corpos multivesiculares

Quantificou-se a área de citoplasma celular (A_{cit}), de lipofuscina (A_{lip}) e de compartimento lisossómico (A_{cl}) através da sobreposição de uma grelha de acetato transparente adequada (anexo 4) de forma aleatória em cada fotografia. A medição das áreas foi efectuada pela contagem do número de pontos da grelha que estavam sobre as estruturas a estudar (60, 61). A partir das áreas obtidas determinou-se a densidade volumétrica da lipofuscina (V_v (lip)) e do compartimento lisossómico (V_v (cl)) da seguinte forma:

$$V_v \text{ (lip)} = A_{lip}/A_{cit} \quad \text{e} \quad V_v \text{ (cl)} = A_{cl}/A_{cit}.$$

Para a determinação da V_v da lipofuscina e do compartimento lisossómico analisaram-se, em média, 9 células de Purkinje, 13 células piramidais de CA1 e 11 células piramidais de CA3 em cada animal estudado.

Depois de se obterem os volumes médios neuronal e nuclear, tanto nas células piramidais de CA1 e de CA3 como nas células de Purkinje, calculou-se por diferença o volume citoplasmático (V_{cit}). Multiplicando a V_v da lipofuscina (V_v (lip)) ou do compartimento lisossómico (V_v (cl)) pelo respectivo V_{cit} obteve-se o volume de citoplasma ocupado pela lipofuscina (V_{lip}) ou pelo compartimento lisossómico (V_{cl}), assim:

$$V_{lip} = V_v \text{ (lip)} \times V_{cit} \quad \text{e} \quad V_{cl} = V_v \text{ (cl)} \times V_{cit}$$

5. Doseamento de etanol no soro sanguíneo

A determinação dos níveis séricos de etanol foi efectuada nos ratos tratados com Etanol, VP e Etanol+Glicose. As amostras de sangue (500 µl) foram colhidas da veia dorsal da cauda para tubos Eppendorf. Ao longo da experiência foram realizadas várias colheitas a diversas horas entre as 20 e as 24 horas. O soro foi separado por duas centrifugações sucessivas durante 5 e 2 minutos a 5400 rpm e armazenado a -20°C até ao doseamento, efectuado o mais rapidamente possível. Os doseamentos foram efectuados por um auto-analisador *Dimension* (Dade Behring) utilizando o *kit* comercial (*Ethyl Alcohol Flex*) adaptado para este aparelho. Esta determinação é baseada numa modificação do método de doseamento enzimático da ADH geralmente utilizado na determinação de álcool no soro e outros fluídos biológicos (62).

6. Análise estatística

Neste trabalho, todo o tratamento estatístico foi efectuado através da aplicação do teste de análise de variância (ANOVA) para o factor tratamento. Para tal, foi usado o programa *Statistica for Windows* (StatSoft Inc., EUA).

Utilizou-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls para averiguar se as médias obtidas nos diferentes grupos analisados diferiam significativamente entre si. Quando se compararam apenas dois grupos recorreu-se à utilização do teste estatístico *t* de *Student* (desemparelhado).

Os resultados apresentados foram expressos em média e respectivo desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Animais e dietas

1.1. Tratamento de animais com etanol e com CP. No início do tratamento, os animais dos diferentes grupos apresentavam peso corporal médio de 601 ± 31 g. No final da 15ª semana de tratamento começaram a existir diferenças ponderais entre os grupos sujeitos aos diversos tratamentos ($F_{4,25} = 3,84$; $p < 0,01$) (Fig. 1). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que à 15ª semana de tratamento o peso corporal médio dos animais pertencentes aos grupos Etanol e Etanol+CP eram significativamente inferiores aos do grupo Água ($p < 0,05$). Na 20ª e 26ª semana de tratamento, a aplicação da análise de variância demonstrou a existência de efeito significativo do tratamento no peso corporal médio dos animais dos diferentes grupos ($F_{4,25} = 4,06$; $p < 0,01$ e $F_{4,25} = 4,34$; $p < 0,01$, respectivamente). O teste de Newman-Keuls revelou que o peso corporal dos animais do grupo Etanol+CP era significativamente inferior ao dos animais dos grupos Água e Água+CP ($p < 0,05$). Este mesmo teste demonstrou também que o peso corporal dos ratos pertencentes ao grupo Etanol era significativamente inferior ao peso corporal dos ratos do grupo Água ($p < 0,05$) (Fig. 1).

No que diz respeito à ingestão de ração e bebida e ao peso do cérebro e do cerebelo, os animais do grupo *Pair-fed* apresentaram resultados semelhantes aos dos animais do grupo Água, pelo que não serão referidos na descrição destes parâmetros.

Em relação à quantidade de ração ingerida, a ANOVA demonstrou que as variações ao fim da 1ª semana eram dependentes do factor tratamento ($F_{4,10} = 56,30$; $p < 0,0001$). A análise *post-hoc* mostrou que os animais dos grupos Etanol

e Etanol+CP eram responsáveis por esta diferença, tendo ingerido aproximadamente menos 35% de ração em relação aos animais dos grupos Água e Água+CP ($p < 0,001$). Estas diferenças entre os grupos experimentais mantiveram-se ao longo de toda a experiência.

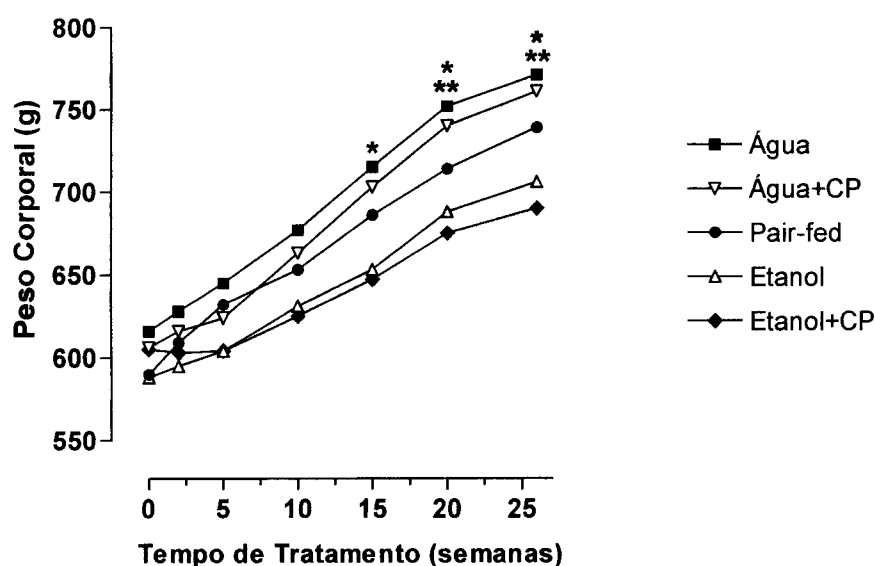


Figura 1 – Evolução do peso corporal médio dos animais dos diferentes grupos experimentais, durante as 26 semanas de tratamento. Os resultados representam a média dos pesos dos animais sujeitos aos diferentes tratamentos. * Etanol e Etanol+CP vs Água, $p < 0,05$; ** Etanol+CP vs Água+CP, $p < 0,05$.

No que diz respeito à bebida ingerida, a ANOVA mostrou que, tal como para a ração, se verificaram logo a partir da 1ª semana de tratamento diferenças nas quantidades ingeridas pelos vários grupos experimentais ($F_{4,9} = 63,29$; $p < 0,0001$). O teste Newman-Keuls revelou que os ratos dos grupos Etanol e Etanol+CP eram significativamente diferentes dos restantes grupos ($p < 0,001$), ingerindo quantidades inferiores em cerca de 50%. Esta redução foi observável ao longo de todo o período experimental.

Cada animal dos grupos Etanol e Etanol+CP bebeu em média 20,4 e 22,2 ml por dia, respectivamente, ao longo de todo o período experimental. Esta ingestão

correspondeu a uma quantidade de 5,0 g (35 kcal) e 5,5 g (38 kcal) de etanol por kg de peso corporal por dia.

As quantidades médias de ração, de bebida e de etanol ingeridas pelos vários grupos ao longo das 26 semanas de tratamento, encontram-se resumidas na **tabela 1**.

Tratamento	Ração (g/dia)	Bebida (ml/dia)	Etanol (g/kg p.c./dia)
Água	30,24±1,04	44,77±1,97	-
Água+CP	32,01±0,86	42,77±1,77	-
Etanol	20,43±0,73	20,41±0,96	4,99±0,30
Etanol+CP	20,31±0,81	22,18±1,36	5,47±0,41

Tabela 1 – Quantidade média de ração, de bebida e de etanol ingerida nas 26 semanas de tratamento pelos animais dos diferentes grupos. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão.

As alcoolémias dos animais do grupo Etanol determinadas entre as 20 e as 24 horas apresentaram valores médios de 0,50±0,30 g/l (0,25 a 0,90 g/l).

A ANOVA mostrou não haver efeito significativo do tratamento ($F_{3,20} = 1,41$; $p = 0,27$) no peso médio do cérebro dos animais dos grupos Água, Água+CP, Etanol e Etanol+CP (1,53 a 1,59 g). Da mesma maneira, a aplicação da análise de variância não revelou a existência de efeito significativo do tratamento ($F_{3,20} = 1,18$; $p = 0,34$) no peso médio do cerebelo dos animais pertencentes aos mesmos grupos (0,56 a 0,60 g).

1.2. Tratamento de animais com VP. No início da experiência os animais dos grupos VP, *Pair-fed* VP e Etanol+Glicose apresentavam peso corporal médio de 729±69 g. No final das 2 primeiras semanas de experiência, todos os animais apresentaram uma redução ponderal, sendo esta muito mais acentuada nos animais dos grupos VP e *Pair-fed* VP (**Fig. 2**). Após as duas primeiras semanas

houve uma adaptação dos animais ao novo regime. Apesar destas diferenças na variação ponderal média no início do tratamento, somente à 26ª semana se verificou uma diferença significativa nos pesos corporais dos ratos dos diferentes grupos experimentais dependente do factor tratamento ($F_{2,12} = 5,35$; $p < 0,02$). O teste Newman-Keuls mostrou que o peso dos ratos pertencentes ao grupo Etanol+Glicose era inferior ao dos animais pertencentes aos grupos VP ($p < 0,05$) e *Pair-fed* VP ($p < 0,05$) (Fig. 2).

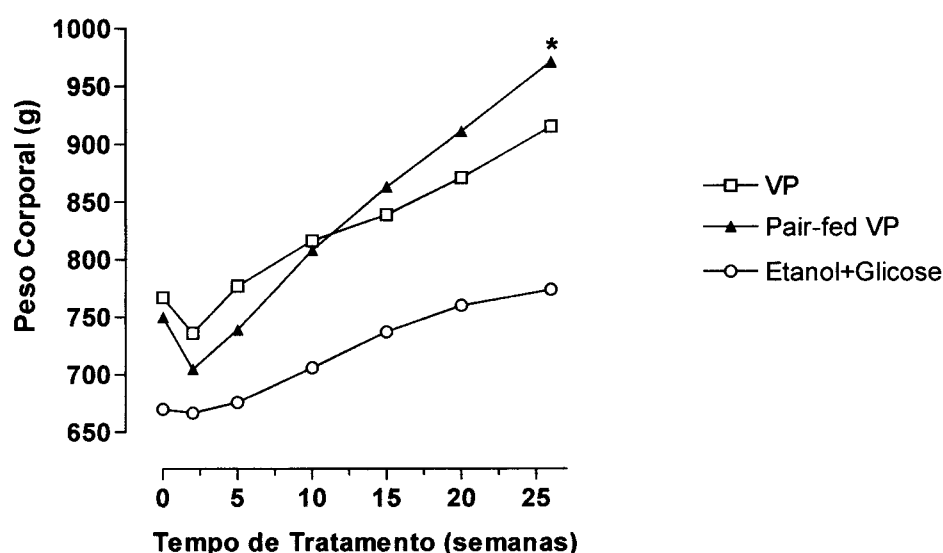


Figura 2 – Evolução do peso corporal médio dos animais dos grupos VP, *Pair-fed* VP e Etanol+Glicose, durante as 26 semanas de tratamento. Os resultados representam a média dos pesos dos animais sujeitos aos diferentes tratamentos. * VP e *Pair-fed* VP vs Etanol+Glicose, $p < 0,05$.

Ao longo de todo o tratamento, a ANOVA demonstrou que a quantidade de ração ingerida era dependente do factor tratamento. A análise *post-hoc* mostrou que o grupo Etanol+Glicose era responsável por esta diferença, tendo ingerido uma quantidade de ração significativamente inferior (cerca de 15% menos) em relação aos grupos VP e *Pair-fed* VP ($p < 0,001$).

Em relação à bebida ingerida pelos animais dos diferentes grupos experimentais, a ANOVA mostrou que as quantidades ingeridas ao fim das primeiras semanas de

experiência eram também diferentes ($F_{2,12} = 17,94$; $p = 0,0002$). O teste Newman-Keuls revelou que todos os grupos ingeriram quantidades de bebida significativamente diferentes entre si. O grupo VP ingeriu mais cerca de 30% e o grupo *Pair-fed* VP mais cerca de 40% que o grupo Etanol+Glicose. Esta diferença na ingestão entre os grupos foi observável ao longo de toda a experiência.

Ao longo das 26 semanas de tratamento, cada animal dos grupos VP e Etanol+Glicose bebeu em média 35,2 e 25,1 ml por dia, respectivamente. Esta ingestão correspondeu a uma quantidade diária de 6,7 g (47 kcal) e 5,5 g (39 kcal) de etanol por kg de peso corporal, respectivamente.

A **tabela 2** apresenta um resumo das quantidades médias de ração, de bebida e de etanol ingeridas pelos vários grupos ao longo das 26 semanas de tratamento.

Grupo	Ração (g/dia)	Bebida (ml/dia)	Etanol (g/kg/dia)
<i>Pair-fed</i> VP	23,19±0,99	40,41±3,67	-
VP	23,16±1,56	35,19±4,37	6,70±0,79
Etanol+Glicose	19,57±0,59	25,12±1,66	5,53±0,53

Tabela 2 – Quantidade média de ração, de bebida e de etanol ingeridas nas 26 semanas de tratamento pelos animais dos grupos VP, *Pair-fed* VP e Etanol+Glicose. Os resultados representam a média ± desvio padrão.

Apesar desta ingestão diária de etanol, as alcoolémias dos animais dos grupos VP e Etanol+Glicose, determinadas entre as 20 e as 24 horas, foram em média de $0,05 \pm 0,03$ (0,01 a 0,09 g/l) e $0,11 \pm 0,09$ g/l (0,05 a 0,24 g/l), respectivamente.

A ANOVA mostrou não haver efeito significativo do tratamento ($F_{2,12} = 0,05$; $p = 0,95$) no peso médio do cérebro dos animais dos grupos VP, *Pair-fed* VP e Etanol+Glicose (1,61 a 1,62 g). Da mesma forma, a aplicação da análise de variância não revelou a existência de efeito significativo do tratamento ($F_{2,12} = 0,65$; $p = 0,54$) nas variações no peso médio do cerebelo (0,66 a 0,69 g) dos animais pertencentes aos mesmos grupos.

2. Análise morfométrica do volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina e pelo compartimento lisossômico

2.1. Tratamento de animais com etanol e com CP. Os resultados morfométricos do grupo *Pair-fed* revelaram-se muito semelhantes aos do grupo de animais tratados com Água, razão pela qual só os resultados relativos a este último grupo serão evidenciados nos resultados.

A ANOVA mostrou que o volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina era dependente do factor tratamento nas células de Purkinje ($F_{3,12} = 29,07$; $p < 0,0001$), células piramidais de CA1 ($F_{3,20} = 10,26$; $p = 0,0003$) e células piramidais de CA3 ($F_{3,18} = 18,21$; $p < 0,0001$). O teste de Newman-Keuls revelou que nos animais do grupo Etanol, os valores do volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina nas três populações neuronais estudadas foram significativamente superiores em relação aos restantes grupos experimentais. Mais especificamente, nas células de Purkinje o volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina foi superior ao dos outros grupos analisados ($p < 0,001$) sendo a percentagem de aumento de 62,3% quando comparado com o grupo Água, de 69,2% em relação ao grupo Água+CP e de 44,7% em relação ao grupo Etanol+CP. Verificou-se uma situação semelhante nas células piramidais de CA3, em que o volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina foi também superior ao dos restantes grupos ($p < 0,001$) sendo o aumento percentual de 60,0%, 69,8% e 56,8% quando comparado com os grupos Água, Água+CP e Etanol+CP, respectivamente. Nas células piramidais de CA1 dos animais tratados com Etanol, o volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina foi também superior ao dos grupos tratados com Água e Água+CP ($p < 0,001$) com aumentos percentuais de 79,6%

e 87,4%, respectivamente, e Etanol+CP ($p < 0,05$), observando-se em relação a este grupo um aumento percentual de 32,6% (Figs. 3 e 4).

O teste de Newman-Keuls permitiu verificar que em nenhum dos tipos celulares existiam diferenças estatisticamente significativas quando comparados os animais pertencentes aos grupos tratados com Água, Água+CP e Etanol+CP, embora se verificasse um aumento aparente da acumulação de lipofuscina no grupo Etanol+CP.

A análise de variância revelou que o tratamento não teve influência no volume citoplasmático ocupado pelo compartimento lisossômico (Tabela 3) nas células de Purkinje ($F_{3,12} = 2,23$; $p = 0,138$), células piramidais de CA1 ($F_{2,20} = 3,05$; $p = 0,053$) e nas células piramidais de CA3 ($F_{3,18} = 2,14$; $p = 0,131$).

Tratamento	Células de Purkinje (μm^3)	Células piramidais de CA1 (μm^3)	Células piramidais de CA3 (μm^3)
Água	53,73 $\pm$ 9,12	3,91 $\pm$ 1,77	22,88 $\pm$ 7,33
Água+CP	44,98 $\pm$ 11,11	5,03 $\pm$ 1,85	13,57 $\pm$ 3,71
Etanol	46,32 $\pm$ 11,78	4,11 $\pm$ 1,42	16,25 $\pm$ 6,70
Etanol+CP	35,68 $\pm$ 6,97	6,72 $\pm$ 2,09	14,78 $\pm$ 7,00

Tabela 3 – Efeito dos diferentes tratamentos crônicos (6 meses) com etanol (20%, v/v) e com catequinas e procianidinas oligoméricas (CP, 200 mg/l) no volume citoplasmático ocupado pelo compartimento lisossômico (μm^3) nos três tipos de neurónios estudados. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 4-6$).

Foram ainda comparados os volumes neuronal, nuclear e citoplasmático dos três tipos de neurónios dos diferentes grupos experimentais (resultados não incluídos), mas a ANOVA revelou que estes parâmetros não eram dependentes do tratamento.

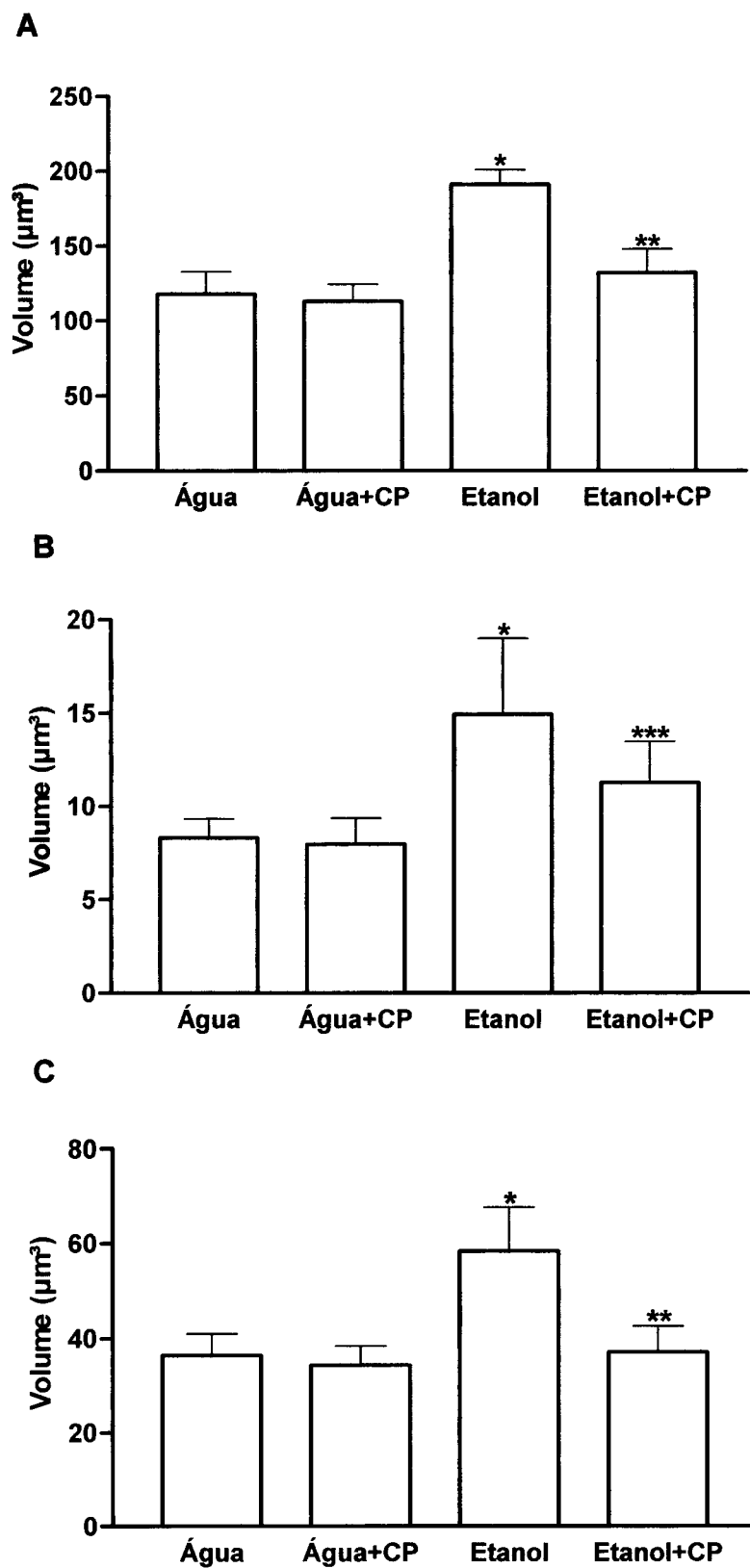


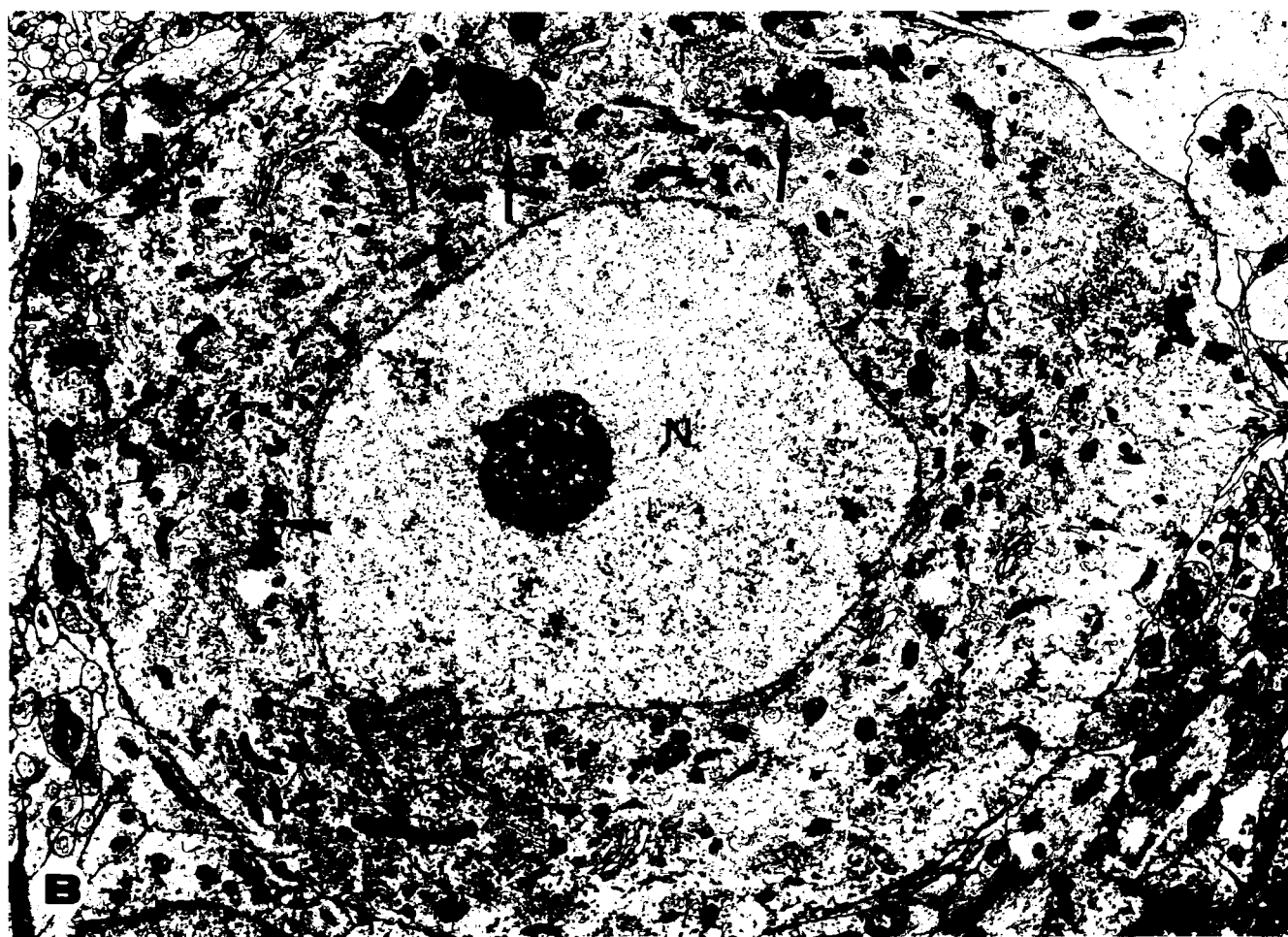
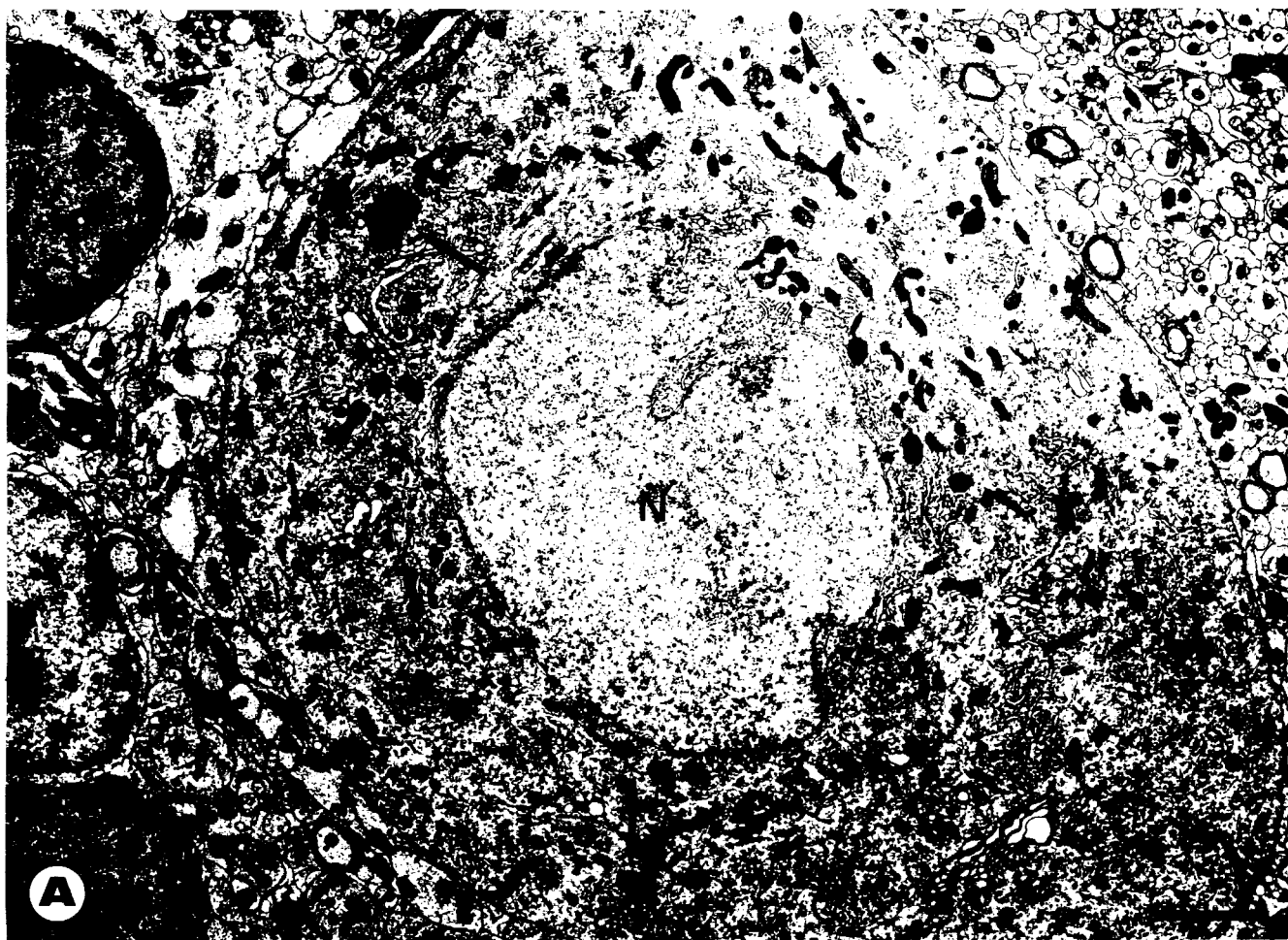
Figura 3 – Volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina (μm^3) nos três tipos de neurónios estudados nos grupos Água, Água+CP (200 mg/l), Etanol (20%, v/v) e Etanol+CP. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 4-6$). **A** – Células de Purkinje. **B** – Células piramidais de CA1. **C** – Células piramidais de CA3. * $p < 0,001$ vs Água e Água+CP; ** $p < 0,001$ vs Etanol; *** $p < 0,05$ vs Etanol.

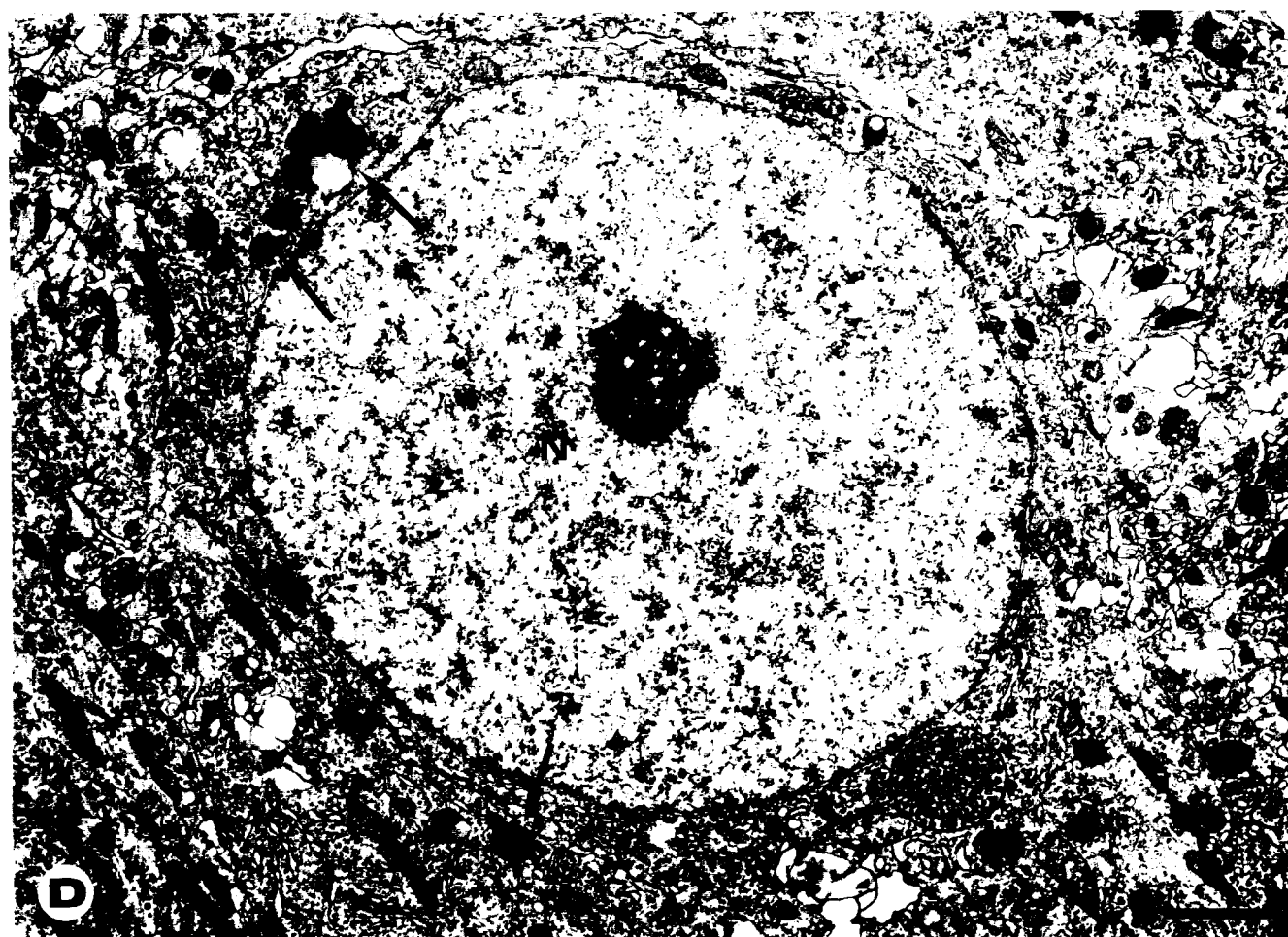
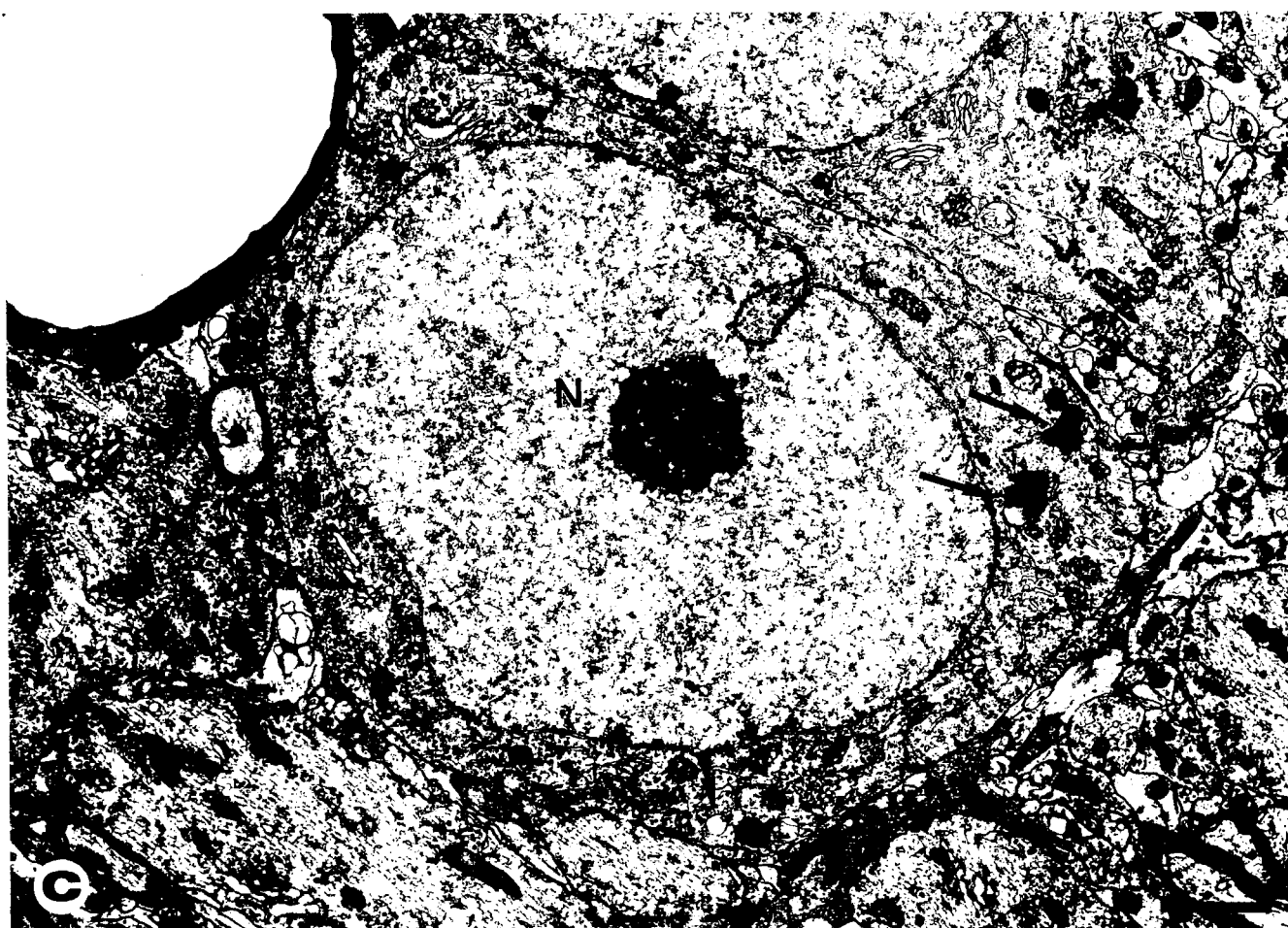
2.2. Tratamento de animais com VP. O tratamento dos animais com vinho do Porto conduziu a efeitos distintos no volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina nas diferentes populações neuronais estudadas. Nas células piramidais de CA1 e CA3 verificou-se um aumento significativo de 31% ($p < 0,05$) e de 35% ($p < 0,05$), respectivamente, na acumulação de lipofuscina do grupo VP em relação ao controlo nutricional *Pair-fed* VP. Por outro lado, embora se verificasse uma clara tendência no mesmo sentido nas células de Purkinje (22% de aumento), este resultado não atingiu significado estatístico. Resultados preliminares sobre a avaliação do efeito do tratamento com Etanol+Glicose nas células de CA3, revelaram que a acumulação de lipofuscina foi significativamente superior em 22% e 66% neste grupo quando comparado com os grupos VP e *Pair-fed* VP, respectivamente (Figs. 4 e 5).

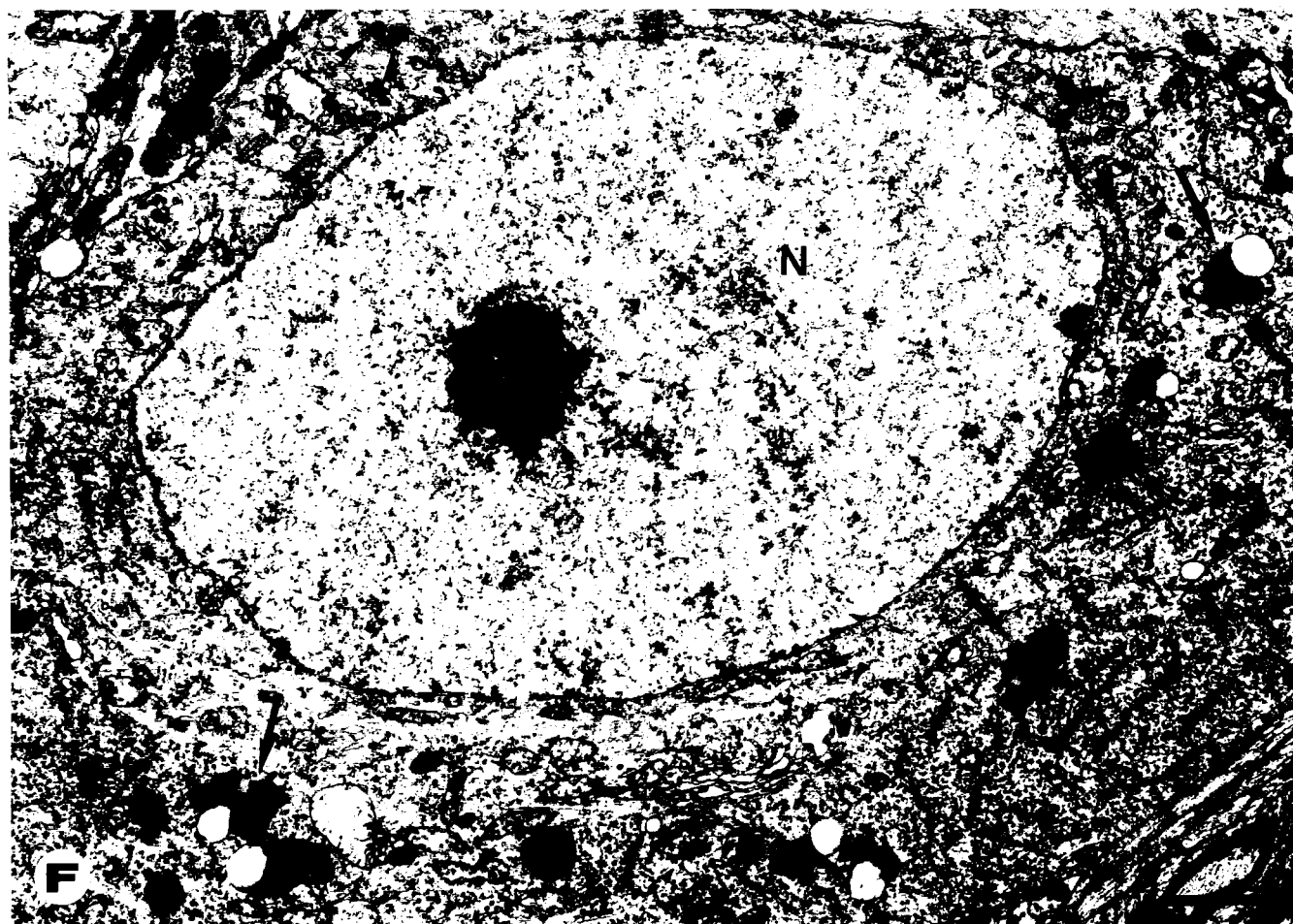
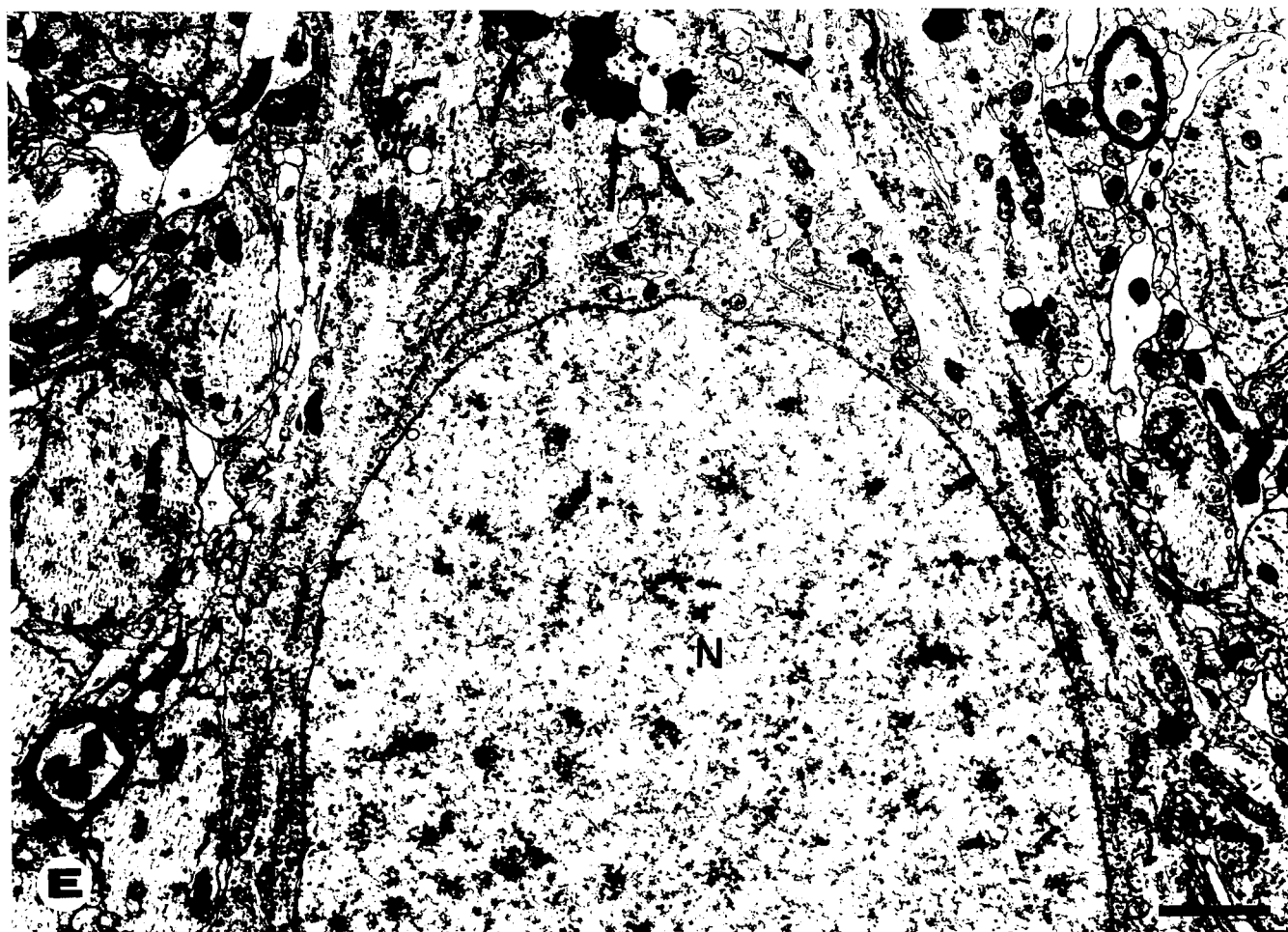
No que diz respeito ao volume citoplasmático ocupado pelo compartimento lisossómico (Tabela 4) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas dependentes do tratamento nas células de Purkinje, piramidais de CA1 e de CA3.

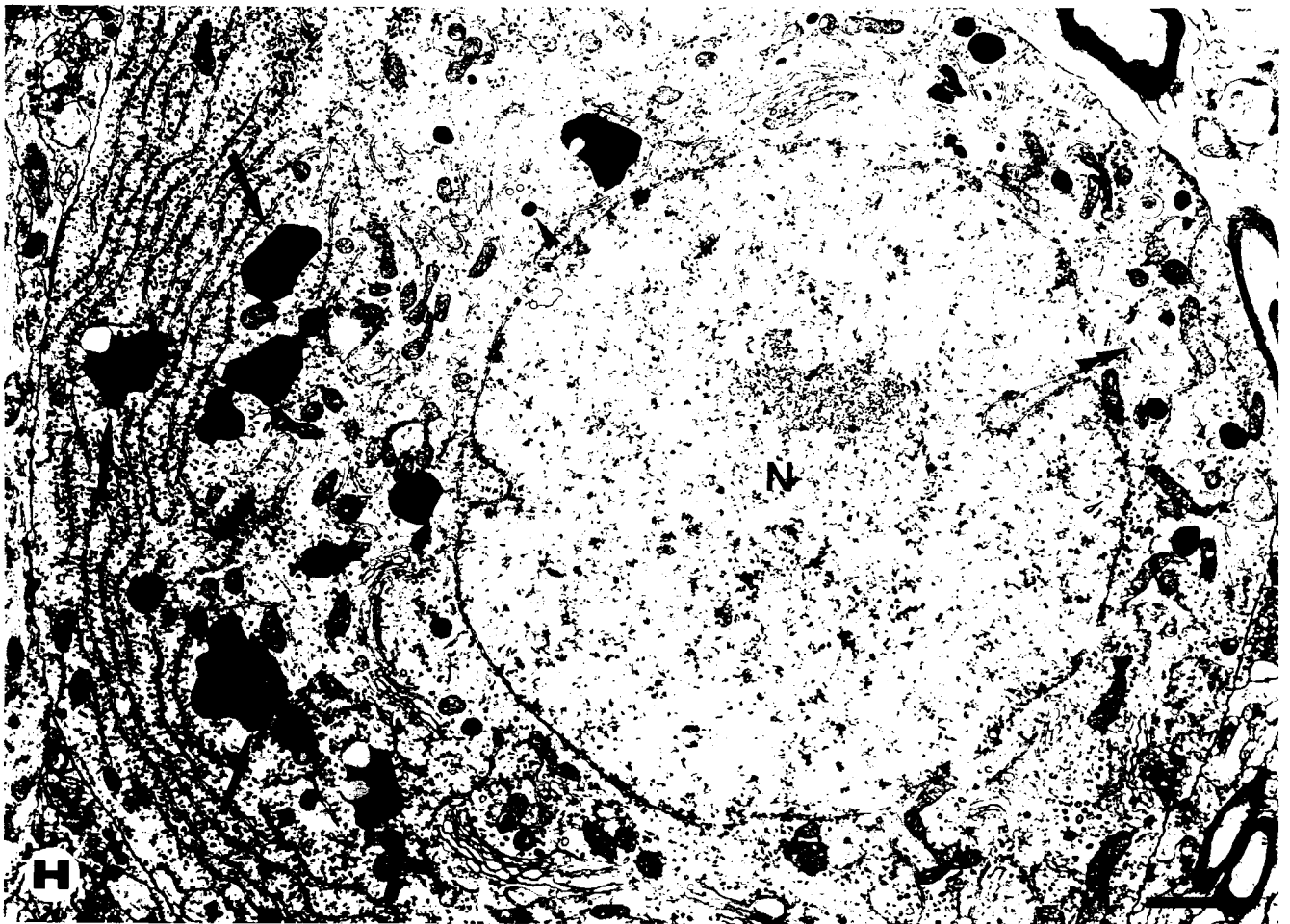
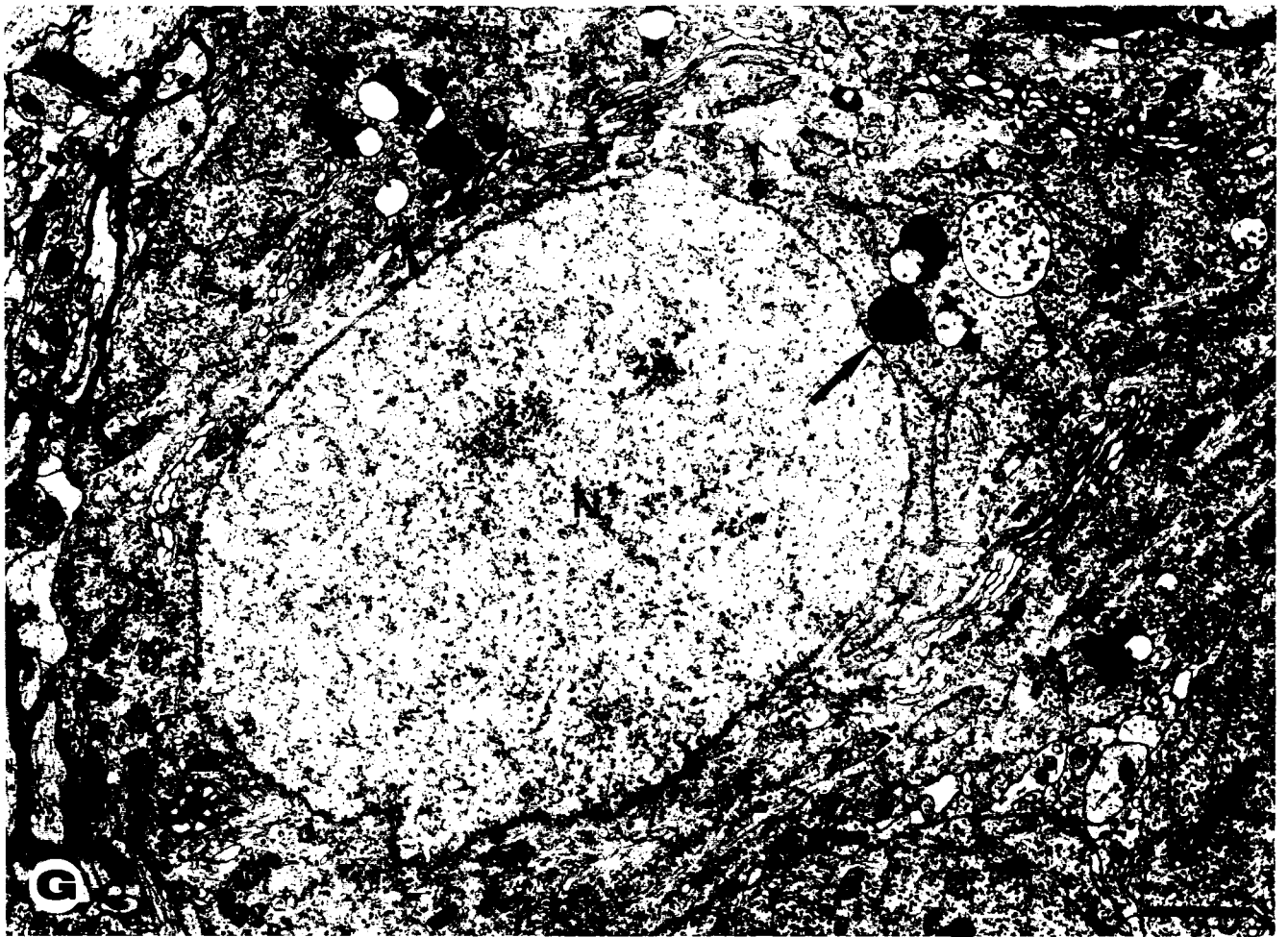
Figura 4 – A e B – Fotografias de microscopia electrónica de células de Purkinje do cerebelo representativas de animais pertencentes aos grupos Água (A) e VP (B). Barras = 2,4 μm . **C e D** – Fotografias de microscopia electrónica de células piramidais da subdivisão CA1 da formação do hipocampo representativas de animais pertencentes aos grupos Água+CP (C) e Etanol (D). **E, F, G e H** – Fotografias de microscopia electrónica de células piramidais da subdivisão CA3 da formação do hipocampo representativas de animais pertencentes aos grupos Etanol+CP (E), Etanol (F), *Pair-fed* VP (G) e Etanol+Glicose (H). Barras = 1,6 μm .

Setas – grânulos de lipofuscina; cabeças de seta – lisossomas; duplas cabeças de seta – corpos multivesiculares; N – núcleo.









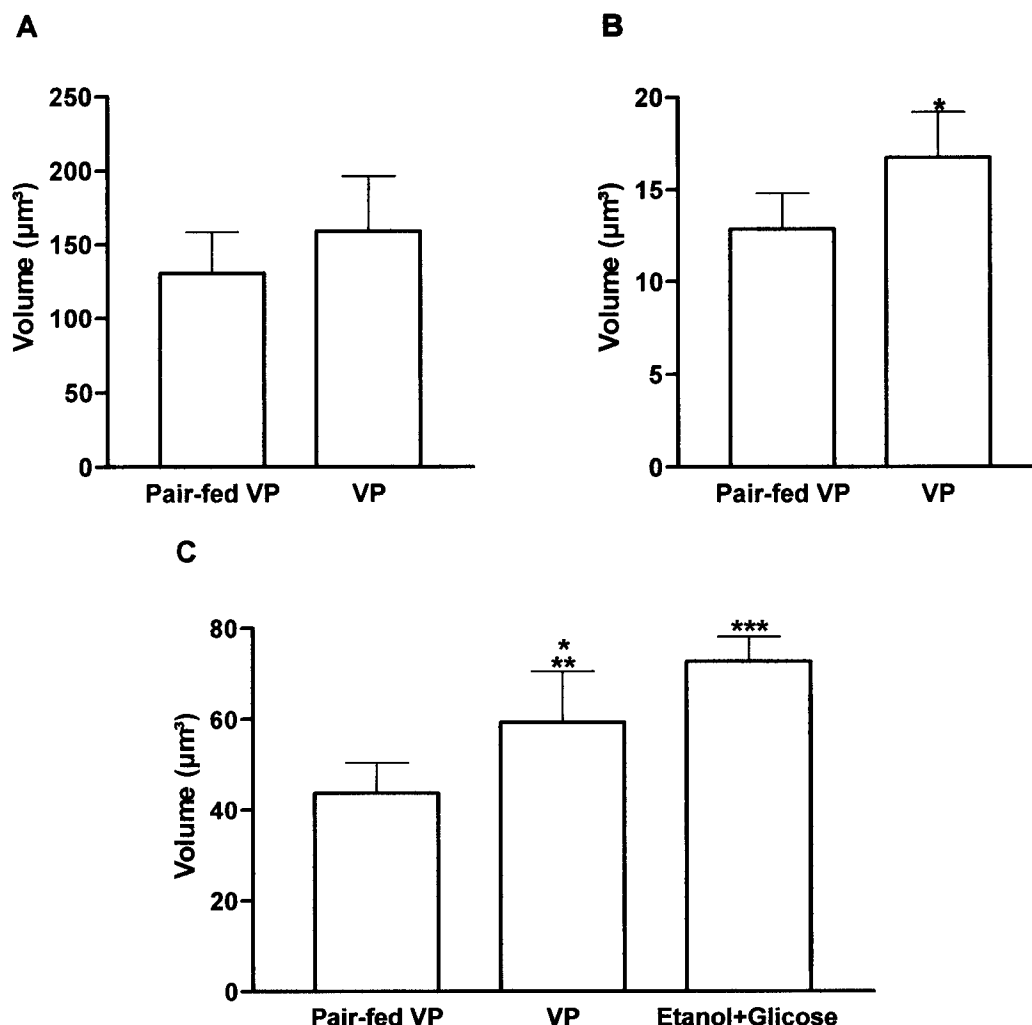


Figura 5 – Volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina (μm^3) nos três tipos de neurónios estudados nos grupos *Pair-fed VP*, *VP* e *Etanol+Glicose* (20% de etanol, v/v, e 90 g/l de glicose). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). **A** – Células de Purkinje. **B** – Células piramidais de CA1. **C** – Células piramidais de CA3. * $p < 0,05$ vs *Pair-fed VP*; ** $p < 0,05$ vs *Etanol+Glicose*; *** $p < 0,001$ vs *Pair-fed VP*.

Tratamento	Células de Purkinje (μm^3)	Células piramidais de CA1 (μm^3)	Células piramidais de CA3 (μm^3)
<i>Pair-fed VP</i>	43,73 $\pm$ 13,80	6,66 $\pm$ 2,64	18,36 $\pm$ 6,76
<i>VP</i>	35,13 $\pm$ 15,97	6,05 $\pm$ 1,60	13,95 $\pm$ 3,58
<i>Etanol+Glicose</i>	-	-	15,21 $\pm$ 6,18

Tabela 4 – Efeito do tratamento crónico (6 meses) com vinho do Porto (VP) no volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina (μm^3) nos três tipos de células estudados. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

Não se verificou efeito significativo do tratamento nos volumes neuronal, nuclear e citoplasmático em qualquer das populações neuronais estudadas (resultados não incluídos).

DISCUSSÃO

A lipofuscina é um pigmento encontrado no citoplasma de algumas células com períodos de vida longos como os neurónios e as células musculares cardíacas (16), nas quais é um biomarcador importante das lesões celulares associadas com o envelhecimento (19, 63, 64) e com o consumo crónico de etanol (12-14).

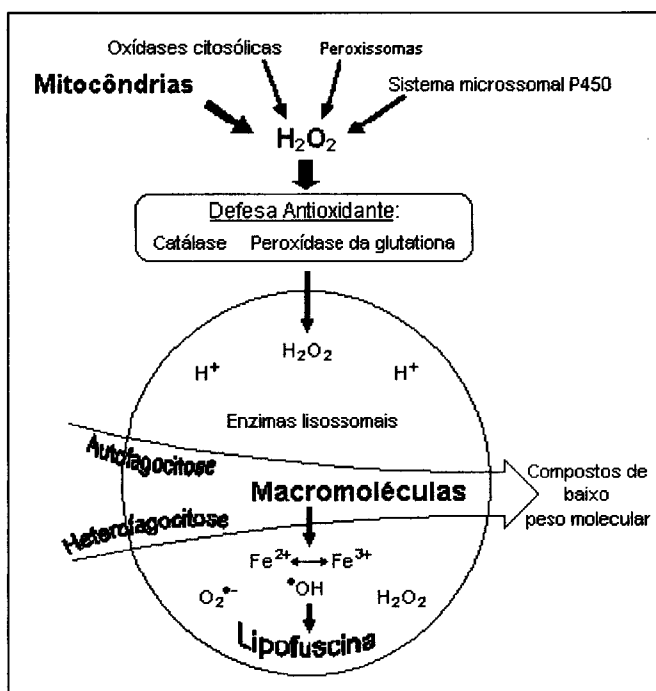
Neste estudo, avaliou-se do ponto de vista morfométrico, a deposição deste pigmento em populações neuronais do cerebelo e da formação do hipocampo em ratos sujeitos a diferentes situações experimentais. Como resultado principal, verificou-se que o tratamento crónico dos animais com uma solução de etanol a 20% (v/v) induziu o aumento da acumulação de lipofuscina em células de Purkinje e em células piramidais de CA1 e CA3 da formação do hipocampo e que a suplementação da solução etanólica com catequinas e procianidinas oligoméricas na concentração de 200 mg/l foi capaz de impedir esse aumento de deposição.

As células neuronais do SNC, com uma taxa de renovação quase nula, são particularmente susceptíveis à acumulação de lipofuscina (19, 64). Por um lado, os neurónios possuem um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados, substratos de reacções de peroxidação lipídica geradoras de espécies reactivas e com potencial oxidativo, e por outro têm escassez relativa de defesas antioxidantes, protectoras contra a toxicidade dos agentes gerados (17, 65, 66). Para além disso, o SNC é muito irrigado, o que proporciona uma elevada taxa de oxigenação favorecedora de um ambiente oxidante (48, 67).

O mecanismo de génese da lipofuscina ainda não está completamente elucidado, embora existam várias hipóteses que o pretendem explicar. Uma das teorias mais interessantes e recentes enunciada por Brunk e Terman (16) afirma que durante o metabolismo normal da célula se geram grandes quantidades de peróxido de

hidrogénio proveniente principalmente das reacções mitocondriais, das oxidasas citosólicas, dos peroxissomas e do sistema microssomal P450 (63). Além disso, nos lisossomas a degradação dos componentes celulares gera um ambiente redutor (16, 68), com abundância de ferro proveniente da degradação de ferritina e outras metaloproteínas. O peróxido de hidrogénio formado, atravessa facilmente a membrana lipídica dos lisossomas onde, em contacto com o ferro, pode proporcionar a ocorrência de reacções de Fenton com formação de radicais hidroxilo (16, 63, 66, 69). Nos lisossomas, estes radicais provocam a oxidação dos materiais neles contidos, nomeadamente alterações enzimáticas com prejuízo da sua função normal. Da oxidação dos compostos presentes no interior dos lisossomas, resulta a formação de aldeídos que reagem com grupos amina de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, formando bases de Schiff (16, 17, 19, 70). Estas são responsáveis pelas propriedades de autofluorescência da lipofuscina e constituem um material incapaz de ser degradado pelas enzimas lisossomais, acumulando-se, portanto, no seu interior (16, 64, 71) (**Fig. 6**).

Figura 6 – Esquema da formação da lipofuscina. Os lisossomas contêm numerosas enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de inúmeras moléculas. Algumas macromoléculas contendo ferro quando degradadas libertam Fe^{2+} que juntamente com o H_2O_2 levam à formação de radicais hidroxilo indutores de reacções de peroxidação e formação de material não degradável – lipofuscina. Adaptado de Brunk e Terman (16).



O etanol contribui para este processo e é capaz de o acelerar, principalmente por induzir a peroxidação lipídica aumentando a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a depleção de antioxidantes, especialmente de vitaminas C e E (17, 72, 73), com consequente deposição de lipofuscina. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram precisamente este fenómeno, já que foi possível verificar o aumento da deposição deste pigmento no grupo de animais tratado com etanol, em células de Purkinje e em células piramidais de CA1 e CA3 da formação do hipocampo. Estes resultados são consistentes com os descritos em trabalhos prévios efectuados no Instituto de Anatomia nas mesmas populações neuronais (6, 12, 13).

Para além da peroxidação lipídica, existem outros mecanismos pelos quais o etanol poderá actuar de forma a promover a formação de compostos oxidativos, nomeadamente pelo aumento da actividade das enzimas cicloxigenase (COX-2), síntase do monóxido de azoto, fosfolípase A2 (PLA2) e oxidase da xantina, e ainda por interferir na homeostasia do cálcio, por exemplo, através da modulação dos receptores do N-metil-*D*-aspartato (NMDA) (5, 47, 48).

Para neutralizar os efeitos das agressões oxidativas, existem nas células vários mecanismos de defesa antioxidante. Estes mecanismos incluem enzimas como a dismútase do superóxido, a catalase e a peroxidase da glutathione e ainda defesas não enzimáticas como a glutathione e as vitaminas C e E. No entanto, as capacidades de defesa são facilmente esgotadas devido ao aumento da produção de ROS, tornando-se insuficientes para evitar as lesões celulares (66, 74). A este nível, a alimentação surge como uma importante forma de melhorar as reservas em defesas antioxidantes, já que os antioxidantes da dieta têm um efeito aditivo na protecção contra as lesões oxidativas (66, 75).

De forma a tentar esclarecer o papel de alguns antioxidantes provenientes da alimentação na protecção das lesões oxidativas induzidas pelo etanol em neurónios do SNC, procedeu-se à suplementação das bebidas dos animais (Água ou 20% de Etanol, v/v) com extracto polifenólico das grainhas das uvas na concentração de 200 mg/l (Água+CP e Etanol+CP). Os principais componentes deste extracto, catequinas e procianidinas oligoméricas (CP), são flavonóides pertencentes à classe dos 3-flavanóis (40, 76, 77) que demonstraram possuir uma forte actividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (38, 45, 74, 76, 78). Estes compostos encontram-se maioritariamente em vegetais, frutos e bebidas, especialmente no vinho tinto (74, 76, 77, 79, 80). Estas moléculas de baixo peso molecular, após ingestão são parcialmente absorvidas e distribuídas pelos tecidos corporais (77, 79, 81, 82) e existem evidências de que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e exercer efeitos no SNC (83, 84).

No modelo experimental utilizado, os animais tratados com Água e Água+CP tiveram uma ingestão de ração superior, o que se reflectiu em pesos corporais mais elevados em relação aos grupos tratados com Etanol e Etanol+CP. Estes dois últimos grupos de ratos ingeriram uma menor quantidade de ração e de bebida e, conseqüentemente, apresentaram menor peso corporal ao longo do tratamento. Por um lado, a energia fornecida pelo etanol da bebida diminuiu a necessidade de ingestão energética a partir da ração. Por outro lado, o etanol também provoca uma sensação gustativa desagradável, o que resulta na diminuição da procura de ração e de bebida pelos animais (6, 85, 86).

A adição de CP à solução de etanol, resultou na redução da deposição de lipofuscina nas células de Purkinje do cerebelo e nas células piramidais de CA1 e CA3 da formação do hipocampo, em comparação com os ratos que consumiram etanol isoladamente. Esta diminuição, sugere a existência de um efeito protector

por parte destes compostos face aos eventos celulares potenciados pelo etanol e envolvidos na génese da lipofuscina. Esta acção poderá estar relacionada com os diversos efeitos antagónicos dos polifenóis em relação ao etanol. São exemplos destes efeitos, o sequestro directo de radicais livres, a inibição das enzimas COX-2, oxídase da xantina, síntase do monóxido de azoto e citocromo P450 2E1, inibição da peroxidação lipídica das membranas e a diminuição do influxo de Ca^{2+} (40, 49, 74, 75, 87-90).

Os polifenóis podem possuir ainda outros efeitos que poderão exercer citoprotecção e contribuir para atenuar as lesões induzidas pelo etanol. É o caso do sequestro de metais, da inibição da fosfolípase C e da intervenção nas cascatas de sinalização intracelular (76, 84, 88, 89, 91).

Deste modo, as lesões observadas a nível cerebral resultantes da ingestão de uma bebida alcoólica poderão depender largamente do tipo de matriz bioquímica que veicula o etanol, podendo os efeitos deletérios desta substância serem atenuados, pelo menos parcialmente, em função do conteúdo de polifenóis dessa bebida.

No entanto as CP em solução aquosa, em comparação com o respectivo controlo (Água), não ofereceram protecção contra a acumulação de lipofuscina no mesmo tipo de neurónios. Esta diferença, poderá estar relacionada com alterações mediadas pelo etanol na fluidez das membranas celulares (73, 92, 93) e nas proteínas transmembranares (67), que podem facilitar o acesso dos polifenóis às células neuronais. Para além disso, o efeito das CP poderá ser evidente apenas em situações de desafio oxidativo, uma vez que as defesas antioxidantes normais dos neurónios deverão ser suficientes na ausência de agressão, como também foi sugerido por Sun *et al.* (67) e Sun *et al.* (48). Uma outra hipótese que poderá explicar esta diferença é a possibilidade dos compostos polifenólicos

apresentarem uma maior solubilidade quando adicionados ao etanol do que quando adicionados à água, estando por isso, provavelmente mais disponíveis para absorção intestinal e com biodisponibilidade superior.

As CP parecem ter actuado apenas na existência de uma lesão neuronal com alteração dos mecanismos de defesa antioxidante. Uma situação semelhante já foi descrita com outro composto, o piracetam (2-oxo-pirrolidina-acetamida), um derivado cíclico do ácido γ -amino-butírico (GABA), cuja acção protectora no mesmo modelo experimental de alcoolismo crónico (6, 8) levou igualmente a uma redução na acumulação de lipofuscina nos neurónios do cerebelo e da formação do hipocampo. Foi sugerida, entre outras, a hipótese de que o efeito desta substância se basearia numa acção protectora e estabilizadora das membranas celulares, bem como na estimulação da actividade enzimática ao nível dos lisossomas (6, 8).

O vinho do Porto (VP) é um vinho tinto com quantidades de etanol (anexo 1) e de CP (46) semelhantes às testadas no grupo Etanol+CP. Por esta razão, colocou-se a hipótese de que o VP poderia exercer o mesmo tipo de protecção observada após o tratamento crónico dos animais com a solução alcoólica de polifenóis. No entanto, e em contraste com os resultados obtidos neste último grupo, o VP não foi capaz de reduzir a deposição de lipofuscina nos neurónios estudados. Nas células de Purkinje do cerebelo, o tratamento com VP não teve qualquer efeito quer em comparação com o controlo nutricional *Pair-fed* VP, quer em comparação com os animais tratados com Etanol. Nas células piramidais de CA1 e CA3 da formação do hipocampo, verificou-se um aumento da acumulação de lipofuscina nos animais tratados com VP em relação ao grupo *Pair-fed* VP, demonstrando assim que o valor energético ingerido pelos animais não é responsável pelo efeito verificado na acumulação de lipofuscina. Realça-se ainda que o volume de

lipofuscina encontrado nas pirâmides de CA1 e CA3 dos ratos VP era semelhante aos do grupo Etanol.

No entanto e ao contrário do grupo Etanol, no grupo VP não se verificou menor ingestão de bebida, provavelmente devido à presença de um elevado teor de açúcares redutores (cerca de 90 g/l) e também de outros compostos aromáticos que o tornam bastante mais agradável ao paladar dos animais. Por esta razão, os ratos deste grupo ingeriram cerca de 70% mais volume de líquido quando comparados com o grupo Etanol. Assim, os animais do grupo VP ingeriram quantidades de etanol e energia superiores em 35% e 75%, respectivamente, quando comparadas com o grupo Etanol, tendo em conta o seu peso corporal. Também por esta razão, as diferenças nos pesos corporais dos animais destes dois grupos foram muito acentuadas.

Verificou-se uma menor ingestão de ração nos grupos *Pair-fed* VP e VP comparativamente aos grupos Água e Água+CP, pois o conteúdo energético da bebida substitui o da ração. Nos grupos *Pair-fed* VP e VP, a elevada ingestão energética a partir da bebida poderá ainda explicar o seu maior peso corporal em relação aos restantes grupos.

O vinho tinto é uma mistura muito complexa na qual existem várias centenas de compostos (39-41). A sua composição torna-se ainda mais elaborada pela ocorrência de diversas reacções, após o envelhecimento em casco a que alguns vinhos são sujeitos (46). Assim, este envelhecimento proporciona a migração de compostos da madeira para a bebida, como é o caso de taninos altamente polimerizados (76, 94), ou ainda a ocorrência de fenómenos de polimerização dos polifenóis de baixo peso molecular (39) ou complexação com enzimas, glícidos, metais pesados ou outros polímeros, originando moléculas de grandes dimensões (76, 91, 94, 96). Por este facto, os polifenóis presentes no VP poderão encontrar-

se indisponíveis para absorção, o que impedirá que exerçam os seus efeitos no SNC (76, 91). Para além disso, pela elevada densidade de compostos no VP, não se pode pôr de parte a hipótese de que existam nesta bebida outras substâncias com efeitos deletérios para o SNC. Por outro lado, da interacção entre as inúmeras moléculas que compõem o VP pode resultar um efeito fisiológico diferente do que quando estas moléculas se encontram isoladas e purificadas (88, 96-98). Como resultado do balanço destas interacções, a ingestão de vinho poderá resultar no aumento do stress oxidativo em vez de protecção antioxidante. No entanto, há trabalhos que demonstram diversas acções neuroprotectoras de outros polifenóis do vinho como o resveratrol e a quercetina (42, 48, 49, 88, 99-103). Mais especificamente, Wang *et al.* (104) referem que a administração de resveratrol em roedores foi capaz de diminuir a morte de células piramidais de CA1 induzida por lesões cerebrais isquémicas. Existem ainda trabalhos que testaram o efeito dos polifenóis das uvas nas alterações neurodegenerativas induzidas pela administração crónica de etanol. Assim, foi encontrado um efeito protector da suplementação com polifenóis extraídos das uvas em relação à função sináptica e na expressão da COX-2 no cérebro de Rato (47, 67). No Homem, vários estudos epidemiológicos referem ainda uma relação inversa entre o consumo moderado de vinho tinto (150 a 900 ml por semana) e o risco de doenças neurodegenerativas (35, 36, 105).

Como é evidente, no modelo experimental utilizado, o consumo de VP está longe de ser considerado moderado, uma vez que foi a única bebida que os animais tiveram à sua disposição.

O vinho tinto distingue-se do VP principalmente pelo menor teor em etanol (10 a 13 e 20% (v/v), respectivamente) e em açúcares redutores (2 a 4 e 60 a 90 g/l, respectivamente) (anexo 1) (39-41). Este facto poderá contribuir para a

compreensão da discrepância entre os resultados actuais e os trabalhos epidemiológicos que apontam o consumo moderado de vinho tinto como neuroprotector. Na verdade, o elevado teor em açúcares redutores poderá ser responsável por parte do dano oxidativo verificado após o tratamento crónico dos animais com VP.

Investigações recentes demonstram um efeito pro-oxidante do consumo de dietas com elevado conteúdo em açúcares, o que é evidenciado pela diminuição dos níveis circulantes de antioxidantes, pelo aumento da peroxidação lipídica e da produção de radicais livres (106-108). Para além disso, também é referido que este tipo de dieta provoca resistência à acção da insulina, com consequente desregulação dos níveis sanguíneos de glicose (106, 109). Está já bem estabelecido, que a hiperglicémia está envolvida na etiologia de lesões celulares por aumento do stress oxidativo, o que resulta por exemplo, no desenvolvimento de neuropatia diabética (110, 111). Estes processos oxidativos poderão explicar parcialmente o aumento da deposição de lipofuscina nos animais do grupo VP quando comparados com os animais do grupo Etanol+CP.

No entanto, não foi recolhida qualquer informação acerca dos níveis glicémicos dos animais deste estudo. Em trabalhos futuros, seria interessante avaliar este parâmetro pois poderá contribuir para o esclarecimento dos fenómenos associados à deposição de lipofuscina nas células neuronais.

Devido aos possíveis efeitos das elevadas ingestões de monossacarídeos pelos animais do grupo VP na acumulação de lipofuscina nos neurónios destes animais, considerou-se pertinente a inclusão de um novo grupo de animais tratados com solução de etanol (20%, v/v) e glicose (90 g/l) (Etanol+Glicose). Deste grupo apenas se conhecem resultados preliminares da avaliação da acumulação de lipofuscina e das alterações do compartimento lisossómico nas células piramidais

de CA3 da formação do hipocampo. Foi interessante verificar que a acumulação de lipofuscina no citoplasma das células piramidais de CA3 dos animais do grupo Etanol+Glicose foi superior em relação aos restantes grupos experimentais. Como já foi referido, a ingestão de etanol e/ou o excesso de monossacarídeos são lesivos para os tecidos por provocarem o desequilíbrio entre os agentes oxidantes gerados e os antioxidantes protectores (5, 17, 47, 48, 72, 73, 107, 108). Este efeito é então apoiado pelos resultados obtidos com o grupo Etanol+Glicose em que a acção do etanol e da glicose parece ser aditiva na acumulação de lipofuscina nas células piramidais de CA3. Uma vez que existe uniformidade de efeitos nas várias populações neuronais sujeitas aos diferentes tratamentos, é plausível considerar que se observará o mesmo efeito nas células piramidais de CA1 e nas células de Purkinje.

Deste modo, pode-se considerar que o VP, quando comparado com o grupo Etanol+Glicose, apresenta-se protector em relação à acumulação de lipofuscina, uma vez que contém quantidades semelhantes de etanol e de monossacarídeos. Assim, os polifenóis do VP, entre os quais as CP, poderão ser os responsáveis pelo efeito protector observado, já que possuem diversas propriedades que se opõem ao aparecimento e aos efeitos do stress oxidativo (40, 49, 74, 75, 87-90). O facto dos animais tratados com VP terem ingerido cerca de 40% mais bebida que os tratados com Etanol+Glicose (e, conseqüentemente, mais 20% de etanol, tendo em conta o peso corporal dos ratos) enfatiza o eventual efeito protector das CP presentes no VP.

Apesar da monitorização da ingestão de bebida, considerou-se importante efectuar a medição das alcoolémias encontradas após a sua ingestão. Esta medição fornece uma informação mais precisa acerca do eventual dano tecidular induzido pelo etanol do que a dose de etanol administrada (112).

No entanto, embora os ratos tratados com VP tivessem uma ingestão superior de líquidos, a alcoolemia encontrada nestes animais foi significativamente inferior em relação ao grupo tratado com Etanol. Os animais deste último grupo, ingeriram em média 5,0 g de etanol por kg de peso corporal por dia e apresentaram alcoolemias médias de 0,5 g/l, ao passo que os ratos tratados com VP ingeriram 6,7 g de etanol por kg de peso corporal por dia e apresentaram alcoolemias médias de 0,05 g/l. O VP é, como já foi referido, uma bebida com elevado conteúdo em monossacarídeos, nomeadamente em glicose e frutose, o que poderá justificar a diferença entre as alcoolemias encontradas.

Com efeito, existem vários estudos que referem que os diferentes monossacarídeos poderão exercer um efeito indutor da biotransformação do etanol, em extensão variável, dependendo da sua natureza (5, 113, 114). Os alvos desta acção dos monossacarídeos ainda não são bem conhecidos, no entanto, o efeito da frutose poderá estar relacionado, em parte, com o aumento da capacidade de reoxidação do NADH a NAD⁺ necessária para o metabolismo do etanol via ADH (113).

Por outro lado, sabe-se que a presença de alimentos no estômago e a subsequente diminuição da velocidade do esvaziamento gástrico, favorecem o metabolismo do etanol pela ADH gástrica. Deste modo, haverá uma menor quantidade de etanol disponível para absorção o que se irá repercutir em níveis sanguíneos de etanol inferiores (112). De facto, embora o grupo VP tenha ingerido mais ração que o grupo Etanol, esta diferença poderá não ser suficiente para provocar alterações na velocidade do esvaziamento gástrico.

Ainda no que diz respeito às alcoolemias, verificou-se que os animais do grupo Etanol+Glicose, que ingeriram em média 5,5 g de etanol por kg de peso corporal por dia, apresentaram alcoolemias médias de 0,10 g/l, ou seja, superiores às dos

animais tratados com VP e inferiores às dos tratados com Etanol. As diferenças em relação ao grupo Etanol, apoiam a hipótese da indução do metabolismo deste composto por parte dos açúcares redutores do VP, já que a bebida dos animais do grupo Etanol+Glicose continha 90 g/l de glicose, um dos monossacarídeos apontados como responsáveis por esta indução (5, 113, 114).

Na comparação entre o grupo VP e o grupo Etanol+Glicose é necessário ter em conta as diferenças na ingestão de ração e de bebida destes dois grupos. O grupo Etanol+Glicose ingeriu uma quantidade de bebida inferior, o que se reflectiu numa menor ingestão de etanol. Por outro lado, a ingestão de ração neste grupo foi também menor, o que, com base nas diferenças de metabolismo do etanol em função da presença de alimentos e do nível de esvaziamento gástrico (112), poderá justificar parcialmente as diferenças nas alcoolémias entre os grupos VP e Etanol+Glicose. Apesar da quantidade de açúcares redutores nas bebidas fornecidas a estes dois grupos ser semelhante, a diferença entre os teores de glicose e frutose poderá também explicar a discrepância entre os valores das alcoolémias. Com efeito, já foi referido por outros investigadores que a frutose tem um efeito mais acentuado sobre a aceleração do metabolismo do etanol (115) e sabe-se que este monossacarídeo constitui mais de metade dos açúcares do VP (116).

Deste modo, são diversas as hipóteses que poderão estar na base das diferenças entre as alcoolémias dos vários grupos. A hipótese que melhor explicará estas diferenças será, provavelmente a da indução do metabolismo do etanol pelos monossacarídeos do vinho, mas o efeito sobre as alcoolémias poderá ser o resultado do somatório de todas estas influências.

É de notar, que a aceleração do metabolismo do etanol por qualquer um destes mecanismos não é sinónimo de menor agressão tecidular, pois os metabolitos

resultantes da sua biotransformação poderão apresentar toxicidade celular semelhante ou mesmo superior à do próprio etanol (117).

O aumento do volume citoplasmático ocupado pelo compartimento lisossómico pode ser um outro indicador do incremento da actividade oxidativa da célula (9).

No entanto, neste trabalho não se encontrou efeito significativo dos vários tratamentos neste parâmetro, em qualquer dos tipos de neurónios estudados. A discrepância entre estes resultados e os referentes à acumulação de lipofuscina leva-nos a concluir que o volume citoplasmático ocupado pela lipofuscina é um biomarcador de lesão celular mais fiável para as células neuronais estudadas.

Apesar dos resultados obtidos, este estudo deixa ainda muitas questões sem resposta que poderão servir de estímulo a novas pesquisas. A maior parte dos estudos sobre os efeitos protectores do vinho tinto são realizados com vinhos que contêm de 10 a 13% de etanol (v/v) e não possuem açúcares simples na sua constituição. Seria interessante testar este tipo de bebida utilizando este modelo experimental. Para além disso, existem no vinho muitos compostos bioactivos para além das catequinas e procianidinas oligoméricas. Poderia haver interesse em estudar os efeitos de outros componentes do vinho tinto na acumulação de lipofuscina. Este estudo pode ainda motivar novas pesquisas em relação ao papel de outros alimentos ricos em polifenóis, como o chá, a cerveja ou os sumos de fruta, na protecção dos processos neurodegenerativos.

CONCLUSÃO

O consumo crónico e excessivo de etanol tem efeitos nefastos em praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo humano, levando a um desequilíbrio global do metabolismo e alterações na homeostasia, com realce para as alterações morfológicas e funcionais no SNC.

O presente trabalho experimental no Rato e estudos epidemiológicos no Homem parecem indicar que a ingestão de bebidas alcoólicas com elevada densidade de compostos polifenólicos poderão atenuar alguns dos efeitos deletérios associados ao consumo crónico de etanol, ou mesmo atrasar os fenómenos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. É necessário realçar que a potencial acção protectora dos polifenóis existentes no vinho apenas será válida num quadro de consumo moderado de bebida. Apesar deste achado, o aconselhamento do consumo moderado (150 a 300 ml por dia) (39) de bebidas alcoólicas ricas em polifenóis, como medida profiláctica, é problemático numa perspectiva de saúde pública.

Assim, os consumidores habituais de quantidades moderadas de vinho tinto às refeições poderão ser aconselhados a manter o seu padrão de consumo. No entanto, a ingestão de bebidas alcoólicas não deve ser incentivada, principalmente nas gerações mais jovens, pelo elevado risco de abuso e de desenvolvimento de dependência, de forma a contribuir para a diminuição do flagelo social que é o alcoolismo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kupfermann I. (1991) Hypothalamus and limbic system: peptidergic neurons, homeostasis, and emotional behavior. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. Principles of neural science. 3rd ed. New York: Elsevier. p. 735-49.
- (2) Brukner JV, Warren DA. (2001) Toxic effects of solvents and vapors. In: Klaasen CD, editor. Casarett & Doull's Toxicology – The basic science of poisons. 6th ed. New York: McGraw Hill. p. 893-4.
- (3) Neiman J. (1998) Alcohol as a risk factor for brain damage: neurologic aspects. Alcohol Clin Exp Res 22(suppl 7):346S-51S.
- (4) Fadda F, Rossetti ZL. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. Prog Neurobiol 56:385-431.
- (5) Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li T-K, Tabakoff B. (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. Alcohol Clin Exp Res 5:998-1040.
- (6) Paula-Barbosa MM, Brandão F, Pinho MC, Andrade JP, Madeira MD, Cadete-Leite A. (1991) The effects of piracetam on lipofuscin of the rat cerebellar and hippocampal neurons after long-term alcohol treatment and withdrawal: a quantitative study. Alcohol Clin Exp Res 15:834-8.
- (7) Lukoyanov NV, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. (1999) Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal. Physiol Behav 66:337-46.
- (8) Brandão F, Cadete-Leite A, Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. (1996) Piracetam promotes mossy fiber synaptic reorganization in rats withdrawn from alcohol. Alcohol 13:239-49.

- (9) Paula-Barbosa MM, Borges MM, Cadete-Leite A, Tavares MA. (1986) Giant multivesicular bodies in the rat hippocampal pyramidal cells after chronic alcohol consumption. *Neurosci Lett* 64:345-9.
- (10) Tavares MA, Paula-Barbosa MM, Verwer RWH. (1987) Synapses of the cerebellar cortex molecular layer after chronic alcohol consumption. *Alcohol* 4:109-16.
- (11) Tavares MA, Paula-Barbosa MM, Gray EG, Volk B. (1985) Dendritic inclusions in the cerebellar granular layer after long term alcohol consumption in adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 9:45-8.
- (12) Borges MM, Paula-Barbosa MM, Volk B. (1986) Chronic alcohol consumption induces lipofuscin deposition in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 7:347-55.
- (13) Tavares MA, Paula-Barbosa MM. (1983) Lipofuscin granules in Purkinje cells after long-term alcohol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 7:302-6.
- (14) Tavares MA, Paula-Barbosa MM, Barroca H, Volk B. (1985) Lipofuscin granules in cerebellar interneurons after long-term alcohol consumption in the adult rat. *Anat Embryol* 171:61-9.
- (15) Lieber CS. (2000) Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* 20:395-430.
- (16) Brunk UT, Terman A. (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269:1996-2002.
- (17) Sundelin SP, Nilsson SE. (2001) Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31:217-25.
- (18) Constantinides P, Harkey M, McLaury D. (1986) Prevention of lipofuscin development in neurons by anti-oxidants. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 409:583-93.

- (19) Brunk UT, Terman A. (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33:611-9.
- (20) Cadete-Leite A, Pereira PA, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. (2003) Nerve growth factor prevents cell death and induces hypertrophy of basal forebrain cholinergic neurons in rats withdrawn from prolonged ethanol intake. *Neuroscience* 119:1055-69.
- (21) Lukoyanov NV, Brandão F, Cadete-Leite A, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. (2000) Synaptic reorganization in the hippocampal formation of alcohol-fed rats may compensate for functional deficits related to neuronal loss. *Alcohol* 20:139-48.
- (22) Amaral DG, Witter MP. (1995) Hippocampal formation. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. p. 443-93.
- (23) Rosenzweig ES, Barnes CA. (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-79.
- (24) Mattson MP, Chan SL, Duan W. (2002) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev* 82:637-72.
- (25) Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. (2001) Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev* 122:757-78.
- (26) Mattson MP. (2003) Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med* 139:441-4.
- (27) Sun X, Chan LN, Gong X, Sucher NJ. (2003) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist activity in traditional chinese stroke medicines. *Neurosignals* 12:31-8.
- (28) Gluck MR, Jayatilleke E, Shaw S, Rowan AJ, Haroutunian V. (2000) CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. *Epilepsy Res* 39:63-71.

- (29) Watson WH, Cai J, Jones DP. (2000) Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr* 20:485-505.
- (30) Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S, Mayeux R. (1996) Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case-control study. *Ann Neurol* 39:89-94.
- (31) Grant WB, Campbell A, Itzhaki RF, Savory J. (2002) The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4:179-89.
- (32) Sacco RL, Elkind M, Boden-Albala B, Lin I-F, Kargman DE, Hauser WA, Shea S, Paik MC. (1999) The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA* 281:53-60.
- (33) Malarcher AM, Giles WH, Croft JB, Wozniak MA, Wityk RJ, Stolley PD, Stern BJ, Sloan MA, Sherwin R, Price TR, Macko RF, Johnson CJ, Earley CJ, Buchholz DW, Kittner SJ. (2001) Alcohol intake, type of beverage, and the risk of cerebral infarction in young women. *Stroke* 32:77-83.
- (34) Grønbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sørensen TIA. (2000) Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* 133:411-9.
- (35) Mukamal KJ, Kuller LH, Fitzpatrick AL, Longstreth WT Jr, Mittleman MA, Siscovick DS. (2003) Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. *JAMA* 289:1405-13.
- (36) Truelsen T, Thudium D, Grønbaek M. (2002) Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. *Neurology* 59:1313-9.
- (37) Hillbom M. (1998) Alcohol consumption and stroke: benefits and risks. *Alcohol Clin Exp Res* 22(suppl 7):352S-8S.

- (38) Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341:454-7.
- (39) German JB, Walzem RL. (2000) The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr* 20:561-93.
- (40) Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. (1997) Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11:287-313.
- (41) van de Wiele A, van de Griend PHM, Hart HC. (2001) Blessings of the grape. *Eur J Int Med* 12:484-9.
- (42) Virgili M, Contestabile A. (2000) Partial neuroprotection of *in vivo* excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, *trans*-resveratrol in rats. *Neurosci Lett* 281:123-6.
- (43) Mojžišová G, Kuchta M. (2001) Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol Res* 50:529-35.
- (44) de Freitas VAP, Glories Y. (1999) Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *J Sci Food Agric* 79:1601-6.
- (45) da Silva Porto PA, Laranjinha JA, de Freitas VA. (2003) Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochem Pharmacol* 66:947-54.
- (46) Mateus N, Machado JM, de Freitas V. (2002) Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *J Sci Food Agric* 82:1689-95.
- (47) Simonyi A, Woods D, Sun AY, Sun GY. (2002) Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 26:352-7.

- (48) Sun AY, Simonyi A, Sun GY. (2002) The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad Biol Med* 32:314-8.
- (49) Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. (2000) Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol* 131:711-20.
- (50) Michaud J, Lacaze P, Masquelier J. (1971) Fractionnement des oligomères flavanoliques du raisin. *Bull Soc Pharm* 110:111-6.
- (51) de Freitas VAP, Glories Y, Bourgeois G, Vitry C. (1998) Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS). *Phytochemistry* 49:1435-41.
- (52) Palay SL, Chan-Palay V. (1974) Cerebellar cortex. Cytology and organization. Berlin: Springer. p. 322-36.
- (53) Larsell O. (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 97:281-306.
- (54) West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-97.
- (55) Tandrup T, Gundersen HJ, Jensen EB. (1997) The optical rotator. *J Microsc* 186:108-20.
- (56) Madeira MD, Sousa N, Santer RM, Paula-Barbosa MM, Gundersen HJG. (1995) Age and sex do not affect the volume, cell numbers, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J Comp Neurol* 361:585-601.
- (57) West MJ, Gundersen HJG. (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 296:1-22.

- (58) Sterio DC. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134:127-36.
- (59) Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-81.
- (60) Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnostics. *APMIS* 96:379-94.
- (61) Weibel ER. (1980) Stereological methods. Practical methods for biological morphometry, vol. 1. New York: Academic Press.
- (62) Bergmeyer HU. (1965) Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press. p. 285.
- (63) Brunk UT, Jones CB, Sohal RS. (1992) A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat Res* 275:395-403.
- (64) Terman A, Brunk UT. (1998) Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 106:265-76.
- (65) Moosmann B, Behl C. (2002) Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1407-35.
- (66) Halliwell B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52:253-65.

- (67) Sun GY, Xia J, Draczynska-Lusiak B, Simonyi A, Sun AY. (1999) Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *Neuroreport* 10:93-6.
- (68) Pisoni RL, Acker TL, Lisowski KM, Lemons RM, Thoene JG. (1990) A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J Cell Biol* 110:327-35.
- (69) Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716.
- (70) Yin D. (1996) Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med* 21:871-88.
- (71) Marzabadi MR, Sohal RS, Brunk UT. (1991) Mechanisms of lipofuscinogenesis: effect of the inhibition of lysosomal proteinases and lipases under varying concentrations of ambient oxygen in cultured rat neonatal myocardial cells. *APMIS* 99:416-26.
- (72) Mitchell JJ, Paiva M, Heaton MB. (1999) The antioxidants vitamin E and *beta*-carotene protect against ethanol induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures. *Alcohol* 17:163-8.
- (73) Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. (1999) Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Front Biosci* 4:D541-50.
- (74) Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418-25.

- (75) Orellana M, Varela N, Guajardo V, Araya J, Rodrigo R. (2002) Modulation of rat liver cytochrome P450 activity by prolonged red wine consumption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131:161-6.
- (76) Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-33.
- (77) Scalbert A, Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130(suppl 8):2073S-85S.
- (78) Roig R, Cascon E, Arola L, Blade C, Salvado MJ. (1999) Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation *in vivo*. *Life Sci* 64:1517-24.
- (79) Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE. (2000) (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr* 71:103-8.
- (80) King A, Young G. (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 99:213-8.
- (81) Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. (1999) Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 129:1662-8.
- (82) Donovan JL, Kasim-Karakas S, German JB, Waterhouse AL. (2002) Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *Br J Nutr* 87:31-7.
- (83) Mohsen MAAE, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans CA. (2002) Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Rad Biol Med* 33:1693-702.

- (84) Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. (2003) Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. *J Neurochem* 85:180-92.
- (85) Cadete-Leite A, Brandão F, Tajrine D, Antunes S, Ribeiro-da-Silva A, Andrade JP. (1997) Intracerebral grafts promote recovery of the cholinergic innervation of the hippocampal formation in rats withdrawn from chronic alcohol intake. An immunocytochemical study. *Neuroscience* 79:383-97.
- (86) Simonetti P, Cervato G, Brusamolino A, Gatti P, Pellegrini N, Cestaro B. (1996) Effect of red wine consumption on rat liver peroxidation. *Alcohol* 13:41-5.
- (87) Ishige K, Schubert D, Sagara Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med* 30:433-46.
- (88) Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. (2000) The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr* 72:1150-5.
- (89) Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
- (90) Orellana M, Araya J, Guajardo V, Rodrigo R. (2002) Modulation of cytochrome P450 activity in the kidney of rats following long-term red wine exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132:399-405.
- (91) Santos-Buelga C, Scalbert A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agri* 80:1094-117.

- (92) Qu W, Zhang B, Wu D, Xiao B. (1999) Effects of alcohol on membrane lipid fluidity of astrocytes and oligodendrocytes. *Wei Sheng Yan Jiu* 28:153-4.
- (93) Thompson P. (1999) Platelet and erythrocyte membrane fluidity changes in alcohol-dependent patients undergoing acute withdrawal. *Alcohol Alcohol* 34:349-54.
- (94) Diaz-Plaza EM, Reyero JR, Pardo F, Alonso GL, Salinas MR. (2002) Influence of oak wood on the aromatic composition and quality of wines with different tannin contents. *J Agric Food Chem* 50:2622-6.
- (95) del Alamo M, Bernal JL, Gomez-Cordoves C. (2000) Behavior of monosaccharides, phenolic compounds, and color of red wines aged in used oak barrels and in the bottle. *J Agric Food Chem* 48:4613-8.
- (96) Arnous A, Makris DP, Kefalas P. (2001) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J Agric Food Chem* 49:5736-42.
- (97) Maccaglia A, Mallozzi C, Minetti M. (2003) Differential effects of quercetin and resveratrol on Band 3 tyrosine phosphorylation signalling of red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305:541-7.
- (98) Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D. (2000) Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem Pharmacol* 60:1539-48.
- (99) de Ruvo C, Amodio R, Algeri S, Martelli N, Intilangelo A, D'Ancona GM, Esposito E. (2000) Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. *Int J Dev Neurosci* 18:359-66.
- (100) Karlsson J, Emgård M, Brundin P, Burkitt P. (2000) *trans*-Resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from *tert*-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic

resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *J Neurochem* 75:141-50.

(101) Tredici G, Miloso M, Nicolini G, Galbiati S, Cavaletti G, Bertelli A. (1999) Resveratrol, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp Clin Res* 25:99-103.

(102) Sun AY, Sun GY. (2001) Ethanol and oxidative mechanisms in the brain. *J Biomed Sci* 8:37-43.

(103) Melzig MF, Escher F. (2002) Induction of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme activity of SK-N-SH cells *in vitro* by quercetin and resveratrol. *Pharmazie* 57:556-8.

(104) Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY. (2002) Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958:439-47.

(105) McDowell I. (2001) Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Aging* 13:143-62.

(106) Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigne C, Mazur A, Rayssiguier Y. (2003) Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J Nutr* 133:1903-8.

(107) Sakai M, Oimomi M, Kasuga M. (2002) Experimental studies on the role of fructose in the development of diabetic complications. *Kobe J Med Sci* 48:125-36.

(108) Busserolles J, Rock E, Gueux E, Mazur A, Grolier P, Rayssiguier Y. (2002) Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br J Nutr* 87:337-42.

- (109) Shinozaki K, Kashiwagi A, Masada M, Okamura T. (2003) Stress and vascular responses: oxidative stress and endothelial dysfunction in the insulin-resistant state. *J Pharmacol Sci* 91:187-91.
- (110) Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. (2003) Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14(suppl 3):S233-S6.
- (111) Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C. (2003) Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* 28:815-23.
- (112) Livy DJ, Parnell SE, West JR. (2003) Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol* 29:165-71.
- (113) Keegan A, Batey R. (1993) Dietary carbohydrate accelerates ethanol elimination, but does not alter hepatic alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res* 17:431-3.
- (114) Mascord D, Smith J, Starmer GA, Whitfield JB. (1991) The effect of fructose on alcohol metabolism and on the [lactate]/[pyruvate] ratio in man. *Alcohol* 26:53-9.
- (115) Jones AW. (1983) Effects of fructose, glucose, and mixed sugars on ethanol detoxification and blood glucose response in rats. *Med Biol* 61:319-23.
- (116) Peynaud E. (1975) *Connaissance et travail du vin*. Paris: Dunod. p. 34-54.
- (117) Eysseric H, Gonthier B, Soubeyran A, Richard MJ, Daveloose D, Barret L. (2000) Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* 21:117-25.

Anexos

Anexo 1 – Decreto-Lei n.º 166/86	a1
Anexo 2 – Composição detalhada do extracto polifenólico	a9
Anexo 3 – Fotografias de córtex cerebeloso e da formação do hipocampo de Rato	a13
Anexo 4 – Grelha utilizada para a quantificação de lipofuscina, lisossomas, corpos multivesiculares e citoplasma nas células estudadas	a17

ANEXO 1

Decreto-Lei n.º 166/86

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PESCAS E ALIMENTAÇÃO

Decreto-Lei n.º 166/86

de 26 de Junho de 1986

A regulamentação e demarcação da actual Região Demarcada do Douro, que data de 1756, foi objecto de profunda revisão em 1907 e em 1908, particularmente através do Decreto-Lei de 27 de Novembro de 1908, que aprovou o regulamento para o comércio do Vinho do Porto.

Desde então, diversa legislação ou meras orientações têm sido emitidas, visando, nomeadamente, a defesa e valorização da qualidade do Vinho do Porto.

Como consequência destas acções, a regulamentação actual da denominação de origem «Porto» encontra-se dispersa por diversos diplomas legais, o que se traduz em manifesto inconveniente.

Importa, portanto, reunir em diploma único, de uma forma global e sistematizada, a legislação referente à regulamentação do vinho do Porto, introduzindo-se as alterações julgadas convenientes.

Com este procedimento é ainda dada satisfação à necessária adaptação à regulamentação comunitária decorrente dos compromissos assumidos aquando da integração de Portugal na CEE.

Assim:

O Governo decreta, nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 201.º da Constituição, o seguinte:

Artigo único. É aprovado o Regulamento da Denominação de Origem Vinho do Porto, anexo a este Decreto-Lei e dele fazendo parte integrante.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 15 de Maio de 1986. Aníbal António Cavaco Silva - Álvaro Roque de Pinho Bissaia Barreto.

Promulgado em 9 de Junho de 1986.

Publique-se.

O Presidente da República, MÁRIO SOARES.

Referendado em 12 de Junho de 1986.

O Primeiro-Ministro, Aníbal António Cavaco Silva.

ANEXO

Regulamento da Denominação de Origem
Vinho do Porto

CAPÍTULO I

Generalidades

Artigo 1.º

1 - A cultura da vinha na Região Demarcada do Douro fica subordinada às disposições do presente diploma e outros diplomas regulamentares.

2 - Para todos os efeitos legais, são confirmadas como denominações de origem, com as consequências daí resultantes, as designações «Vinho do Porto», «Vin de Porto», «Port Wine», «Porto», «Port» (ou seus equivalentes noutras línguas), as quais só poderão ser usadas, em relação a produtos vínicos, para o vinho generoso que a tradição firmou com esse nome produzido na Região Demarcada do Douro e que satisfaça as exigências estabelecidas neste diploma e na demais legislação em vigor.

3 - Fica proibida a utilização em outros produtos vínicos de nomes, marcas, termos, expressões ou símbolos susceptíveis de, pela sua similitude fonética ou gráfica com os protegidos neste diploma, induzirem a confusão do consumidor, mesmo que precedidos dos termos «tipo», «estilo», «engarrafado em» ou outros análogos.

Artigo 2.º

A defesa da denominação de origem, a aplicação da respectiva regulamentação, a vigilância e cumprimento da mesma, assim como o fomento e controle da qualidade do vinho do Porto, competem ao Instituto do Vinho do Porto.

CAPÍTULO II

Da produção

Artigo 3.º

A região Demarcada do Douro é formada:

No distrito de Vila Real: pelos concelhos de Mesão Frio, Peso da Régua e Santa Marta de Penaguião; pelas freguesias de Alijó, Amieiro, Carlão, Casal de Loivos, Castedo, Cotas, Favaio, Pegarinhos, Pinhão, Sanfins do Douro, Santa Eugénia, São Mamede de Ribatua, Vale de Mendiz, Vilar de Maçada e Vilarinho de Cotas, do concelho de Alijó; pelas freguesias de Candedo, Murça e Noura, do concelho de Murça; pelas freguesias de Celeirós, Covas do Douro, Gouvães do Douro, Gouvinhas, Paradela de Guiães, Provesende, São Cristovão do Douro, Vilarinho de São Romão, São Martinho de Anta, Souto Maior, Paços e Sabrosa do concelho de Sabrosa, e pelas freguesias de Abaças, Ermida, Folhadela, Guiães, Mateus, Nogueira, Vila Real (Nossa Senhora da Conceição), Parada de Cunhos (São Pedro) e Vila Real (São Dinis), do concelho de Vila Real;

No distrito de Bragança: pela freguesia de Vilarelhos, do concelho de Alfândega da Fé; pelas freguesias de Carrazeda de Ansiães, Castanheiro do Norte, Ribalonga, Linhares, Beira Grande, Seixo de Ansiães, Parambos, Pereiros, Pinhal do Norte, Pombal, Lavandeira e Vilarinho da Castanheira, do concelho de Carrazeda de Ansiães; pelas freguesias de Ligares, Poiães, Mazouco e Freixo de Espada à Cinta, do concelho de Freixo de Espada à Cinta; pelas freguesias de Açoreira, Adeganha, Cabeça Boa, Horta, Lousa, Peredo dos Castelhanos, Urros e Torre de Moncorvo, do concelho de Torre de Moncorvo; pelas freguesias de Assares, Lodões, Roios, Sampaio, Santa Comba de Vilarica, Vale Frechoso, Freixiel, Vilarinho das Azenhas e Seixo de Manhoses, pelas Quintas da Peça e

das Trigueiras e pelas propriedades de Vimeiro, situadas na freguesia de Vilas Boas, e Vila Flor, do concelho de Vila Flor; pelas propriedades que foram de D. Maria Angélica de Sousa Pinto Barroso, na freguesia de Frechas, e pelas da Sociedade Clemente Meneres, nas freguesias de Romeu, Avantos, Frechas e Carvalhais, do concelho de Mirandela;

No distrito de Viseu: pelas freguesias de Armamar, Aldeias, Folgosa, Fontelo, Santo Adrião, Vacalar e Vila Seca, do concelho de Armamar; pelas freguesias de Valdigem, Sande, Penajóia, Parada do Bispo, Cambres, Samodães, Ferreiros de Avões, Figueira, Santa Maria de Almacave e Sé e pelas Quintas de Fontoura, do Prado e das Várzeas, na freguesia de Várzea de Abrunhais, do concelho de Lamego; pela freguesia de Barrô, do concelho de Resende; pelas freguesias de Casais do Douro, Ervedosa do Douro, Castanheiro do Sul, Nagozelo do Douro, Sarzedinho, Soutelo do Douro, Espinhosa, Paredes da Beira, Trevões, Val de Figueira, Valongo dos Azeites, Várzea de Trevões, Vilarouco e São João da Pesqueira, do concelho de São João da Pesqueira, e pelas freguesias de Adorigo, Valença do Douro, Barcos, Granjinha, Desejosa, Távora, Pereiro, Sendim, Santa Leocádia e Tabuaço, do concelho de Tabuaço;

No distrito da Guarda: pelo concelho de Vila Nova de Fôz Côa; pela freguesia de Escalhão, do concelho de Figueira de Castelo Rodrigo, e pelas freguesias de Longroiva, Poça do Canto, Fonte Longa e Meda, do concelho de Meda.

Artigo 4.º

As castas autorizadas e recomendadas para a produção de vinho do Porto são as definidas pela Portaria n.º 195/85, de 10 de Abril, sem prejuízo da sua revisão.

Artigo 5.º

1 - As vinhas da Região Demarcada do Douro destinadas à produção de Vinho do Porto deverão estar obrigatoriamente inscritas em registo apropriado, o qual deverá ser mantido actualizado, nos termos da legislação em vigor.

2 - Na classificação das vinhas serão sempre tidos em atenção os seguintes elementos:

- a) Identidade da vinha (concelho, freguesia e lugar);
- b) Nome e residência do proprietário, rendeiro ou parceiro;
- c) Proprietário anterior;
- d) Confrontações;
- e) Vertentes e margens de cursos de água;
- f) Natureza do terreno;
- g) Inclinação do terreno (em graus);
- h) Altitude (mínima, máxima e média ponderada);
- i) Compasso médio, altura dos bardos, ramada;
- j) Área plantada, anotando-se a área livre para futura plantação;
- k) Estado da vinha;
- l) Aspectos culturais do terreno;
- m) Culturas intercalares;
- n) Situação do povoamento do prédio;
- o) Castas cultivadas;
- p) Castas predominantes;
- q) Percentagem de falhas;
- r) Outras informações úteis.

3 - O método a utilizar para atribuição da classificação respectiva a cada prédio ou parcela será o definido em regulamento a publicar em portaria do Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação.

Artigo 6.º

O plantio de vinhas novas ou a reconversão de vinhas antigas são autorizados, desde que efectuados nos termos da legislação respeitante ao plantio da vinha.

Artigo 7.º

1 - As práticas culturais das vinhas destinadas à produção de vinho generoso deverão ser as tradicionais ou as recomendadas pelos serviços oficiais.

2 - Não obstante o disposto no número anterior, poderão ser admitidas as práticas e trabalhos mecânicos que se comprove não afectarem desfavoravelmente a qualidade dos vinhos e constituam um avanço da técnica vitícola devendo essas práticas ser autorizadas pelas entidades competentes.

Artigo 8.º

1 - A produção máxima por hectare das vinhas destinadas a vinho do Porto é fixada em 55 hl, salvo autorização da entidade competente, a conceder nos termos em que vier a ser regulamentada.

2 - Anualmente será publicado pela entidade competente o comunicado da vindima, no qual será estabelecido:

- a) O quantitativo de mostos a beneficiar, que será fixado em função da evolução recente das vendas do sector, das perspectivas da sua evolução a curto prazo e das existências no comércio e na produção;
- b) Os preços mínimos de transacção de uvas e mostos;
- c) O preço e condições de fornecimento de aguardente;
- d) As normas a que devem obedecer as compras a efectuar na vindima para efeitos de obtenção da capacidade de venda;
- e) As normas e prazos a que devem obedecer as compras a efectuar fora da vindima, para efeitos de obtenção de capacidade de venda.

CAPÍTULO III

Da elaboração

Artigo 9.º

A elaboração de vinho do Porto obedece às seguintes características essenciais:

a) Vinificação:

Transformação do mosto em vinho por fermentação através de esmagamento com ou sem desengaço e com ou sem maceração ou curtimenta. - O esmagamento é feito mecânica ou manualmente; o desengaço pode ser total ou parcial, a maceração ou curtimenta pode ser mais ou menos intensa (de meia curtimenta ou de curtimenta);

Fermentação. - Pode desenvolver-se espontaneamente ou com a adição de pés de cuba ou de leveduras seleccionadas.

É autorizada a desinfecção e correcção química e biológica do mosto com os produtos a que se refere a alínea c) deste artigo.

Durante a vinificação são autorizados os meios físicos de aquecimento e arrefecimento de massas e mostos;

Prensagem. - Pode fazer-se por qualquer tipo de prensa;

Beneficiação. - Realiza-se adicionando ao mosto, proveniente das diversas prensagens, em fermentação a quantidade de aguardente vínica suficiente para elevar o teor alcoólico de forma a garantir a paragem da fermentação e de acordo com o tipo de vinho do Porto pretendido;

Trasfegas. - Iniciam-se após a beneficiação e repetem-se o número de vezes que se entenda necessário;

b) Conservação e envelhecimento:

Recipiente. - Sem restrições de capacidade, sendo o material utilizado no seu fabrico a madeira, o cimento ou o aço inoxidável;

Operações de armazém. - Mistura de vinhos entre si ou com aguardente, tradicionalmente designada «lotação»; refresco; trasfega; acerto de grau (por adição de aguardente vínica ou álcool vínico);

c) Produtos enológicos de emprego autorizado:

Nas operações de elaboração, abrangendo o esmagamento das uvas, as operações de vinificação, bem como as de conservação e armazenagem, poderão ser utilizados, conforme os seus fins, os produtos legalmente autorizados para a produção vinícola em geral;

O emprego de qualquer outro produto pode ser autorizado por despacho ministerial, sob parecer do Instituto do Vinho do Porto.

Artigo 10.º

Características físico-químicas e organolépticas:

- 1) O teor alcoólico volumétrico potencial natural dos mostos destinados à produção de vinho do Porto é estabelecido no mínimo de 11% vol.;
- 2) O vinho do Porto obedece às seguintes características organolépticas e físico-químicas:

a) Além de se revelar limpo de prova e cheiro; com características organolépticas específicas e reconhecidas pela Câmara de Provadores do Instituto do Vinho do Porto, deverá ter um teor alcoólico volumétrico adquirido compreendido entre 19% e 22% vol. a 20°C, salvo no vinho branco leve seco, que pode ter 16,5% no mínimo;

b) Além disso, deverá satisfazer as características por regulamentação interna do Instituto do Vinho do Porto.

Artigo 11.º

1 - Os tipos de vinho e menções tradicionais são definidos do modo seguinte:

a) Quanto ao grau de doçura, em massa volúmica a 20°C:

Muito doce ou lágrima - de 1034 a 1084;

Doce - de 1018 a 1034;

Meio seco - de 1008 a 1018;

Seco - de 998 a 1008;

Extra seco-inferior a 998;

b) Quanto à cor:

Vinhos tintos:

Retinto (full);

Tinto (medium, full, ruby);

Tinto alourado (medium tawny);

Alourado (tawny);

Alourado-claro (light tawny);

Vinhos brancos:

Branco-pálido;

Branco-palha;

Branco-dourado;

c) Quanto à designação especiais:

Vintage. - É o vinho do Porto de uma só colheita, produzido em ano de reconhecida qualidade, com características organolépticas excepcionais, retinto e encorpado, de aroma e paladar muito finos, que seja reconhecido pelo Instituto do Vinho do Porto com direito ao uso da designação «Vintage» e data correspondente.

Engarrafado entre 1 de Julho do 2.º ano e 30 de Julho do 3.º ano a contar do ano da colheita;

Tipo Vintage, Vintage Style ou Vintage Character.

- É um vinho do Porto com características organolépticas excepcionais, tinto e encorpado, de aroma e paladar finos, que seja reconhecido pelo Instituto do Vinho do Porto com direito ao uso da respectiva designação;

Crusted ou Crusting. - É um vinho do Porto com características organolépticas excepcionais, retinto e encorpado, de aroma e paladar finos, susceptível de criar depósito na garrafa, que seja reconhecido pelo Instituto do Vinho do Porto com direito ao uso da respectiva designação;

Late Bottled Vintage ou L.B.V. - É o vinho do Porto de uma só colheita, produzido em ano de boa qualidade, com boas características organolépticas, tinto e encorpado, de aroma e paladar finos, que seja reconhecido pelo Instituto do Vinho do Porto com direito ao uso da designação «Late Bottled Vintage» ou «L.B.V.».

Engarrafado entre 1 de Julho do 4.º ano e 31 de Dezembro do 6.º ano a contar do ano da respectiva colheita;

Tawny. - É o vinho do Porto tinto envelhecido em vasilhas de madeira;

Ruby. - É o vinho do Porto tinto de cor avermelhada;

Com data de colheita. - É o vinho do Porto de uma só colheita, de boa qualidade, que seja reconhecido pelo Instituto do Vinho do Porto com direito ao uso da indicação da data correspondente;

Com indicação de idade. - É o vinho do Porto tawny de muito boa qualidade que seja reconhecido pelo Instituto do Vinho do Porto com direito ao uso da designação da idade.

As indicações de idade permitidas são:

10 anos de idade;

20 anos de idade;

30 anos de idade;

Mais de 40 anos de idade;

Leve seco. - É o vinho do Porto branco que pode ter um grau alcoólico volumétrico mínimo de 16,5%.

2 - Além das designações especiais anteriormente referidas e em seu complemento, podem ser utilizados, sob controle e mediante as normas definidas pelo Instituto do Vinho do Porto, tendo em conta as características dos vinhos, diversos qualificativos, como, por exemplo, reserva, superior, muito velho, velhíssimo, etc., e respectivas traduções noutras línguas.

Artigo 12.º

1 - A aquisição de aguardentes e álcoois vínicos a utilizar na beneficiação dos mostos da Região Demarcada do Douro e o tratamento ulterior de vinho do Porto são da exclusiva competência do Instituto do Vinho do Porto, nos termos da legislação em vigor.

2 - Todas as aguardentes e álcoois vínicos serão sujeitos a um rigoroso controle de qualidade, da exclusiva competência do Instituto do Vinho do Porto, podendo este organismo recorrer à colaboração de organismos nacionais ou estrangeiros para esse fim.

CAPÍTULO IV

Da maturação

Artigo 13.º

1 - O Vinho do Porto terá o estágio mínimo legalmente estabelecido, competindo ao Instituto do Vinho do Porto, através da sua Câmara de Provedores, o controle desta idade média mínima e da qualidade dos vinhos.

2 - Os vinhos protegidos pela denominação de origem «Porto», referida no n.º 2 do artigo 1.º deste diploma, devem ser envelhecidos necessariamente em caves ou armazéns situados na região produtora ou em área de entreposto.

Artigo 14.º

1 - O sistema de envelhecimento especial necessário para obter vinho do Porto será o tradicional.

2 - As existências de vinhos submetidos a maturação deverão encontra-se armazenadas em cascos de carvalho devidamente avinhados ou em depósitos e vasilhas de outras características, desde que estes estejam devidamente autorizados pelo Instituto do Vinho do Porto.

CAPÍTULO V

Dos entrepostos

Artigo 15.º

1 - Uma vez beneficiados os mostos, através da adição de aguardente ou álcool vínico, os vinhos poderão permanecer na região produtora ou ser transferidos para os armazéns situados em entreposto, até se completar o seu processo de maturação.

2 - A transferência de vinhos beneficiados para armazéns situados nos entrepostos deverá obedecer às disposições legais e normas fixadas pelo Instituto do Vinho do Porto.

Artigo 16.º

Todos os armazéns e estabelecimentos que se dediquem à exportação de vinho do Porto têm de estar situados na

região produtora ou em área de entreposto, ressalvada a situação dos que presentemente se encontram fora.

Artigo 17.º

Os armazéns destinados a receber vinhos generosos do Douro estão obrigatoriamente separados dos destinados a outros vinhos.

Artigo 18.º

Todos os vinhos e produtos afins entrados nos entrepostos ficarão sujeitos ao regime de contas correntes, sendo escrituradas pelo Instituto do Vinho do Porto todas as entradas e saídas de cada produto, estando todos aqueles que o comercializem obrigados a cumprir as normas emanadas pelo referido organismo para o mencionado fim.

Artigo 19.º

Os armazéns de exportação situados fora da linha limite do Entreposto de Gaia ficarão sujeitos a um regime especial e permanente de fiscalização, necessariamente mais rigoroso que o normal.

CAPÍTULO VI

Da actividade Comercial

Artigo 20.º

1 - Todas as pessoas singulares ou colectivas que se dediquem à venda do vinho do Porto ficam obrigadas a fazer a sua inscrição em registo apropriado existente no Instituto do Vinho do Porto e devem satisfazer as seguintes condições:

- a) Possuir armazéns próprios ou adquirir capacidade de armazenagem nos entrepostos ou na Região Demarcada dos Vinhos Generosos do Douro;
- b) Possuir e manter uma existência permanente não inferior a 150 000 l de Vinho do Porto, em áreas confinadas devidamente isoladas, permitindo uma fiscalização fácil e eficiente e que reünam as indispensáveis condições de armazenagem, nomeadamente quanto a capacidade, apetrechamento e higiene;
- c) Obter o certificado de garantia e submeter-se a todas as normas regulamentares do Instituto do Vinho do Porto;
- d) Respeitar as regras de capacidade de vendas fixadas em função das existências registadas em seu nome no Instituto do Vinho do Porto, nos termos da legislação em vigor, nomeadamente os artigos 21.º e 22.º do presente decreto-lei.

2 - O limite mínimo de existências fixado na alínea b) do número anterior não será exigível em relação aos proprietários que exportem vinho engarrafado exclusivamente elaborado com uvas produzidas em propriedades suas.

Artigo 21.º

A capacidade de vendas das entidades referidas no artigo anterior é calculada em função das existências registadas em seu nome no Instituto do Vinho do Porto em 31 de Dezembro do ano anterior e é fixada, para além do previsto no artigo

22.º, no quantitativo obtido pela adição dos quantitativos referidos nas alíneas seguintes:

- a) Um terço dos vinhos de mais de um ano;
- b) 30% dos vinhos adquiridos ou elaborados na última vindima, desde que estes se situem entre um mínimo de 75% e um máximo de 125% das vendas efectuadas no ano anterior a essa vindima;
- c) 15% dos vinhos adquiridos ou elaborados na última vindima, no caso de ser ultrapassado o máximo de 125% referido na alínea anterior, na parte excedente a este limite;
- d) A percentagem da fórmula $A/B=30/X$, se os vinhos adquiridos ou elaborados na última vindima não atingirem 75% das vendas efectuadas no ano anterior, representando A os 75% que a firma deveria ter obtido, B a quantidade obtida e X a percentagem de capacidade que os vinhos obtidos atribuirão.

§ único. Por vinhos adquiridos ou elaborados entendem-se aqueles que satisfaçam os preceitos regulamentares estabelecidos pelo Instituto do Vinho do Porto, ouvido o seu conselho geral.

Artigo 22.º

Os comerciantes poderão também durante o ano adquirir capacidade de venda pela compra á produção incluindo a Casa do Douro, de vinhos generosos os quais atribuem, conforme a idade, a seguinte capacidade de venda:

- Até 3 anos - 20%;
- De mais de 3 e até 4 anos - 40%;
- De mais de 4 e até 5 anos - 60%;
- De mais de 5 e até 6 anos - 80%;
- De mais de 6 anos - 100%.

§ 1.º Metade, pelo menos, da capacidade a adquirir nestes termos tem de ser obtida pela compra de vinhos, que atribuam, no máximo, 40% de capacidade.

§ 2.º Só poderão beneficiar do disposto neste artigo os comerciantes e ou exportadores que em 31 de Dezembro do

ano anterior tenham adquirido vinhos em qualidade, não inferior a 75% das vendas efectuadas dois anos antes ou que atinjam esse mínimo pela compra de vinhos que dêem apenas 20% de capacidade.

§ 3.º O Instituto do Vinho do Porto pronunciar-se-á previamente sobre a qualidade e idade dos vinhos adquiridos aos produtores, verificando também se são limpos de prova e cheiro ou susceptíveis de assim se tornarem mediante tratamento conveniente.

§ 4.º Os vinhos em poder da lavoura ficarão em regime de contas correntes com a entidade competente, de acordo com a legislação em vigor, que as comunicará ao Instituto do Vinho do Porto para efeitos de fiscalização e confirmação de data, se a merecerem.

Artigo 23.º

O regime estabelecido nos artigos 21.º e 22.º não é aplicável às entidades que se encontrem em regime de liquidação segundo as regras definidas pelo Instituto do Vinho do Porto.

Artigo 24.º

Aos exportadores que entrarem em regime de liquidação deverá o Instituto do Vinho do Porto recusar a sua inscrição como exportadores, com a decorrente inibição do exercício daquela actividade pelo prazo de cinco anos, contando-se este do termo da liquidação.

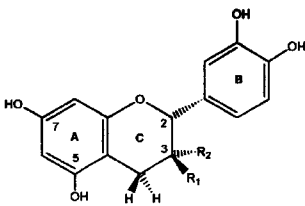
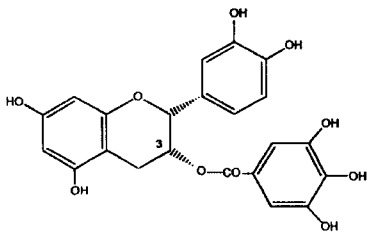
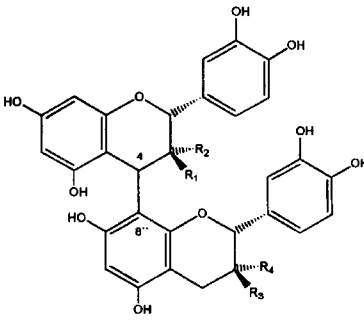
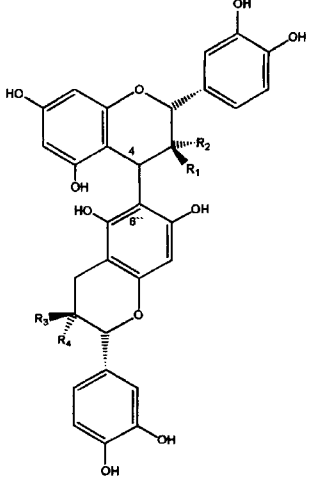
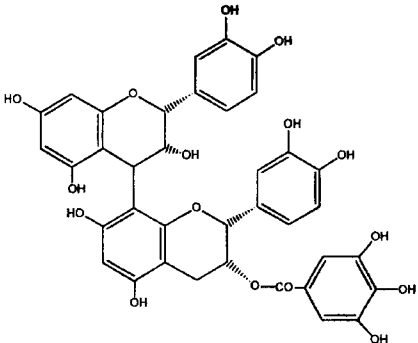
Artigo 25.º

A incapacidade resultante do artigo anterior atinge igualmente os parentes dos sócios comerciantes em nome individual, comunitários, gerentes ou administradores das sociedades em comandita, em nome colectivo, anónimas ou por quotas, em qualquer grau da linha recta e até ao 3.º grau da colateral, os quais não poderão, dentro do mesmo prazo, exercer a actividade exportadora, quer em nome individual quer nalguma das categorias enumeradas no presente artigo.

ANEXO 2

Composição detalhada do extracto polifenólico

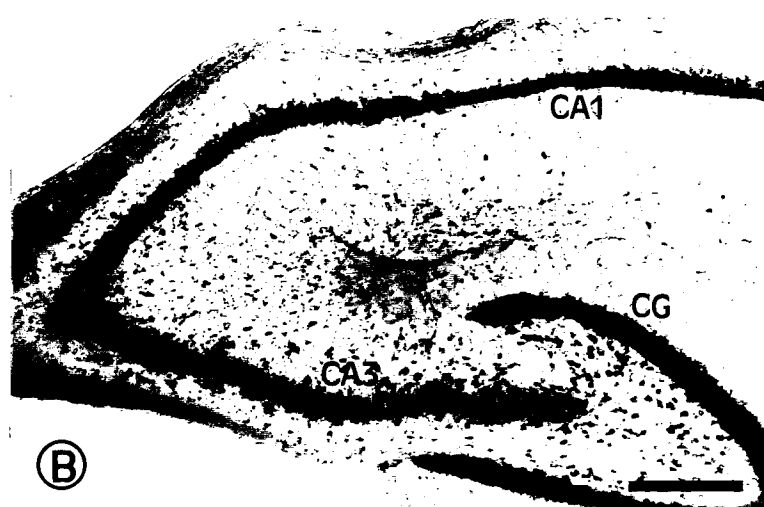
Composição detalhada do extracto polifenólico, proveniente das grainhas das uvas,
administrado aos ratos numa concentração de 200 mg/l.

Composto Fenólico	Composição (mg/g de extracto)	Estrutura Química
Catequinas		
(+)-catequina	56	 (+)-catequina: R ₁ =OH; R ₂ =H (-)-epicatequina: R ₁ =H; R ₂ =OH
(-)-epicatequina	16	
(-)-epicatequina-3-O-galato	50	
 (-)-epicatequina-3-O-galato		
Procianidinas Oligoméricas		
Dímeros		
B1 ((-)-epi-(+)-cat)	237	 Dímeros C4-C8 B1: R ₁ =H; R ₂ =OH; R ₃ =OH; R ₄ =H B2: R ₁ =H; R ₂ =OH; R ₃ =H; R ₄ =OH B3: R ₁ =OH; R ₂ =H; R ₃ =OH; R ₄ =H B4: R ₁ =OH; R ₂ =H; R ₃ =H; R ₄ =OH
B2 ((-)-epi-(-)-epi)	138	
B3 ((+)-cat-(+)-cat)	32	
B4 ((+)-cat-(-)-epi)	38	
B5 ((-)-epi-(-)-epi)	26	
B8 ((+)-cat-(-)-epi)	8	 Dímeros C4-C6 B5: R ₁ =H; R ₂ =OH; R ₃ =H; R ₄ =OH B8: R ₁ =OH; R ₂ =H; R ₃ =H; R ₄ =OH
B2-3''-O-galato	151	
 Dímero B2-3''-O-galato		
Total de 3-Flavanóis	769	
Procianidinas Poliméricas	231	

cat – catequina; epi – epicatequina

ANEXO 3

Fotografias de córtex cerebeloso e da formação do hipocampo de Rato



A - Fotografia do córtex cerebeloso de um rato do grupo Etanol visualizado num corte semifino corado pelo azul de toluidina. As setas apontam para algumas células de Purkinje onde se observam depósitos de lipofuscina no citoplasma de alguns dos neurónios. Cortes semelhantes a este foram utilizados para a determinação dos volumes nuclear, neuronal e citoplasmático utilizando o *nucleator*. Os cortes semifinos serviram também para a selecção das zonas para o estudo ultraestrutural. CG - camada granular; CM - camada molecular. Barra = 45 μm .

B - Fotografia de um corte horizontal da formação do hipocampo de um rato do grupo Água corado pelo método de Giemsa. Cortes semelhantes a este foram utilizados para a determinação dos volumes nuclear, neuronal e citoplasmático utilizando o *optical rotator*. CA1 - camada piramidal da subdivisão CA1; CA3 - camada piramidal da subdivisão CA3; CG - camada granular da fásia dentada. Barra = 165 μm .

ANEXO 4

Grelha utilizada para a quantificação de lipofuscina, lisossomas, corpos multivesiculares e citoplasma nas células estudadas

Grelha utilizada para a quantificação de lipofuscina, lisossomas, corpos multivesiculares e citoplasma em células piramidais da subdivisão CA1 e CA3 da formação do hipocampo e em células de Purkinje do cerebello.

