



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE TAURINA NA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR E
NA NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DE RATOS SUBMETIDOS AO CONSUMO
INDUZIDO DE ETANOL

PATRICIA RODELLA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

ARARAQUARA – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE TAURINA NA FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR E NA NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DE RATOS
SUBMETIDOS AO CONSUMO FORÇADO DE ETANOL

PATRICIA RODELLA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

ARARAQUARA – SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Rodella, Patricia
R687e Efeitos da administração de Taurina na função cardiovascular e na neurogênese hipocampal de ratos submetidos ao consumo forçado de etanol / Patricia Rodella. – Araraquara, 2016.
113 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Chung Man Chin.
Coorientador: Carlos Cesar Crestani.

1. Taurina. 2. Etanol. 3. Neurogênese hipocampal. 4. Sistema cardiovascular. I. Chung, Man Chin, orient. II. Crestani, Carlos Cesar, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

*Beatriz,
Minha ausência, em sua vida, nos momentos mais difíceis não tem justificativa.
Mas essas páginas são o fruto dessa ausência.
Obrigada por alegrar minha vida.
Amo você*

*Formigo,
Meu eterno amor
Obrigada por ser, estar e fazer parte disso tudo
Obrigada pelo seu apoio integral
Obrigada por me amar
Sem você nada disso teria acontecido
Amo você*

Agradecimentos

À essa força maior que me guia pela vida.

À Profa. Dra. Chung Man Chin, que pode ser definida em uma única palavra: AMOR. Tive sorte de encontrar com você naquele momento, no corredor. Mal sabia que iria mudar a minha vida. A você, agradeço não só o fato de ter apostado em mim, mas agradeço por ter me presenteado com sua amizade sincera e verdadeira. Pessoa única, inteligentíssima, meu sincero obrigada.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Takase, por ter me salvado no momento mais difícil de todos. Por ter aberto as portas do seu laboratório e me ajudado na fase final do projeto. Me orgulho de ter o privilégio de poder estar ao seu lado todos os dias da minha vida. Me orgulho da sua inteligência ímpar. Me orgulho de ser sua esposa. Obrigada por sempre me fazer enxergar o melhor de mim. Sem você nada disso teria sentido.

Ao Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani, que prontamente abriu as portas do seu laboratório para que pudéssemos terminar nosso projeto. Obrigada pela paciência, pelas explicações. Sem sua ajuda não terminaria esse projeto. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Zerbini por ter me recebido em seu laboratório em Cape Town e por ter me mostrado quais os valores que quero levar dessa vida. Obrigada.

À Capes, pela bolsa de Doutorado Sanduiche.

O “Quarteto Fantástico” não existiria se tudo tivesse dado certo! Obrigada Lucas, Leandro e Ricardo! Com vocês aprendi o verdadeiro significado de trabalho em grupo! Me senti privilegiada de fazer parte, ainda que por alguns meses, de um grupo tão bom, tão inteligente e tão unido! Lucas, obrigada pela pronta acolhida em seu abraço, que é o melhor do mundo! Lê, obrigada por toda paciência em me ensinar e me acolher, você é muito especial e querido! Ri, e suas conversas animadas, risadas! Sua destreza em operar é fascinante! Meninos, sem vocês, com certeza não teria conseguido! E levo a certeza de um amor e uma amizade além do laboratório! Amo vocês! Minha eterna gratidão! #farmacolindos

Daiana Leonardi, conocerte en Cape Town ha cambiado todo para mejor! Me has traído el cariño que sólo los latinos tienen! Me has proporcionado los besos y los abrazos en el convivencia diaria. Aunque sólo por una semana, te puedo decir desde el fondo de mi corazón que conocerte en aquel exacto momento en Cape Town, me ha dado fuerzas para seguir hasta el final! Muchas gracias por tu amistad!

Danielle Ribeiro Lucon, ou simplesmente minha amiga Dani Lu. Se tem alguém que me entendeu todos os momentos difíceis em Cape Town, foi você. Você trouxe o calor do Brasil para minha convivência, o carinho de uma amizade, a orientação que me faltou, as broncas, as brigas, os conselhos, as conversas. Obrigada. Quantas vezes nos perguntamos o porquê fomos parar na África do

Sul, e sempre respondíamos a mesma coisa: para que pudéssemos nos tornar amigas. Te amo infinitamente! Minha eterna gratidão!

Alex and Keith Adams. My Family in Cape! I will never forget you. You gave me a home, love and affection. I will be forever grateful for everything. Living with you made my life better in South Africa. My angels and dear friends. I love you forever!

Juliano Paccez. Meu amigo Ju. Sempre estendeu sua mão, mesmo antes de eu chegar na África do Sul. Meu mais sincero obrigado. Obrigada pelas inúmeras caronas, por ter me ajudado com todas as coisas em Cape Town, pelos churrascos brasileiros em meio aos Braais, pelo português no meio do inglês e do afrikans. Jamais esquecerei o que você fez por mim!

Aos farmacolindos: Gessy, Willian, Jonas, Di, Ligia, Tati, Vanessa, Nathalia, Karine. Obrigada por me receberem tão bem na Farmacologia!

Às técnicas do laboratório de Farmacologia, Elisabete Lepera e Rosana Pupim, Bete e Ro, por toda ajuda com os animais, experimentos e pelo carinho e convivência feliz. Minha gratidão!

Tirene Pavanelli. Ti. O que falar? São tantos anos, tantas histórias. Muito obrigada por me ouvir e me dar apoio nas inúmeras vezes que quis jogar tudo pro alto e sair correndo. Amiga querida, amo você!

Ao meu tio Anisius Augusto Domingues (*in memoriam*). Me faz falta todos os dias. Obrigada por ter me ensinado a ser a pessoa que sou. Muita luz e paz para você. Amo você.

À minha irmã, Erika Rodella, por ter me apoiado e por ter entendido minha ausência num momento difícil. Me orgulho de ser sua irmã. Obrigada por todo amor nesse mundo. E obrigada pelo amor que foi me dado de presente na forma da Beatriz.

À minha mãe, Suzana Domingues por ter me ensinado a ser a pessoa que sou. Por ter me dado seu amor incondicional. Te amo.

Minha turminha das "7 e meia": Fe, Mi, Li, Du, Má, Mari, Mo, Sercho, Ti, Fla, Marcel, Vini, Ro, Filipe, Tha, Di, Flavio e Samuca. Minha válvula de escape foi o CrossFit diário com vocês. Amigos para vida. Amo demais!

Jean Alanis, meu BB, meu irmão querido. Me deu forças demais. Me colocou pra cima muitas vezes em que estava no meu limite. Obrigada por seu carinho e amizade. Amo você!

Lana, Teka e Mimi. Pelo amor incondicional.

A todos que de certa forma fizeram parte disso tudo, nesses quatro longos anos,

Obrigada!

Quando não há nada mais a ser dito, silencia.

Quando não há mais nada a ser feito, permitas apenas ser, apenas estar e ficar na companhia do teu coração e este indicará o momento apropriado para agires.

São Francisco de Assis

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O consumo excessivo de etanol está relacionado a diminuição da neurogênese hipocampal e a diversas patologias cardiovasculares, como a hipertensão. A taurina é um aminoácido não-essencial encontrado principalmente em estruturas cujos tecidos são mais excitáveis, como músculo esquelético, tecido cardíaco, vasos sanguíneos e sistema nervoso central. Níveis normais deste nutriente são essenciais para o correto funcionamento do organismo e sua depleção pode precipitar diversos quadros patológicos. A taurina tem apresentado resultados promissores tanto no sistema cardiovascular quanto no sistema nervoso central. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da taurina na função cardiovascular bem como na neurogênese hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol. Dessa forma, ratos Wistar de aproximadamente 250 gramas receberam soluções crescentes de etanol (5% na primeira semana, 10% na segunda semana e 20% na terceira e quarta semana), sem a oferta de água; o grupo controle recebeu apenas água. A taurina foi administrada (i.p., 300 mg/kg) diariamente durante 28 dias e os animais do grupo controle receberam injeção apenas do veículo. O presente trabalho foi dividido em dois experimentos. No primeiro, a taurina foi administrada juntamente com a oferta de etanol. Já o segundo experimento, os animais foram expostos ao etanol e depois, receberam a taurina. Os resultados do Experimento 1 não mostraram alterações significativas na função cardiovascular em resposta ao consumo de etanol ou à administração de taurina. A análise da neurogênese hipocampal mostrou que a taurina promoveu significativa atividade neuroprotetora contra os efeitos deletérios do etanol tanto na proliferação como na sobrevivência celular, neurogênese e apoptose. Estes resultados mostraram também que a taurina não provocou efeito tóxico no sistema cardiovascular. Já os resultados do Experimento 2 não mostraram diferenças estatisticamente significantes na quantidade de etanol consumido, peso corporal, volume hipocampal, neurogênese e apoptose. Na análise da proliferação celular, os animais que receberam água e depois taurina apresentaram diminuição significativa no número de células imunorreativas ao Ki-67. Os resultados mostraram que o tratamento com taurina pode ter importantes correlações clínicas positivas na prevenção dos efeitos do etanol no sistema nervoso central.

Palavras-chave: Taurina, Etanol, Neurogênese Hipocampal, Sistema Cardiovascular

ABSTRACT

Excessive ethanol consumption is related with decrease in hippocampal neurogenesis and various cardiovascular disorders such as hypertension. Taurine is a non-essential amino acid and is found primarily in structures which are more excitable tissues, such as skeletal muscle, heart tissue, blood vessels and central nervous system. Normal levels of this compound are essential for the correct functioning of the body and its depletion may precipitate various pathological conditions. Among the various compounds studied to reverse or protect against the effects of ethanol, taurine have shown promising results both in the cardiovascular system and the central nervous system. Thus, the objectives of this study was to investigate the effects of taurine on cardiovascular function and hippocampal neurogenesis in rats submitted to the model of forced consumption of ethanol. Wistar rats of 250g of body weight received ethanol solution (5% in the first week, 10% in the second week and 20% in the third and fourth week) without the offer of water. Taurine was administered (i.p., 300 mg / kg) daily for 28 days. This study was divided into two experiments. In the first one, to analyze the protective effects of taurine on the cardiovascular system and hippocampal neurogenesis against the effects of ethanol consumption, taurine was administered along with the ethanol consumption model. In the second experiment, to analyze the effects of taurine in reversing the effects of ethanol consumption, the animals were exposed to the ethanol consumption model and then received taurine. The results of Experiment 1 showed no significant changes in cardiovascular function in response to ethanol consumption or administration of taurine. The analysis of hippocampal neurogenesis has shown that taurine promoted a significant neuroprotective effect against the effects of ethanol in both cell proliferation and survival, neurogenesis and apoptosis. The results of Experiment 2 showed no statistically significant differences in the amount of ethanol consumed, body weight, hippocampal volume, neurogenesis and apoptosis. In the analysis of cell proliferation, the animals received water and after taurine showed a significant decrease in the number of immunopositive cells Ki-67. The results showed that treatment with taurine could have important clinical correlations in the prevention of the effects of ethanol on the central nervous system.

Keywords: Taurine, Ethanol, Hippocampal Neurogenesis, Cardiovascular System

LISTA DE ABREVIATURAS

AT1 e AT2: receptores do Sistema renina-angiotensina-aldosterona

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BPM: Batimentos por minuto

BrdU: 5'bromo-2'-dioxiuridina

Ca²⁺: cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CAD/CSAD: ácido sulfinico cisteína descarboxilase

CCG: camada celular granular

CGC: camada granular celular

CREB: proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc

CRF: hormônio liberador de corticotrofina

Dahl-S: hipertensão genética sal sensível

DCX: doublecortin

DOCA-sal: desoxicorticosterona – modelo de hipertensão dependente de volume

EGF: Fator de crescimento epidermal

ER: retículo endoplasmático

EROs: Espécies reativas de oxigênio

EtOH: Etanol

FC: Frequência Cardíaca

FLS: fibroblasto-like sinoviócitos

GABA: ácido gama-aminobutírico

Glu: glutamato

GluR: Receptor de glutamato

HOCl: ácido hipocloroso

i.p.: intraperitoneal

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

L-NAME: L-nitro-arginina-metil-éster

LPS: lipopolissacarídeo

MPO: mieloperoxidase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

NPS: Nitroprussiato de sódio

PA: pressão arterial

PAM: Pressão Arterial Média

PAT1: Proteína transportadora de aminoácido 1

PBS: tampão fosfato de sódio

PGE2: Prostaglandina E2

RHR: rato hipertenso renovascular

Sal: Salina

SHR: rato espontaneamente hipertenso

SLC36: transportadores solutos 36

SLC6: transportadores solutos 6

SNA: Sistema Nervoso Autonomo

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TAU: taurina

TauCl: taurocloramina

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

ZSC: zona subgranular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Via da inflamação mediada pelo consumo crônico de álcool	04
Figura 2: Efeitos do etanol na precipitação da hipertensão (Adaptado de HUSAIN; ANSARI; FERDER 2014).	05
Figura 3: Encéfalo humano e de rato, mostrando hipocampo e zona periventricular (CREWS; NIXON, 2004).	10
Figura 4: Etapas da neurogênese (TAKASE, 2010)	11
Figura 5: Estrutura química da taurina (Adaptado de RIPPS; SHEN, 2012).	13
Figura 6: Biossíntese da taurina (adaptado de DE LUCA et al, 2015)	15
Figura 7: Transportador de Taurina – TauT (adaptado de Cloud-Clone Co.).	16
Figura 8: Conjugação da taurina e ácidos biliares (Adaptado de SOLAAS e col, 2000).	18
Figura 9: Taurina, suas funções e seus diferentes papéis fisiológicos (adaptado de DE LUCA et al, 2015).	20
Figura 10: Mecanismo de formação de EROs pelos leucócitos durante o processo inflamatório (VIZIOLI, 2009).	21
Figura 11: Efeitos da taurina nos distúrbios cardiovasculares (adaptado de Xu et al, 2008).	24
Figura 12: Efeito da taurina extracelular no transporte de cálcio ao coração (adaptado de SHAFFER, BALLARD, AZUMA, 1994).	25
Figura 13: Ação da taurina e sua função contra a apoptose induzida por glutamato (adaptado de WU e PRENTICE, 2010).	31
Figura 14: Esquema dos experimentos realizados no presente trabalho.	41
Figura 15: Células picnóticas no giro denteado do hipocampo.	47
Figura 16: Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	53
Figura 17: Consumo de líquidos dos diferentes grupos experimentais ao longo do período de experimento.	55
Figura 18: Consumo de etanol nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU durante o período experimental.	56
Figura 19: Consumo total de líquidos dos diferentes grupos durante o período experimental.	57
Figura 20: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca média (FC) basais nos diferentes grupos experimentais.	59
Figura 21: Variação da Pressão Arterial Média (Δ PAM) e Frequência Cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo nos diferentes grupos experimentais.	60

Figura 22: Análise de regressão não-linear do barorreflexo correlacionando Pressão Arterial Média (Δ PAM) e Frequência Cardíaca (Δ FC).	62
Figura 23: Hipocampo e suas estruturas em cérebro humano e de rato	64
Figura 24: Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	66
Figura 25: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	68
Figura 26: Padrão de marcação das células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado do hipocampo nos diferentes grupos experimentais. A - grupo H ₂ O+Sal, B - grupo EtOH+Sal, C - grupo H ₂ O+TAU, D - Grupo EtOH+TAU. CCG – Camada Celular Granular, ZSG – Zona Subgranular. Barra de calibração: 50 μ m.	69
Figura 27: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao BrdU no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	71
Figura 28: Padrão de marcação das células imunorreativas ao BrdU nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam células imunorreativas ao BrdU. A - grupo H ₂ O+Sal, B - grupo EtOH+Sal, C - grupo H ₂ O+TAU, D - Grupo EtOH+TAU. CCG – Camada Celular Granular, ZSG – Zona Subgranular. Barra de calibração: 50 μ m.	72
Figura 29: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	74
Figura 30: Padrão de marcação das células imunorreativas ao DCX no giro denteado do hipocampo nos diferentes grupos experimentais. A - grupo EtOH+Sal, B - Grupo EtOH+TAU. Barra de calibração: 50 μ m.	75
Figura 31: Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	78
Figura 32: Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	81
Figura 33: Consumo de etanol nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU durante o período experimental.	82
Figura 34: Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	83
Figura 35: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	85

Figura 36: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	88
Figura 37: Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	89
Figura 38: Taurolidina e seus derivados (adaptado de Darnowski et al, 2004).	121
Figura 39: Efeitos da taurina na viabilidade celular da cultura de células tumorais de próstata DU145.	125
Figura 40: Efeitos da taurina na viabilidade celular da cultura de células tumorais de próstata PC3.	127
Figura 41: Efeitos da taurina na viabilidade celular da cultura de células tumorais de próstata C4.	128
Figura 42: Efeitos da taurina na viabilidade celular da cultura de células normais de próstata PNT1A.	129
Figura 43: Efeito da taurina no percentual migração de células tumorais de próstata da linhagem PC3 após 24 horas e 40 horas da exposição à taurina.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais utilizados no presente trabalho e seus respectivos tratamentos	39
Tabela 2 - Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	53
Tabela 3 - Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	65
Tabela 4 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	67
Tabela 5 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao BrdU no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	70
Tabela 6 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	73
Tabela 7 - Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	77
Tabela 8 - Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	80
Tabela 9 - Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.	82
Tabela 10 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	84
Tabela 11 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	88
Tabela 12 - Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Consumo de etanol	1
1.2 Consumo de etanol e Hipertensão	4
1.3 Efeitos do consumo de etanol no SNC.....	8
1.3.1 Consumo de etanol na neurogênese.....	9
1.4 Taurina.....	13
1.4.1 Efeitos da taurina na hipertensão.....	25
1.4.2 Taurina e SNC.....	28
1.4.2.1 Taurina como neurotransmissor	29
1.4.2.2 Taurina e neurogênese	32
2 Objetivos	35
3 Material e métodos	37
3.1 Animais	38
3.2 Grupos experimentais	39
3.2.1 EXPERIMENTO 1 - Análise dos efeitos protetores da taurina no sistema cardiovascular e na neurogênese hipocampal contra os efeitos do consumo de etanol	40
3.2.2 EXPERIMENTO 2 - Análise dos efeitos da administração de taurina na reversão dos efeitos do consumo de etanol na neurogênese hipocampal	41
3.3 Análise da função cardiovascular	42
3.3.1 Canulação da artéria e veia femoral	42
3.3.2 Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca	42
3.3.3 Avaliação da atividade barorreflexa	43
3.3.4 Estresse de restrição agudo.....	44
3.4. Análise estatística	44
3.5 Análise da neurogênese.....	45
3.5.1 Administração do BrdU	45
3.5.2 Perfusão e processamento do material biológico	45
3.5.3 Técnica de Nissl	46
3.5.4 Ki-67, BrdU e DCX –Imunohistoquímica	48
4 Resultados e Discussão	51
4.1 EXPERIMENTO 1 - Análise dos efeitos protetores da taurina no sistema cardiovascular e na neurogênese hipocampal contra os efeitos do consumo de etanol	52
4.1.1 Peso corporal	52
4.1.2 Consumo de líquidos	55
4.1.3 Função cardiovascular	58
4.1.3.1 Valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca	58
4.1.3.2 Respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo	59
4.1.3.3 Estimulação barorreflexa.....	61
4.1.4 Neurogênese	64
4.1.4.1 Análise volumétrica	65
4.1.4.2 Proliferação celular – Ki-67	67
4.1.4.3 Sobrevivência celular – BrdU	70
4.1.4.4 Neurogênese – DCX	73

4.1.4.5 Apoptose – células picnóticas	77
4.2 EXPERIMENTO 2 - Análise dos efeitos da administração de taurina na reversão dos efeitos do consumo de etanol na neurogênese hipocampal.....	80
4.2.1 Peso corporal	80
4.2.2 Consumo de etanol	81
4.2.3 Análise volumétrica	82
4.2.4 Proliferação celular – Ki-67	84
4.2.5 Neurogênese – DCX	87
4.2.6 Apoptose – células picnóticas	89
5 Conclusões	91
6 Referências	94
7 Anexos	113



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Consumo de Etanol

O alcoolismo é um dos principais fatores de risco à saúde, sendo responsável por 4% do total das doenças no mundo. É considerado um grave problema de saúde pública com grandes repercussões sócio-econômicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011), pertencendo ainda ao grupo das principais doenças oriundas dos transtornos mentais (WOJNAR et al., 1997), ao lado da esquizofrenia e do distúrbio bipolar (FIGUEIRA et al., 1999).

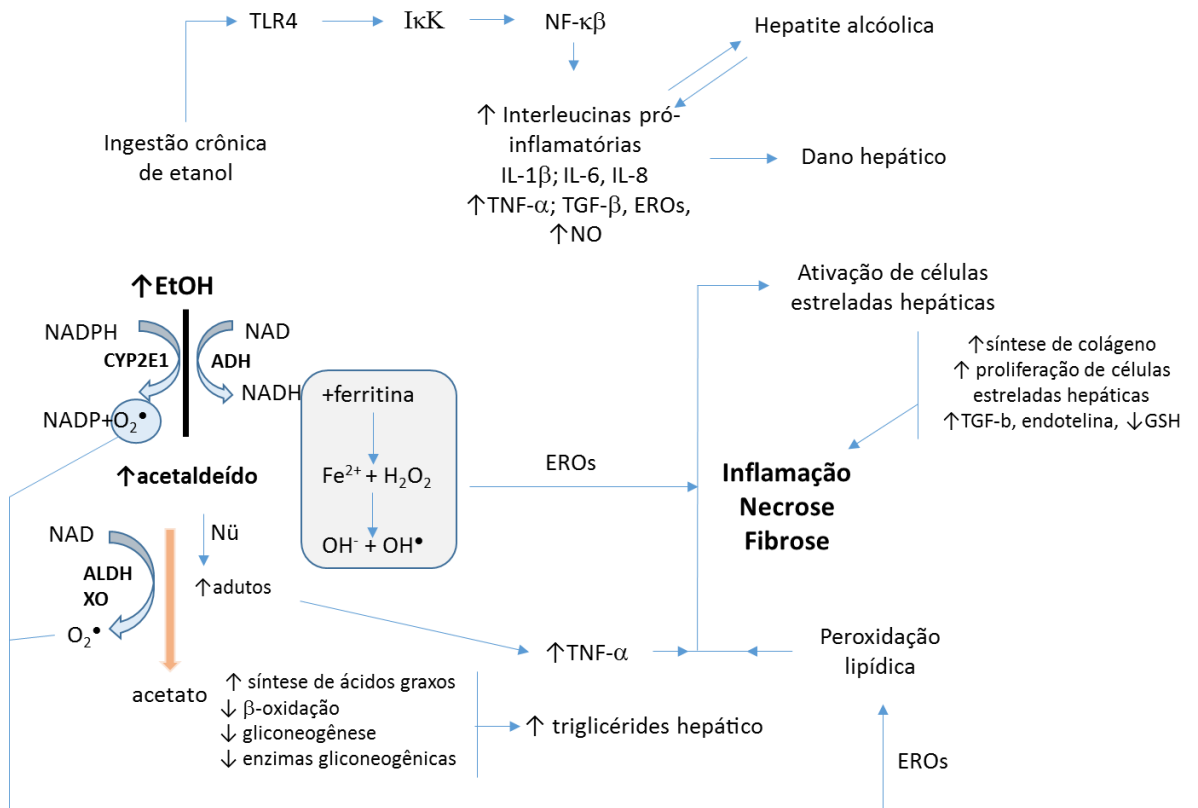
Os danos no indivíduo que faz uso de álcool podem ocorrer por três diferentes mecanismos: i. efeitos tóxicos em órgãos e tecidos; ii. Intoxicação levando a diminuição da coordenação motora, consciência, cognição, percepção, afeto ou comportamento; iii. dependência, onde o autocontrole sobre o comportamento é prejudicado (WHO, 2014). Além disso, o consumo excessivo de etanol está associado com o aumento do risco de desenvolver alcoolismo, que frequentemente conduz o paciente a diversas e severas perdas sociais, financeiras e interpessoais (POZNYAK et al., 2005).

O alcoolismo, ou síndrome de dependência do álcool, pode ser considerado uma síndrome multifatorial, pois compromete aspectos físico, mental e social do indivíduo (EDWARDS; GROSS, 1976). Dados mundiais mostram que 47,7% dos homens e 28,9% das mulheres com mais de 15 anos, consomem álcool rotineiramente e que dentro desses consumidores, a maior incidência é na faixa dos 15 aos 19 anos (16,8% dos homens e 6,2% das mulheres) (WHO, 2014). No Brasil, cerca de 5,7% das mulheres e 17,1% dos homens são dependentes alcoólicos. A faixa etária mais prevalente é a dos 18

aos 24 anos, onde 23,7% dos homens e 7,4% das mulheres são considerados dependentes (CEBRID, 2016).

Muitos são os danos, diretos ou indiretos, causados pelo consumo de álcool. Dentre eles encontramos as doenças gastrintestinais como cirrose e pancreatite; câncer; condições neuropsiquiátricas, danos intencionais como suicídio e violência; danos não intencionais como diminuição da capacidade psicomotora; doenças cardiovasculares; síndrome alcoólica fetal e nascimento prematuro; diabetes mellitus; doenças infecciosas causadas pelo comprometimento do sistema imunológico como pneumonia e tuberculose (WHO, 2014).

A produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β ; IL-6, IL-8, e TNF- α ; TGF- β e das EROs no consumo crônico de álcool causa muitos danos hepáticos como a esteatose, hepatite alcoólica, fibrose hepática crônica, cirrose e câncer hepático, como mostra a figura 1.

Figura 1: Via da inflamação mediada pelo consumo crônico de álcool

Fonte: próprio autor.

A compreensão dos efeitos potenciais do consumo de etanol faz-se de extrema importância na prevenção dos danos associados ao uso dessa substância.

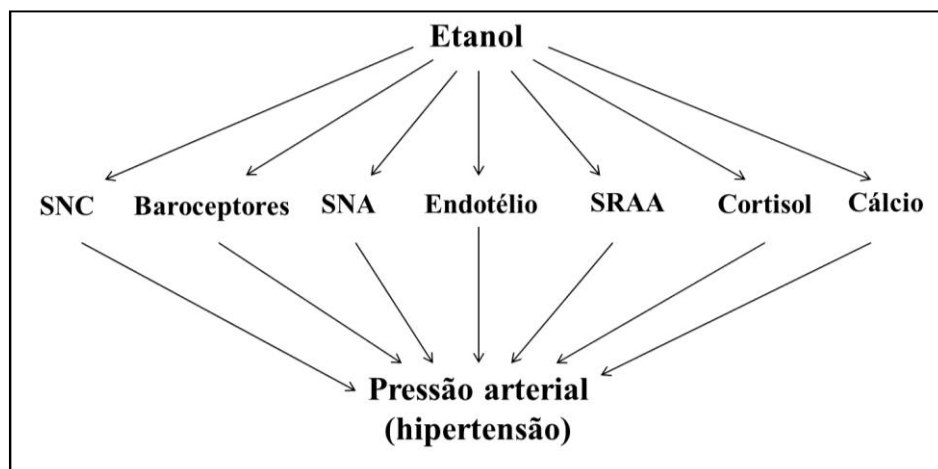
1.2 Consumo de etanol e hipertensão

O consumo crônico de etanol está relacionado com diversos problemas cardiovasculares, como cardiomiopatias, arritmias, doenças coronárias, arteriosclerose e hipertensão (CHAN et al., 1985; KAWANO, 2010; HUSAIN et al, 2014; MARCHI et al, 2014; FERNANDEZ-SOLA, 2015).

Lian et al. (1915) foram os primeiros a sugerir a correlação entre consumo de etanol e elevação da pressão sanguínea. Estudos pré-clínicos mostraram significativa correlação entre a duração do consumo de etanol e a precipitação da hipertensão (ABDEL-RAHMAN; WOOLEES, 1987; RUSS et al., 1991; RESSTEL et al., 2006).

O consumo excessivo de etanol pode causar hipertensão através de diversos mecanismos, como a ação direta sobre o sistema nervoso central (SNC), barorreceptores, sistema nervoso autônomo (SNA), células endoteliais dos vasos sanguíneos, sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), níveis plasmáticos de cortisol e íons de cálcio (Figura 2).

Figura 2: Efeitos do etanol na precipitação da hipertensão (Adaptado de HUSAIN; ANSARI; FERDER, 2014).



O etanol desencadeia reações tanto do SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP), que agem de maneira sinérgica para causar a hipertensão. O etanol ainda ativa a porção simpática do SNA, provavelmente através da estimulação da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRF) (POTTER et al., 1986). Este fato pode ser observado através de experimentos

em que a microinjeção intraventricular de CRF em ratos, promoveu o aumento da pressão arterial (OVERTON; FISHER, 1989) e estimulou atividade simpática (KUROSAWA et al., 1986).

O consumo crônico de etanol promove mudanças significativas na atividade barorreflexa, principalmente no controle da frequência cardíaca (ABDEL-RAHMAN et al., 1987; RESSTEL, et al., 2006; KAWANO, 2010). A diminuição do barorreflexo nos barorreceptores presentes no tronco encefálico pode estar relacionada com a precipitação da hipertensão (RUSS et al., 1991).

A ativação da porção simpática do SNA após o consumo de etanol (RUSS et al., 1991; KAWANO, 2010) estimula reações mediadas por receptores adrenérgicos (vasoconstrição, taquicardia) e também estimula reações de oxidação (RUPP et al., 1996; KAWANO, 2010)

O etanol, cronicamente, pode agir diretamente sobre as células endoteliais dos vasos sanguíneos, promovendo vasoconstrição e consequente aumento da pressão arterial (ALTURA; ALTURA, 1987; PUDDEY et al., 2001). Estudos também demonstraram aumento dos níveis de substâncias vasoativas após exposição crônica ao etanol (IBSEN et al., 1981; JING et al., 2008; SOARDO et al., 2008) e aumento das respostas vasculares a estas substâncias (ABDEL-RAHMAN et al., 1987; RESSTEL et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2008; KAWANO, 2010) após consumo de etanol.

O SRAA participa na hipertensão induzida pelo consumo de etanol. A angiotensina I é produzida através da conversão do angiotensinogênio pela renina, uma enzima liberada pelos rins quando há baixa concentração plasmática de sódio ou queda na pressão arterial. A angiotensina I, que não apresenta ação vascular, é convertida em angiotensina II, que se liga a

receptores específicos (AT1 e AT2), promovendo vasoconstrição e estimulando a liberação de aldosterona pela glândula supra-renal.

A aldosterona promove a secreção de potássio e conseqüentemente a reabsorção de sódio. Assim, o SRAA estimula a vasoconstrição e a reabsorção de sódio, que promovem aumento da pressão arterial (MAYAS et al, 2005; SOMMER et al, 2007). Estudos mostraram significativo aumento das concentrações plasmáticas de renina, da enzima conversora de angiotensina e de aldosterona após a exposição ao etanol (IBSEN et al., 1981; OKUNO et al, 1986; MAYAS et al, 2005; SOMMER et al, 2007). Outro estudo sugeriu que o etanol promove aumento da atividade simpática através do aumento da concentração de vasopressina e da atividade da renina plasmática (CHAN; SUTTER, 1983).

A administração aguda intraperitoneal (i.p.) de etanol em ratos estimula a secreção de CRF (RIVIER et al., 1984), que leva ao aumento indireto da concentração plasmática de cortisol, levando à estimulação simpática e conseqüente aumento da pressão arterial (JENKINS; CONNOLLY, 1968; LI et al, 2005; HEILIG; KOOB, 2007; SILBERMAN; MATTHEWS; WINDER, 2013).

Em ratos, a administração de etanol em ratos promoveu significativa vasoconstrição (ALTURA; ALTURA, 1982). As alterações na ligação de íons cálcio (Ca^{2+}) na musculatura lisa de artérias e arteríolas promoveram maior sensibilidade a vasoconstritores endógenos, como a angiotensina II, endotelina-1 e norepinefrina (GRASSI et al., 1989; LI et al, 2005; HEILIG; KOOB, 2007; SILBERMAN; MATTHEWS; WINDER, 2013), levando a hipertensão.

Outro possível mecanismo hipertensivo causado pelo etanol é o aumento da concentração plasmática do acetaldeído, produto metabólico primário da conversão do etanol pela enzima álcool desidrogenase no fígado. O acetaldeído é um composto muito reativo, que pode se ligar a proteínas e outros componentes biológicos, podendo causar distúrbios metabólicos, dentre eles a hipertensão (HARADA et al., 2000). Estudo da literatura mostrou aumento da pressão arterial após administração de disulfiram, um inibidor da enzima aldeído desidrogenase (VASDEV et al., 1995a). O tratamento com N-acetilcisteína, que previne a reação do acetaldeído com proteínas, promoveu melhoras na hipertensão induzida pelo etanol (VASDEV et al., 1995b)

1.3 Efeitos do consumo de etanol no SNC

De modo geral, o etanol exerce ação depressora no SNC, atuando na fisiologia de diversos neurotransmissores e agindo diretamente sobre vários órgãos periféricos. A intensidade de seus efeitos varia de acordo com as características individuais do usuário – como metabolismo, vulnerabilidade genética, estilo de vida, gênero, fatores nutricionais e tempo de uso do etanol – assim como da quantidade de substância ingerida.

A extensão dos danos cerebrais e déficits cognitivos foram descritos em pacientes dependentes de álcool em processo de desintoxicação. Chanraud e colaboradores (2007) investigaram a relação entre alterações regionais encefálicas, performance executiva (relacionada à cognição) e o histórico de dependência. Os volumes da substância branca e cinzenta foram analisados por ressonância magnética, detectando-se diminuições significativas da substância cinzenta bilateralmente e no dorso lateral do córtex frontal; e em

menor extensão, no córtex temporal, ínsula e cerebelo. As perdas de substância branca mostraram-se espalhadas, especialmente no corpo caloso. Através de testes neuropsicológicos, os pesquisadores concluíram que esses resultados revelam que a degradação da função neuropsicológica está relacionada à diminuição do volume da substância cinzenta no lobo frontal, ínsula, hipocampo, tálamo e cerebelo e na diminuição da substância branca por todo o cérebro provocado pelo alcoolismo.

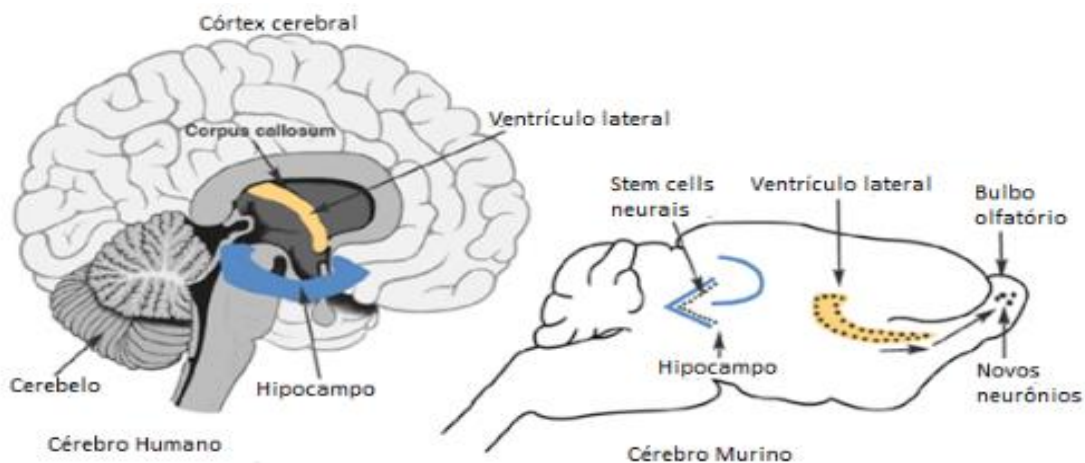
Estudos em modelos animais mostraram que o consumo crônico de etanol promoveu aumento significativo nos processos neurodegenerativos em diversas estruturas encefálicas, como córtex entorrinal, bulbo olfatório e hipocampo (WALKER et al., 1980; COLLINS et al., 1996; FADDA; ROSSETTI, 1998; COSTARDI et al, 2015). Em ratos, esses efeitos degenerativos do etanol parecem estar diretamente relacionados com a quantidade e duração do consumo (WALKER et al., 1980; ROSENWASSER, 2015), e com o padrão de consumo (BONTHIUS; WEST, 1990; ROSENWASSER, 2015).

Os dados expostos acima mostram que o consumo excessivo do álcool causa danos neurológicos permanentes tanto em animais quanto em humanos, levando à diminuição de funções cognitivas, como o aprendizado e a memória (PFEFFERBAUM et al., 1998; COSTARDI et al, 2015; YANG; LUO, 2015). Estes problemas podem estar diretamente relacionados com a significativa neurodegeneração e diminuição da neurogênese no hipocampo e no córtex (MIKI et al., 2000; NIXON; CREWS, 2002; HAMELINK et al., 2005; NIXON, 2006; YANG; LUO, 2015).

1.3.1 Influência do consumo de etanol na neurogênese

A zona subventricular e giro denteado do hipocampo (figura 3) são as únicas estruturas encefálicas onde há a proliferação de novos neurônios durante a vida adulta em diversas espécies animais, inclusive no homem (GOULD et al., 1992, 1997; GAGE et al., 1995).

Figura 3: Encéfalo humano e de rato, mostrando hipocampo e zona periventricular (Adaptado de CREWS; NIXON, 2004).

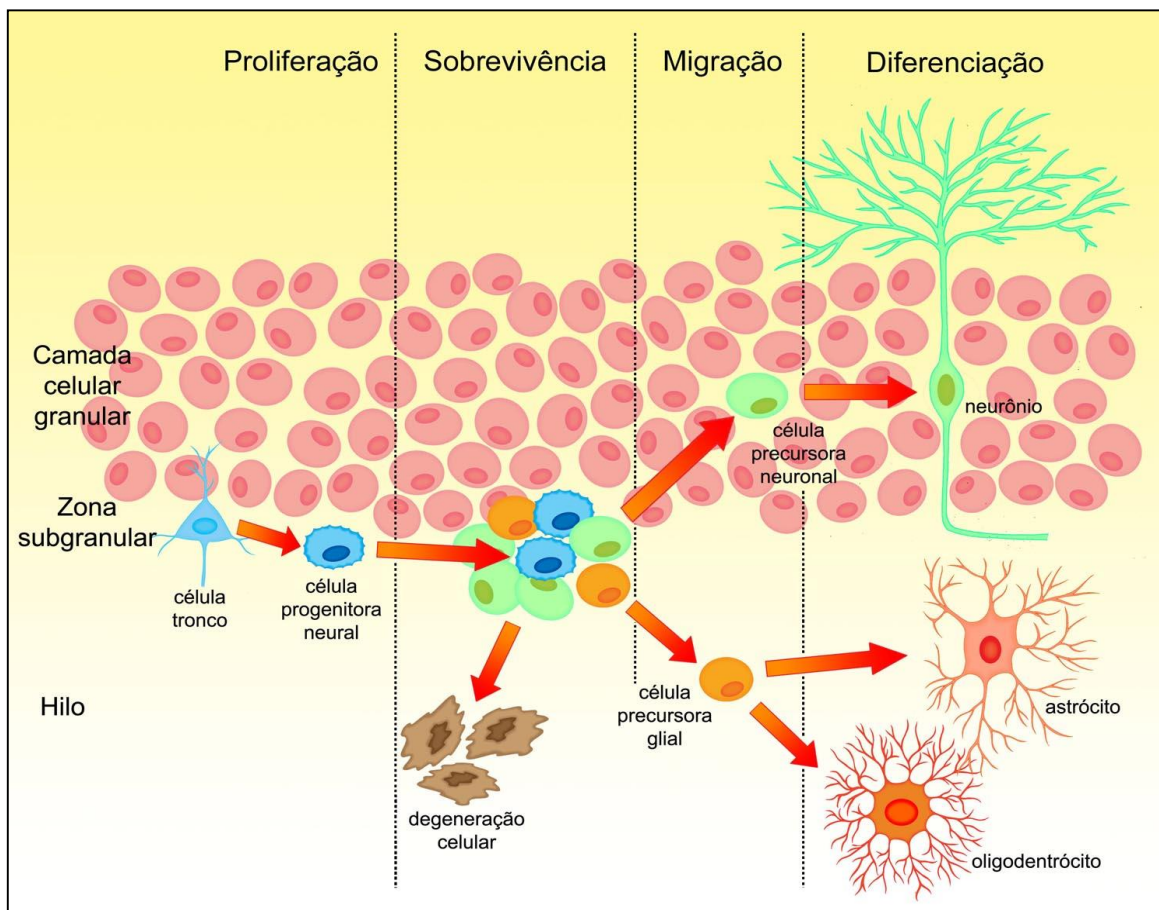


A neurogênese é um processo complexo dividido em várias etapas: proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação celular (CHRISTIE; CAMERON, 2006).

Na etapa de proliferação, as células-tronco na zona subgranular do giro denteado entram em processo de divisão, gerando células progenitoras neurais. A segunda etapa, chamada de sobrevivência, ocorre divisão das células progenitoras levando a formação de células precursoras neuronais e gliais. Cerca de 50% dessas células serão eliminadas no processo de morte celular programada. Em seguida, ocorre a etapa de migração, onde as células

remanescentes migram para o local onde exercerão suas respectivas funções, como por exemplo, memória e aprendizado. A última etapa, chamada de diferenciação celular, ocorre a migração das células precursoras neurais para a camada granulosa onde irão ser diferenciadas em neurônios que integram-se aos circuitos neurais locais. As células precursoras gliais migram para uma camada adjacente, denominada hilo, e diferenciam-se em astrócitos ou oligodendrócitos (TAKASE, 2010), como mostra a figura 4.

Figura 4: Etapas da neurogênese (TAKASE, 2010).



A maioria dos estudos tem maior foco nos neurônios formados no giro denteado do hipocampo, pois podem estar envolvidos em diversos processos cognitivos e fisiológicos, como aprendizado e memória (GROSS, 2000); regulação do humor (JACOBS et al., 2000); e modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais nas respostas ao estresse (HERMAN et al., 1989). Desordens psiquiátricas e neurológicas associadas à formação hipocampal (JACOBS et al., 2000; SHORS et al., 2001) são associadas à diminuição da neurogênese nesta estrutura.

A conexão entre neurogênese e memória ainda não está completamente elucidada, mas há evidências suficientes que sugerem sua participação na aquisição de novas memórias (SHRUSTER et al., 2010).

A neurogênese pode ser estimulada ou inibida através de diversos fatores endógenos ou exógenos. Aumento significativo na neurogênese foram observados após exposição a ambientes enriquecidos (SHORS et al., 2001), exercícios físicos (VAN PRAAG et al., 1999), antidepressivos (MALBERG et al., 2000), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (KUHN et al. 1996). A depleção serotoninérgica (ROSENBROCK et al., 2005a), diversos fatores estressantes (PHAM et al., 2003; YAP et al., 2006), privação do sono (TUNG et al., 2005), glicocorticóides (GOULD et al., 1997), citoquinas (JACOBS et al., 2000) e álcool (NIXON; CREWS, 2002; NIXON, 2006) promoveram inibição da neurogênese.

O consumo do etanol pode afetar potencialmente a neurogênese em todas suas etapas (proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração). O tratamento agudo mostrou redução de aproximadamente 40% na proliferação celular (NIXON; CREWS, 2002) e aumento de aproximadamente 134% no

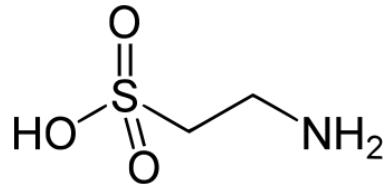
número de células em apoptose (JANG et al., 2002) no giro denteado de ratos quando comparados com o grupo controle. Os efeitos do tratamento crônico ainda não estão totalmente esclarecidos, trabalhos na literatura apresentaram resultados conflitantes. Enquanto alguns estudos demonstraram redução de cerca de 47% na proliferação celular após tratamento crônico com etanol (JANG et al., 2002; HE et al., 2005; NIXON, 2006); outros não encontraram diferenças significativas após 10 dias (RICE et al., 2004) ou 6 semanas (HERRERA et al., 2003) de exposição crônica ao álcool, sugerindo tolerância aos seus efeitos inibitórios.

1.4 Taurina

A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) é o mais abundante aminoácido livre em humanos, apresentando muitos benefícios para a saúde através de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (ZHANG, 2014). Trata-se de um aminoácido sulfurado que não é utilizado na síntese de proteínas (HUXTABLE, 1992). A taurina foi descoberta e isolada da bile de touros (*Bos taurus*) pela primeira vez pelos cientistas alemães Friedrich Tiedemann; Leopold Gmelin em 1827.

A estrutura química da taurina (figura 5) ilustra a presença do grupamento sulfonato e a ausência do grupo carboxílico, comum em outros aminoácidos (RIPPS; SHEN, 2012).

Figura 5: Estrutura química da taurina (Adaptado de RIPPS; SHEN, 2012).



Aproximadamente 0,1% do peso corporal é representado pela taurina a qual é encontrada em maiores concentrações especialmente em estruturas cujos tecidos são mais excitáveis, como músculo esquelético, tecido cardíaco, retina e sistema nervoso central (MACAIONE et al., 1974; WARSKULAT et al., 2004; OJA; SARANSAARI, 2007).

Em contraste com indivíduos adultos que sintetizam taurina no fígado e no SNC os recém-nascidos são incapazes de sintetizar quantidades suficientes do aminoácido, sendo portanto, dependentes do fornecimento alimentar. Com isso, a taurina é muitas vezes referida como um aminoácido semi-essencial. Por não possuir o grupamento carboxílico, seu caráter ácido torna o composto completamente “zwitteriônico” em pH fisiológico, o que o diferencia da maioria dos aminoácidos carboxílicos ionizáveis (HUXTABLE 1992; LAMBERT, et al, 2015).

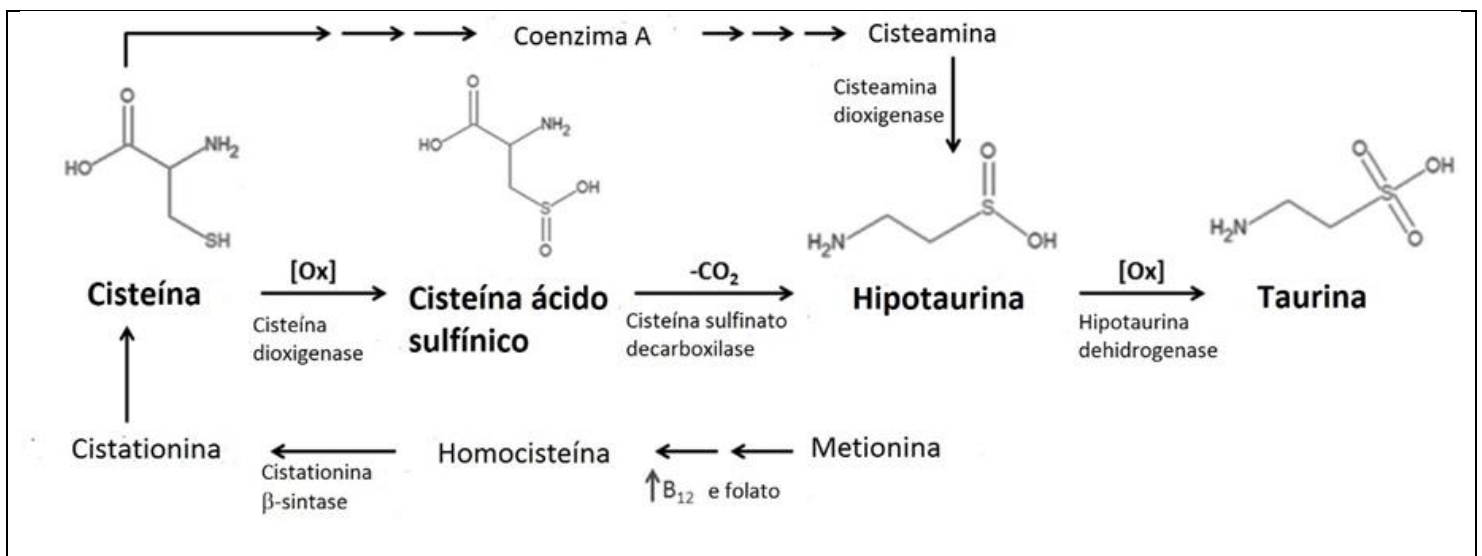
A natureza zwitteriônica da taurina confere alta solubilidade em água e baixa lipofilicidade, explicando assim sua impermeabilidade às membranas biológicas (HOFFMANN; LAMBERT 1983, PASANTES-MORALES et al., 1986).

Em mamíferos, o *pool* total de taurina é um equilíbrio entre: i. Síntese a partir da metionina/cisteína; ii. Absorção dos alimentos no intestino/reabsorção

da urina nos rins; iii. Excreção como sal de bile (taurocolato) e taurina não conjugada na urina via renal (LAMBERT, et al, 2015).

A biossíntese da taurina é realizada principalmente no fígado, podendo ser sintetizada em outras partes do organismo, como no SNC (MAGNUSSON et al., 1989). A síntese hepática ocorre através da via da ácido cisteína sulfínico (figura 6).

Figura 6: Biossíntese da taurina (adaptado de DE LUCA et al, 2015).



A reação metabólica hepática consiste em uma primeira oxidação do grupo sulfidríla da cisteína em ácido cisteína sulfínico pela enzima cisteína dioxigenase. O ácido cisteína sulfínico é em seguida descarboxilado para hipotaurina pela cisteína sulfinato decarboxilase. A hipotaurina sofre então, oxidação espontânea ou oxidação enzimática pela hipotaurina desidrogenase, para formar a taurina.

Esta síntese é altamente variável entre os indivíduos e também está relacionada com o estado nutricional, com a quantidade de proteínas ingeridas e à disponibilidade da cisteína (HUXTABLE, 1992; FAGGIANO et al, 2005; DE

LUCA et al, 2015). Por sua vez, a disponibilidade da cisteína é altamente dependente do equilíbrio metabólico entre a homocisteína e metionina, via ácido fólico e vitamina B12 além da eficiência da enzima metiltetraidrofolato redutase.

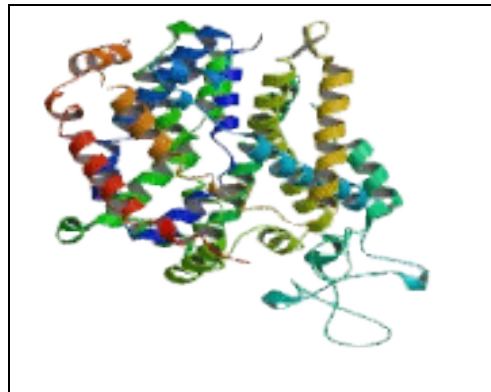
Apesar de ser produzida endogenamente, uma certa quantidade de taurina é introduzida através da alimentação, principalmente em carnívoros e em menor quantidade em omnívoros (HUXTABLE, 1992).

Há grande variação da quantidade de taurina presente nos alimentos, sendo esta de $<1\mu\text{mol}$ por 100g de peso (frutas, verduras, vegetais, sementes e legumes), aproximadamente $20\mu\text{mol}$ por 100mL (leite de vaca), $40\mu\text{mol}$ por 100mL (leite materno), entre $300\text{-}500\mu\text{mol}$ por 100g de peso (carne de vaca e porco), $1000\text{-}6000\mu\text{mol}$ por 100g de peso (carnes de aves escuras, peixes e mariscos) (LAIDLAW et al. 1990; STURMAN, 1993; LAMBERT et al, 2015).

No entanto, apesar da propriedade hidrossolúvel da taurina, a sua alta concentração intracelular é garantida pela presença de transportadores ativos específicos que concentram a taurina no interior das células contra o gradiente de concentração (DE LUCA et al, 2015).

A absorção de taurina é mediada pelo transportador TauT (SLC6A6, Figura 7), membro da família de transportadores SLC6 (transportadores solutos 6) dependentes de sódio e de cloreto, presentes nas microvilosidades intestinais (LAMBERT, 2015). Esses transportadores consistem de pelo menos 16 membros altamente homólogos (CHEN et al, 2004), incluindo os transportadores de neurotransmissores (GABA, glicina, dopamina, noradrenalina e serotonina), bem como transportadores para creatina (LAMBERT; HANSEN, 2011).

Figura 7. Transportador de taurina - TauT (adaptado de Cloud-Clone Co.).



O início da absorção de taurina ocorre a partir da ligação do sódio com os domínios intramembranas de TauT, mudando sua estrutura terciária, facilitando assim sua ligação e o seu transporte (LAMBERT, 2004). O transportador TauT é dependente de Na^+ e Cl^- , possui baixa capacidade de transporte, porém alta afinidade pela taurina (LAMBERT et al, 2015). A estequiometria de Na^+ , Cl^- e taurina é geralmente 2.5:1:1 (VOSS et al, 2004) embora essa proporção seja susceptível a variações dependendo do tipo de células (LAMBERT, 2004; LAMBERT; HANSEN, 2011).

A absorção de taurina ocorre também pelo transportador PAT1, que pertence a família SLC36. No entanto, PAT1 é pH dependente e independente de Na^+ e Cl^- e baixa afinidade pela taurina, isto é, PAT1 é responsável pela absorção da taurina advinda da dieta e não das microvilosidades intestinais (ANDERSON et al., 2009; LAMBERT; HANSEN, 2011).

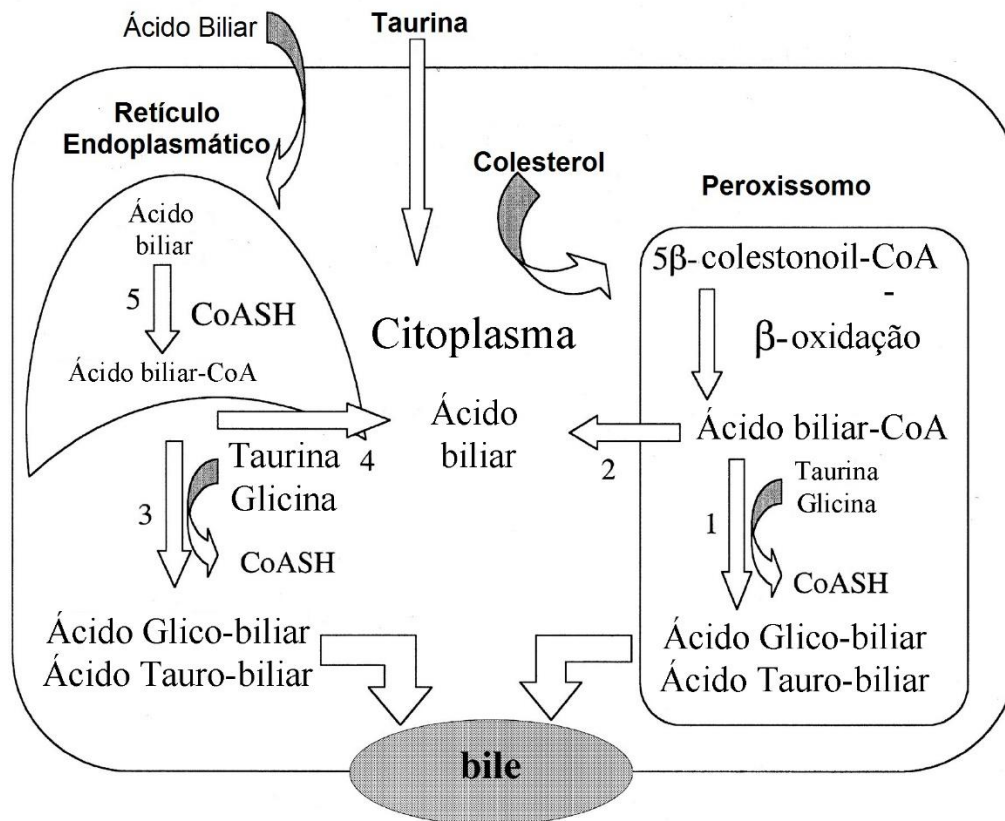
Após ser absorvida pelo intestino, a taurina é liberada para a corrente sanguínea através de uma via não saturada desconhecida (ROIG-PEREZ et al., 2005; LAMBERT, 2015). Na corrente sanguínea, a mesma é distribuída para os tecidos e células onde é mais uma vez absorvidos pelos transportadores TauT ou PAT1. Foi verificado que a captação principal ocorre pelo TauT, através de estudos em camundongos *knockout* para este

transportador, onde a taurina foi reduzida em 90% em alguns tecidos (LAMBERT, 2015).

A concentração de taurina nos tecidos varia de 5 a 50mM (JACOBSEN; SMITH, 1968), sendo que a mais alta concentração foi verificada em tecidos com atividade metabólica (WRIGHT et al. 1986; LAMBERT, 2015), A musculatura esquelética contém o maior *pool* de taurina no corpo, totalizando 70% do seu total (HUXTABLE, 1992).

Os mamíferos não possuem enzimas para metabolizar a taurina, portanto sua excreção ocorre através da urina (HAYES; STURMAN, 1981) ou pela conjugação com ácidos biliares, sendo excretada pelas fezes (figura 8) (GLASS et al., 1992; HANSEN, 2004). A elevada ingestão de taurina também aumenta a excreção de ácido biliar fecal (NISHIMURA et al., 2003; LAMBERT, 2015).

Figura 8: Conjugação de taurina e ácidos biliares. No lado esquerdo do esquema, encontramos as células da região periportal, já no lado direito, região pericentral. (Adaptado de SOLAAS e col, 2000).



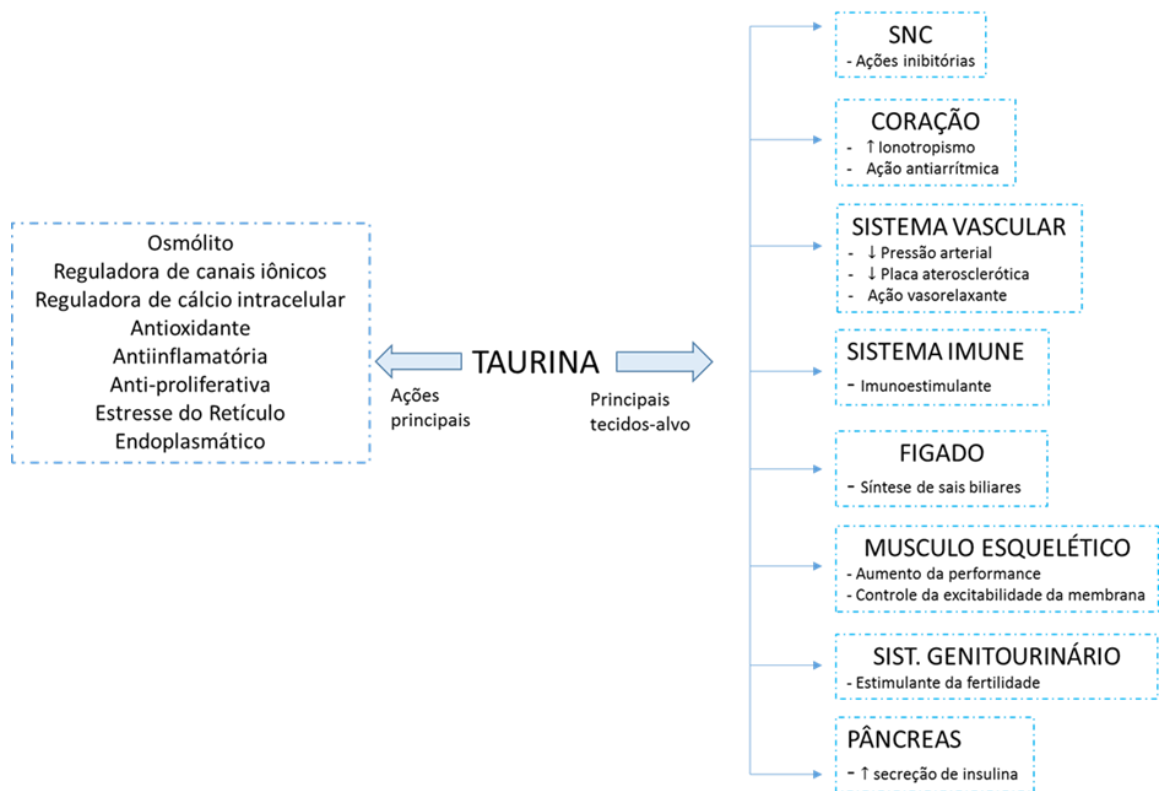
1: Peroxissomo biliar ácido-CoA: aminoácido N-aciltransferase; 2: bile peroxisomal ácido-CoA tioesterase; 3: ácido-CoA citosólica biliar: aminoácido N-aciltransferase; 4: bile citosólica ácido-CoA tioesterase; 5: ácido-CoA sintetase biliar microsomal

Foi demonstrado que níveis normais de taurina são essenciais para o correto funcionamento do organismo sendo que sua depleção provoca problemas no desenvolvimento (STURMAN, 1993) e diversos quadros patológicos, como cardiomiopatias severas (PION et al., 1987; XU et al, 2008; YAMORI et al., 2010; ZULLI, 2011), disfunção renal (YAMORI et al., 2010; RIPPS; SHEN, 2012) e retinopatias (HAYES et al., 1975).

A taurina possui muitos e diferentes papéis fisiológicos em vários tecidos. Algumas ações da taurina, tal como o efeito inibidor no SNC, parecem ser mediados através de um mecanismo receptor, enquanto que os efeitos sobre

os outros tecidos e sistemas parecem ocorrer através de mecanismos de ação menos definidos. Na Figura 9 encontra-se os principais efeitos da taurina, como a capacidade de controlar a reação imune e inflamação, através da inibição de NF- κ β , assim como o principal papel da taurina em conjugação de sais biliares (DE LUCA et al, 2015).

Figura 9: Taurina, suas funções e seus diferentes papéis fisiológicos (adaptado de DE LUCA et al, 2015).

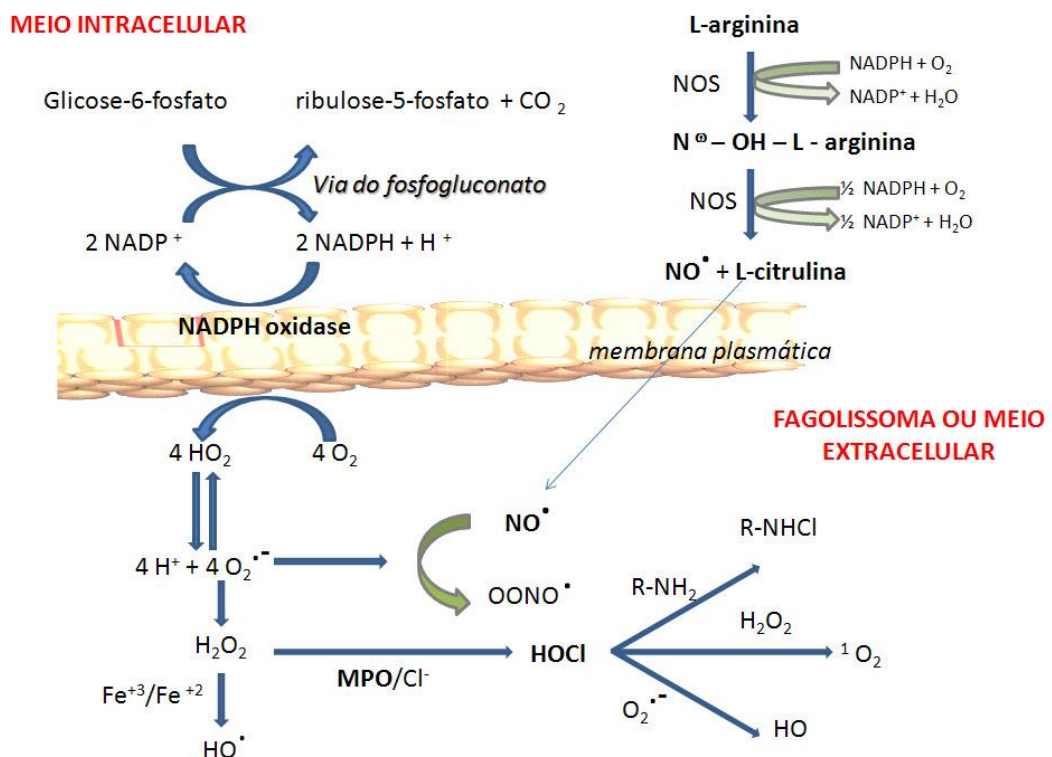


O estresse oxidativo é um dos principais fatores responsáveis para o desenvolvimento de danos em tecidos, tais como infecção, inflamação aguda e crônica, câncer e envelhecimento. Num sitio inflamatório, ocorre a migração de leucócitos ao tecido promovendo a liberação de enzimas hidrolíticas que

encontram-se estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, como a mieloperoxidase (MPO), que está presente nos grânulos azurófilos. Ocorre então dano através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente oxidação de biomoléculas (VELOSSA, 2007).

São duas, as enzimas essenciais para este processo: NADPH oxidase, responsável pela catálise da redução monovalente do oxigênio molecular e ânion superóxido e a MPO, que utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar o íon cloreto a ácido hipocloroso (HOCl). (Figura 10)

Figura 10: Mecanismo de formação de EROs pelos leucócitos durante o processo inflamatório (VIZIOLI, 2009).



Entre os EROs, encontramos o ânion superóxido (O_2^-) que é gerado após redução eletrônica do O_2 , ocorrendo em quase todas as células, além da ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. A forma protonada (HO_2^\bullet), chamada de radical hidroxiperoxil, é mais reativa que o próprio superóxido. O oxigênio, no seu estado excitado é chamado de oxigênio singleto (1O_2), não é considerado um radical, pois não possui elétrons desemparelhados, porém é altamente reativo, podendo oxidar facilmente lipídeos de membranas biológicas. O peróxido de oxigênio (H_2O_2) é altamente tóxico, mesmo não sendo um radical livre, produz o radical hidroxil (HO^\bullet), que é um dos mais reativos radicais livres, sendo capaz de reagir tanto com proteínas ligadas ao íon Fe^{2+} como com membranas biológicas. Quando a óxido nítrico sintase (NOS) é ativada ocorre a formação de dois radicais: o NO e o peroxinitrito ($OONO^-$). O NO é uma espécie reativa do nitrogênio, que, em meio aquoso pode formar outras espécies reativas, já o $OONO^-$ é um potente oxidante, produto da reação do NO com O_2^- . O HOCl, é a espécie oxidante mais abundante, e é produto da oxidação do cloreto, é catalisada pela mieloperoxidase. Por isso, pode dar origem ao radical hidroxil e o oxigênio singleto, além de apresentar um alto padrão de intoxicação celular, pois os mamíferos não possuem enzimas catalíticas capazes de detoxicar oxidantes clorados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Essas EROS desempenham um papel benéfico na defesa do hospedeiro contra patógenos, porém pode levar ao desenvolvimento de lesões nos tecidos (WEISS 1988; SMITH, 1994; MARCINKIEWICZ; KONTNY, 2014). A taurina é encontrada em concentrações particularmente elevadas nos tecidos expostos a níveis elevados de oxidantes, sugerindo o seu papel na atenuação do estresse

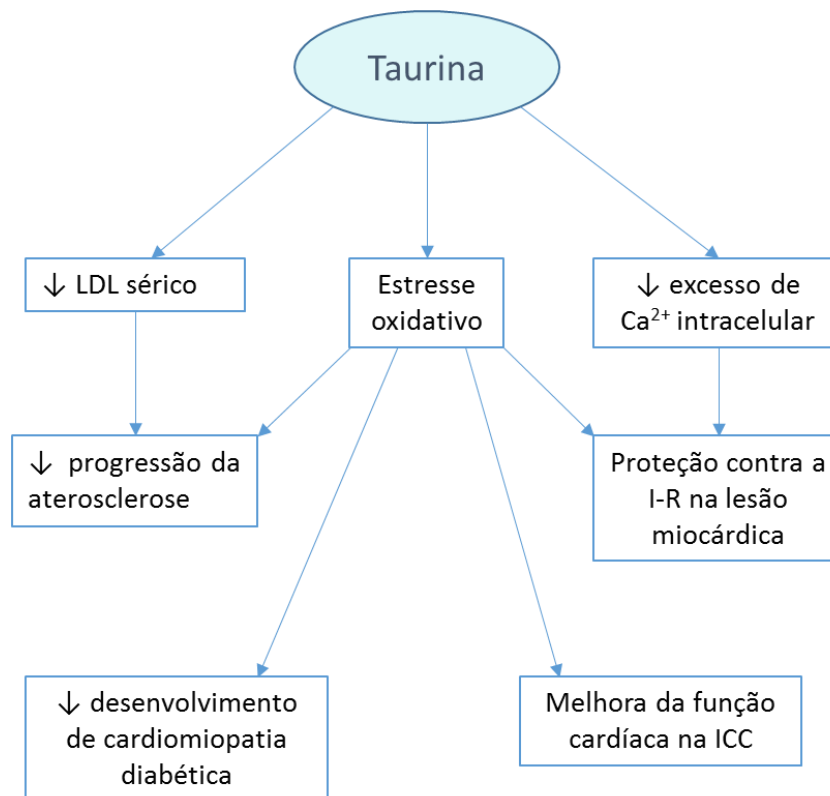
oxidativo (GREEN et al., 1991; JEON et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010.) A melhor ação antioxidante da taurina é a neutralização do ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante extremamente tóxico gerado pelo sistema de mieloperoxidase-halogeneto (WEISS et al., 1982), levando a formação de taurocloramina (TauCl), um mediador anti-inflamatório mais estável e menos tóxico (WEISS et al., 1982; THOMAS, 1979; MARCINKIEWICZ; KONTNY, 2014).

Trabalhos sugerem que a Tau-Cl seja capaz de inibir a formação de mediadores inflamatórios como NO, TNF- α e PGE2. Este efeito parece ser observado com a Tau-Cl, mas não pela taurina isoladamente (MARCINKIEWICZ et al., 1998).

Em 2006, KONTNY e colaboradores observaram, também, a inibição pela Tau-Cl da proliferação de sinoviocitos FLS (fibroblasto-like sinoviócitos), células que participam do processo de sinovite e hiperplasia sinovial, considerados como fatores importantes na caracterização da artrite reumatoide. Klamt e Shacter (2005) demonstraram que a Tau-Cl minimizam os efeitos de respostas inflamatórias incontroláveis responsáveis pela morte celular (necrose) causadas pela HOCl.

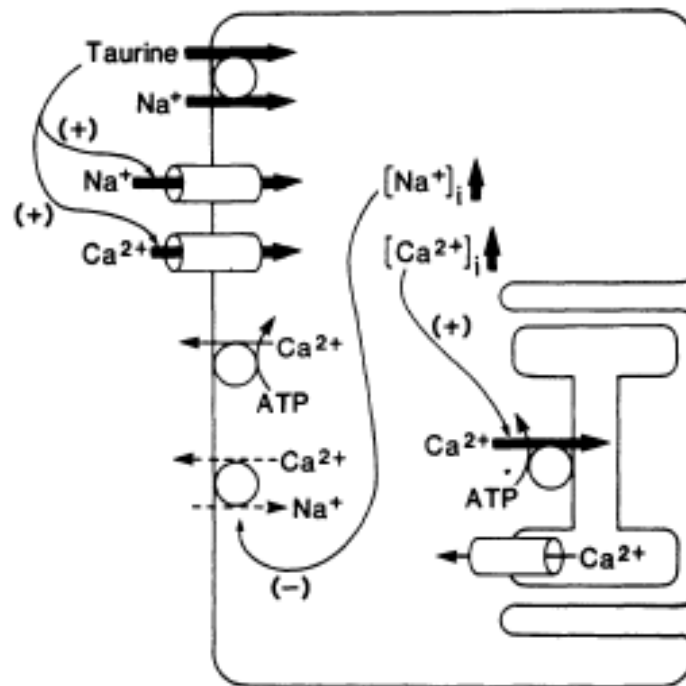
No sistema cardiovascular, a taurina promove uma série de benefícios potenciais como diminuição da progressão da aterosclerose e do desenvolvimento de cardiomiopatia diabética, proteção contra a isquemia-reperfusão (I-R) na lesão miocárdica e melhora da função cardíaca na insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (figura 11) (XU et al., 2008).

Figura 11: Efeitos da taurina nos distúrbios cardiovasculares (adaptado de Xu et al, 2008).



A figura 12 apresenta a ação da taurina diretamente nos canais de sódio e cálcio no sarcolema, promovendo um aumento no influxo destes íons e através do sistema simporte TAU/Na⁺, o qual promove um aumento lento intracelular dos níveis de sódio.

Figura 12: Efeito da taurina extracelular no transporte de cálcio ao coração (adaptado de SHAFFER; BALLARD; AZUMA, 1994).



Assim, a taurina possui capacidade de melhorar a contratilidade cardíaca, sendo útil em quadros de insuficiência. Entretanto o acúmulo de Ca^{2+} no sarcolema é tóxico ao miócito. Neste processo, a taurina promove o efluxo de Ca^{2+} , reequilibrando o sistema à normalidade (SHAFFER; BALLARD; AZUMA, 1994)

1.4.1 Efeitos da taurina na hipertensão

A taurina tem sido estudada como um possível agente para o controle da hipertensão. Essa hipótese surgiu no Japão onde se verificou em estudos de correlação, que os alimentos ricos em aminoácidos sulfurados, como peixes,

pareciam prevenir a hipertensão e o acidente vascular cerebral (YAMORI et al., 1996). Por isso, a taurina é vista como uma opção atraente para o tratamento da hipertensão, pois, além de ser um aminoácido, é relativamente barata, não tóxica e facilmente disponível (MILITANTE; LOMBARDINI, 2002).

A taurina é bem conhecida por reduzir a pressão arterial em modelos animais hipertensos. No entanto, nenhum estudo clínico rigoroso validou se este efeito benéfico da taurina ocorre na hipertensão ou pré-hipertensão humana. Sun e colaboradores (2016) realizaram estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, onde avaliaram os efeitos da intervenção com taurina na pressão arterial (PA) e na função vascular na pré-hipertensão. Neste estudo, 120 indivíduos pré-hipertensos, escolhidos aleatoriamente, receberam suplementação de taurina (1,6 g por dia) ou um placebo durante 12 semanas e verificou-se que a suplementação com taurina diminuiu os valores de PA. Na pressão sistólica a redução média da PA (taurina/placebo) foi 7,2/2,6 mmHg, e diastólica foi de 4,7/1,3 mmHg, ou seja, o efeito anti-hipertensivo da suplementação crônica de taurina mostra a promessa no tratamento da pré-hipertensão através da melhoria da função vascular.

A hipertensão tem sido estudada utilizando vários modelos experimentais sendo que a maioria emprega o uso de ratos (PINTO et al., 1998). Enquanto o modelo mais comum é o rato espontaneamente hipertenso (SHR), outros modelos são também utilizados, como o rato DOCA-sal (ratos normais que receberam acetato de desoxicorticosterona), a Dahl-S (sensível aos efeitos de uma dieta de elevado teor de sal) e o rato hipertenso renovascular (RHR) onde a hipertensão foi induzida cirurgicamente em ratos normais que sofreram corte cirúrgico da artéria renal, reduzindo, assim, o fluxo

sanguíneo para o rim, além do modelo de consumo forçado de etanol, que foi foco do nosso estudo (MILITANTE; LOMBARDINI, 2002).

Militante e Lombardini (2002) relataram vários experimentos com os modelos acima citados, onde os animais receberam a suplementação de taurina na água (concentração de 1,5% a 3% dependendo do modelo animal utilizado). Foi verificado que os efeitos hipotensivos da taurina estavam associados à redução de outros problemas cardiovasculares tais como acidente vascular cerebral, hipercolesterolemia, aterosclerose e hipertrofia cardíaca (YAMORI et al., 1996; DAWSON et al., 2000), sugerindo que a taurina não atua através de um mecanismo específico, mas sim por meio da modulação simultânea de vários processos fisiológicos inter-relacionados com os aspectos cardiovasculares.

Em outro modelo hipertensivo os ratos receberam éster metílico de N-nitro-L-arginina (LNAME), que levou a redução de óxido nítrico, desenvolvendo assim, um quadro hipertensivo. Esses animais receberam taurina 1% ou 2% na água de beber. Os resultados mostraram que a taurina aumentou os níveis séricos de óxido nítrico e óxido nítrico sintase, inibindo, assim, a elevação da pressão sanguínea (HU et al., 2009).

Há poucos trabalhos na literatura relacionando o uso da taurina em quadros de hipertensão induzida pelo álcool. Alguns estudos mostraram que a administração de taurina preveniu o desenvolvimento de quadro hipertensivo em modelos animais (FUJITA; SATO, 1986; HARADA et al., 2000) e diminuiu a pressão arterial em casos de hipertensão arterial idiopática (YAMORI et al., 1996; SUWANICH et al., 2013).

Estes estudos sugerem que um dos possíveis mecanismos anti-hipertensivos da taurina está relacionado com o aumento do metabolismo do etanol. A taurina aumenta os níveis séricos da aldeído desidrogenase, que é responsável pela degradação do acetaldeído. O acetaldeído é produto metabólico primário do etanol, é altamente reativo e pode se ligar a diversas proteínas plasmáticas e outros componentes biológicos, podendo causar os efeitos adversos da intoxicação alcoólica (SORRELL; TUMA, 1987). A taurina ativa a da aldeído desidrogenase, responsável pela degradação do acetaldeído (WATANABE et al., 1986; WU et al., 2013; HSIEH et al., 2014) diminuindo os níveis deste composto após a exposição ao etanol (WATANABE et al., 1985).

Harada et al. (2000) mostraram que a suplementação de taurina preveniu o desenvolvimento da hipertensão induzida pelo etanol. O estudo ainda mostrou diminuição da concentração do acetaldeído associado à hemoglobina, um marcador de ligação proteica do acetaldeído. Estes dados sugerem a suplementação de taurina promove melhoras em quadros hipertensivos através da diminuição da reatividade do acetaldeído com proteínas plasmáticas.

1.4.2 Taurina e SNC

A maior parte da biossíntese da taurina é realizada no fígado, no entanto estruturas encefálicas como o hipocampo e o cerebelo também podem produzi-la endogenamente em pequenas quantidades (CHAN-PALAY et al., 1982; MAGNUSSON et al., 1989). Em sua estrutura molecular, como possui um ácido

sulfônico, e não um ácido carboxílico, a taurina apresenta propriedades físicas únicas quando comparada aos outros aminoácidos neuroativos, como maior dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica. Sua concentração no SNC depende principalmente da dieta e do complexo mecanismo de transporte ativo, dependente de TauT, presente na barreira hematoencefálica (TSUJI; TAMAI, 1996).

Apesar de não ser classificada como neurotransmissor, a taurina possui diversas funções características de neurotransmissores, como associação com estruturas das membranas sinápticas (KONTRO; OJA, 1987), sua co-localização com suas enzimas sintetizantes na membrana pré-sináptica (MAGNUSSON et al., 1989) e recaptação através de TauT (URQUHART et al., 1974; TSUJI; TAMAI, 1996).

1.4.2.1 Taurina como neurotransmissor

Em geral, uma substância pode ser considerada como um neurotransmissor se apresentar o seguinte conjunto de critérios: i. a substância e/ou sua enzima de síntese devem estar presentes no neurônio, preferencialmente nos terminais do axônio; ii. deve ser liberada de maneira cálcio-dependente; iii. induz respostas fisiológicas efetivas; iv. ter receptores específicos e v. possuir mecanismo de inativação (WU; PRENTICE, 2010).

Diversas evidências reforçam a teoria de que a taurina age como um neurotransmissor em mamíferos: o ácido sulfônico cisteína descarboxilase (CAD/CSAD), enzima específica responsável pela biossíntese da taurina, pode ser observada no corpo celular, dendritos e terminais dos axônios de

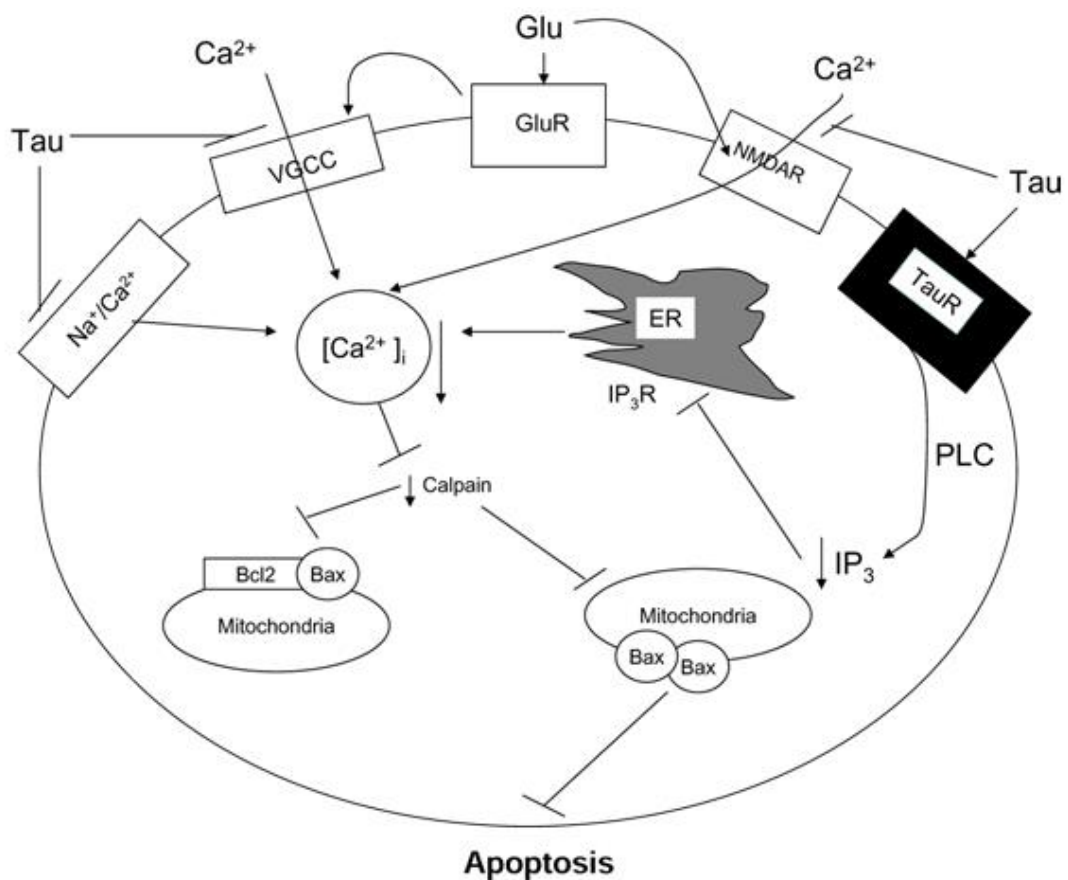
neurônios; a liberação de taurina na fenda sináptica é feita tanto de maneira cálcio-dependente quanto não-dependente; a taurina promove hiperpolarização, provavelmente através da abertura de canais de cloro no cerebelo e hipocampo; identificação de receptores específicos para taurina na membrana neuronal; e a presença de mecanismos de inativação do sistema de transporte de taurina. Em resumo, a taurina tem cumprido a maioria, se não todos os critérios para ser aceito como um neurotransmissor no SNC dos mamíferos (WU; PRENTICE, 2010).

No SNC, a taurina apresenta diversas funções, quase todas relacionadas à neuroproteção, como a regulação da osmolaridade celular (MORALES et al., 2007), ação antioxidante (JONG et al., 2012), modulação da neurotransmissão gabaérgica (WU et al., 2009), manutenção da homeostase do cálcio (EL IDRISSE, 2008), inibição da excitotoxicidade mediada pelo glutamato (PAULA-LIMA et al., 2005), inibição de mediadores inflamatórios (SUN et al., 2012), inibição pró-proteínas apoptóticas e estimulação de proteínas anti-apoptóticas (LEON et al., 2009; DAS et al., 2011).

O glutamato ou ácido glutâmico (Glu) é o principal aminoácido e neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e possui papel importante na diferenciação, migração e sobrevivência neural no cérebro desenvolvido, além da manutenção das sinapses e plasticidade. Porém o excesso de Glu extracelular pode causar dano e até morte da célula. É muito bem estabelecida as propriedades neuroprotetoras da taurina contra o dano neuronal induzido por glutamato, em cultura de células, pois ela mantém a homeostase do cálcio intracelular, além da integridade da membrana e suas funções antioxidantes (WU et al., 2009).

O efeito neuroprotetor da taurina contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato está relacionado principalmente com dois mecanismos: redução da concentração de íons livre de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e ação inibitória sobre o estresse oxidativo (Figura 13).

Figura 13: Ação da taurina contra a apoptose induzida por glutamato (adaptado de WU; PRENTICE, 2010).



A taurina reduz a concentração de Ca^{2+} intracelular através da inibição da entrada deste íon fechando diferentes tipos de canais de cálcio. Esse aminoácido ainda reduz a liberação de cálcio pelas vesículas de armazenamento através da inibição da fosfolipase C. E também inibe a ativação da calpaína e subsequente heterodimerização da Bcl-2 (anti-

apoptótica) e Bax (pró-apoptótica), resultando na alteração de expressão destas proteínas, inibindo a liberação do citocromo C e a cascata de eventos que levam à apoptose neuronal. (HENSHALL et al, 2002; WU et al., 2009; WU; PRENTICE, 2010).

A taurina protege os neurônios contra a excitotoxicidade induzida pelo excesso de glutamato, através da inibição da despolarização da membrana. Esse efeito, provavelmente ocorre pela abertura de canais de cloreto, impedindo assim o influxo de cálcio induzido pelo glutamato. A exposição excessiva ao glutamato pode causar dano neuronal tanto através de apoptose como de necrose, dependendo da recuperação da função mitocondrial (ANKARCRONA et al., 1995). A apoptose induzida por glutamato levando a degeneração neuronal pode ser observada em doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer (MASLIAH et al., 1998) e doença de Huntington (PORTERA-CAILLIAU et al., 1995; MENZIE et al., 2012). Esta ação neuroprotetora pode estar relacionada com as melhoras cognitivas observadas após administração de taurina.

1.4.2.2 Taurina e neurogênese

Estudos demonstraram a importância da taurina no desenvolvimento do SNC. Seus níveis no cérebro imaturo são 3-4 vezes maiores que no cérebro adulto, esta diminuição idade-dependente pode ser observada em diferentes espécies, como camundongos, ratos, macacos e humanos (AGRAWAL et al., 1968; STURMANAND; GAULL, 1975; MILLER et al., 2000). Deficiência em taurina promoveu significativos déficits no desenvolvimento neural de gatos,

ratos e macacos, e estes efeitos foram prevenidos pela suplementação de taurina durante a gestação (LIU et al., 2011).

Estudo *in vitro*, utilizando cultura de células de camundongos neonatos mostrou a importância da taurina nas fases iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso pós-natal, através da estimulação da proliferação celular e sinaptogênese. A suplementação com taurina aumentou a proliferação de células progenitoras neurais em culturas de células e no giro denteado de fatias organotípicas de hipocampo (SHIVARAJ et al., 2012).

Hernández-Benítez et al. (2012), utilizando cultura de células da zona periventricular de camundongos adultos, mostraram que a exposição à taurina aumentou significativamente o número de células precursoras neurais, que se arranjaram em neuroesferas ao redor de células tronco. Dados deste mesmo estudo sugerem que o aumento das células progenitoras se deu pela estimulação da proliferação celular através do aumento da atividade de replicação do DNA no ciclo celular.

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina bacteriana que gera intensa resposta inflamatória e consequente inibição da neurogênese hipocampal (FUJIOKA; AKEMA, 2010). Estudo *in vivo* demonstrou que o pré tratamento com taurina reverteu esta inibição da neurogênese induzida pelo LPS em ratos adultos (WU et al., 2013). Este mesmo trabalho mostrou ainda significativa redução na concentração plasmática de TNF- α e IL-1 β nos animais que receberam a taurina.

A apoptose neuronal ocorre principalmente durante o período de desenvolvimento e maturação do sistema nervoso (SASTRY; RAO, 2000), no entanto, o processo de morte celular ainda pode ser observado no giro

denteado do hipocampo de animais adultos (BIEBL et al., 2000). Estudo da literatura mostrou que cerca de 50% das novas células produzidas no hipocampo se degradam e morrem mesmo em condições normais (DAYER et al., 2003). A taurina pode influenciar a sobrevivência celular modulando a cascata de eventos que leva a apoptose através da inibição de pró-proteínas apoptóticas e estimulação de proteínas anti-apoptóticas (LEON et al., 2009; DAS et al., 2011).

Assim, espera-se que a administração de taurina possa ser capaz de reverter a inibição da neurogênese observados em ratos submetidos ao consumo crônico e excessivo de etanol. Além disso, os demais efeitos neuroprotetores da taurina, como sua ação antioxidante, neuromodulação da neurotransmissão gabaérgica e inibição da excitotoxicidade mediada pelo glutamato e de mediadores inflamatórios, também possam influenciar tanto a proliferação quanto a sobrevivência celular.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da taurina na função cardiovascular e neurogênese hipocampal em ratos submetidos ao consumo crônico de etanol

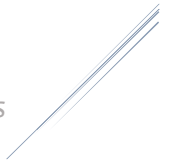
2.1 Objetivos específicos:

No aspecto cardiovascular, o objetivo foi avaliar:

- 1 – Valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca.
- 2 – Resposta cardíaca do barorreflexa.
- 3 – Respostas cardiovasculares induzidas por um estímulo estressor agudo (restrição).

No SNC, o objetivo foi analisar através da quantificação do volume hipocampal, proliferação celular (células imunorreativas ao Ki-67), sobrevivência celular (células imunorreativas ao BrdU), neurogênese (células imunorreativas ao DCX) e apoptose (células picnóticas) no giro denteado do hipocampo:

- 1 – O efeito neuroprotetor da taurina na neurogênese hipocampal contra os efeitos do consumo de etanol.
- 2 – Os efeitos da administração de taurina na reversão dos efeitos do consumo de etanol na neurogênese hipocampal.



Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais, análise da função cardiovascular e perfusão dos animais foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia – PANT - da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, sob a supervisão do Prof Dr Carlos César Crestani.

O processamento dos encéfalos, reações de imunohistoquímica e análise da neurogênese hipocampal foram realizadas no Laboratório de Anatomia do Departamento de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar, sob a supervisão do Prof Dr Luiz Fernando Takase.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal variando entre 240-260g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu-SP). Os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara–UNESP no mínimo sete dias antes do início dos experimentos.

Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água e foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (protocolo: CEUA/FCF/CAR nº 72 de 2015) (anexo 1).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram então divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: H₂O+Sal, EtOH+Sal, H₂O+TAU e EtOH+TAU.

Os animais do grupo EtOH foram submetidos ao modelo de consumo de etanol, onde foi ofertado aos animais garrafas contendo concentrações variadas de etanol (5 % v/v na 1^a semana, 10% v/v na 2^a. semana e 20% v/v na 3^a.e 4^a. semanas), sem a oferta de garrafas contendo apenas água, durante o período de 28 dias. Os animais do grupo controle (H₂O) foram mantidos com água *ad libtum*.

Já os animais do grupo TAU receberam diariamente injeção de taurina (i.p., 300 mg/kg, diluída em solução salina 0,9% estéril, no volume de 1ml/kg) durante o período de 28 dias. Os animais do grupo controle (Sal) receberam injeções apenas do veículo (solução salina 0,9% estéril, no volume de 1ml/kg).

A Tabela 1 mostra os diferentes grupos experimentais do presente trabalho e seus respectivos tratamentos.

Tabela 1 – Grupos experimentais utilizados no presente trabalho e seus respectivos tratamentos.

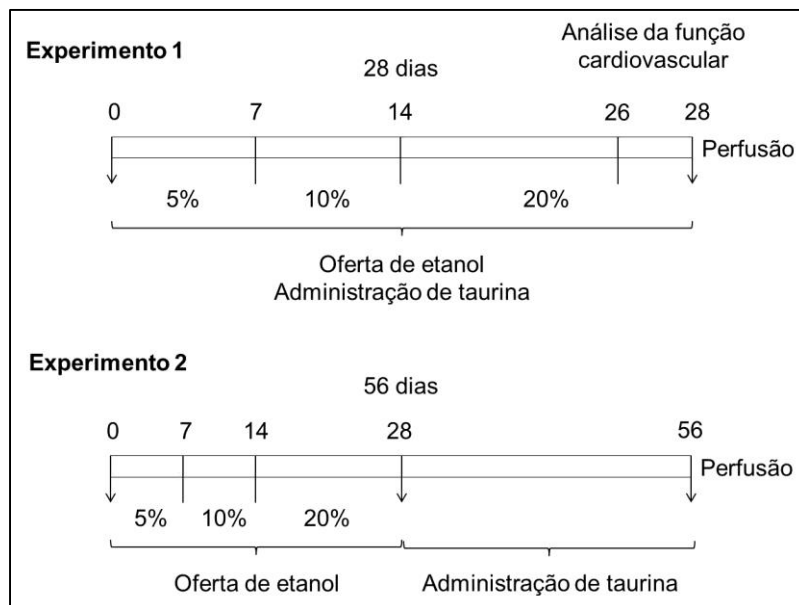
Grupo experimental	Tratamento
H ₂ O+Sal	Animais foram mantidos com água <i>ad libtum</i> e receberam injeções diárias do veículo.
EtOH+Sal	Animais foram submetidos ao modelo de consumo de etanol e receberam injeções diárias do veículo.
H ₂ O+TAU	Animais foram mantidos com água <i>ad libtum</i> e receberam injeções diárias de taurina.
EtOH +TAU	Animais foram submetidos ao modelo de consumo de etanol e receberam injeções diárias de taurina.

O presente também trabalho foi dividido em dois experimentos. O primeiro experimento analisou os efeitos protetores da taurina sobre o sistema cardiovascular e na neurogênese hipocampal contra os efeitos do consumo de etanol; já o segundo experimento analisou se a administração de taurina foi capaz de reverter os efeitos do consumo de etanol na neurogênese hipocampal.

3.2.1 EXPERIMENTO 1 - Análise do papel protetor da taurina no sistema cardiovascular e na neurogênese hipocampal contra os efeitos do consumo de etanol

Neste experimento, os animais foram submetidos ao protocolo de consumo de etanol conforme descrito anteriormente. Juntamente com a oferta de etanol, os animais receberam injeções diárias de taurina durante o período de 28 dias. Os animais dos respectivos grupos controle receberam injeção apenas do veículo.

No 26^o dia, os animais foram submetidos a cirurgia de canulação da artéria e veia femoral para registro dos valores basais de pressão arterial média e frequência cardíaca; e análise das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo, realizados nos 27^o e 28^o dias, respectivamente (Figura 14).

Figura 14: Esquema dos experimentos realizados no presente trabalho.

3.2.2 EXPERIMENTO 2 - Análise do papel da administração de taurina na reversão dos efeitos do consumo de etanol na neurogênese hipocampal

No segundo experimento, os animais foram submetidos ao protocolo de consumo de etanol conforme descrito anteriormente. Ao final do período de oferta de etanol, as garrafas contendo solução aquosa de etanol foram substituídas por garrafas contendo apenas água.

Um dia após o término do protocolo de consumo de etanol, os animais receberam injeções diárias de taurina durante o período de 28 dias. Os animais dos respectivos grupos controle receberam injeção apenas do veículo.

3.3 Análise da função cardiovascular

3.3.1 Canulação da artéria e veia femoral

No 26º dia da oferta de etanol, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) para implantação de um cateter na artéria femoral para realização dos registros cardiovasculares e outro na veia femoral para infusão de fármacos. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, EUA), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) (Hepamax-S®, Blausiegel, Brasil), e obstruídos com pino de metal. Após implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocater e fixados à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexinameglumina (Banamine®, Schering-Plough, Brasil) por via subcutânea para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

3.3.2 Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca

Antes do início dos registros, 0,1 mL de solução salina com heparina (15U/mL) foi injetada no interior dos cateteres para lavagem das mesmas. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão

(Hewlett Packard, EUA) por um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil foi registrada usando um pré-amplificador (HP7754-A, Hewlett Packard, EUA) e uma placa de aquisição de dados (MP100A, Biopac systems Inc. EUA) conectado a um computador. A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivadas da pressão arterial pulsátil e processadas *on-line*.

3.3.3 Avaliação da atividade barorreflexa

A análise foi feita relacionando a variação da PAM com a variação reflexa correspondente da FC. A partir dos pontos obtidos da correlação na variação da PAM e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS foram traçadas curvas sigmóides, como descritas na literatura (CRESTANI et al., 2010). A avaliação da curva sigmóide foi feita com base em cinco parâmetros: 1- platô mínimo da frequência cardíaca (P1, BPM); 2- platô máximo da frequência cardíaca (P2, BPM); 3- variação da FC (ΔP , BPM, diferença e P2); 4- pressão arterial média (PA50, mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) E 5- ganho (G, BPM/mmHg, inclinação da porção linear da curva) (CRESTANI et al., 2010). Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de PAM e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor da pressão arterial (CRESTANI et al., 2006, 2010).

3.3.4 Estresse de restrição agudo

Para o estresse de restrição agudo, cada rato foi colocado num tubo de plástico cilíndrico opaco (diâmetro de 6,5 cm, comprimento 15 cm), ventilados por orifícios (1 cm de diâmetro) que compunham aproximadamente 20% da superfície do tubo. A sessão de estresse de restrição durou 60 minutos (CRESTANI et al., 2009), e imediatamente após o fim do estímulo aversivo os ratos foram devolvidos às suas gaiolas. Cada rato foi submetido a apenas uma sessão de restrição a fim de evitar a habituação.

3.4. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de PAM e FC foram comparados utilizando a análise de variância monofatorial (ANOVA) ou o teste t de Student. As curvas temporais de variação da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram analisadas via análise de variância bifatorial (ANOVA), sendo o tratamento como fator principal e tempo como medida repetida. Um teste t pos hoc com a correção de Bonferroni foi utilizada para identificação de diferenças entre os grupos. Os resultados dos testes estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.5. Análise da neurogênese

3.5.1 Administração do BrdU

A 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um nucleotídeo halogenado análogo a timidina, é um marcador exógeno de divisão celular. Após injetado no animal, o BrdU é incorporado ao DNA das células que estão na fase de síntese (S) do ciclo de divisão celular. As novas células que incorporaram o BrdU podem sofrer apoptose (morte celular programada) ou se diferenciar em células da glia ou neurônios após 28 dias (KUHN et al, 1996). Esta característica torna o BrdU uma importante ferramenta para o estudo da proliferação, sobrevivência celular e neurogênese hipocampal.

Para o estudo da sobrevivência celular, os animais receberam única injeção de BrdU (i.p., 200 mg/kg, no volume de 5 ml/kg) no início da oferta de etanol a 5%, desta maneira, o BrdU se incorpora na mesma quantidade de células em todos os grupos experimentais.

O BrdU (Sigma Aldrich Chemical Co.) foi dissolvido em soro fisiológico estéril (contendo 0,007 N de NaOH) na concentração de 200 mg/mL, 30 minutos antes da administração.

3.5.2 Perfusão e processamento do material biológico

Os animais foram perfundidos imediatamente após a última análise de barorreflexo. Para a perfusão, os animais foram anestesiados com injeção i.p.

de quetamina (150 mg/kg) e perfundidos transcárdiacamente com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS), 0,1M e pH 7,4, à 4°C. Os encéfalos foram removidos, pós-fixados em paraformaldeído 4% em PBS à 4°C por 24 horas, crioprotégidos em solução de sacarose 30% em PBS e crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura, coletados em 12 séries. Os cortes foram armazenados em solução anti-congelante no congelador a -20°C.

3.5.3 Técnica de Nissl

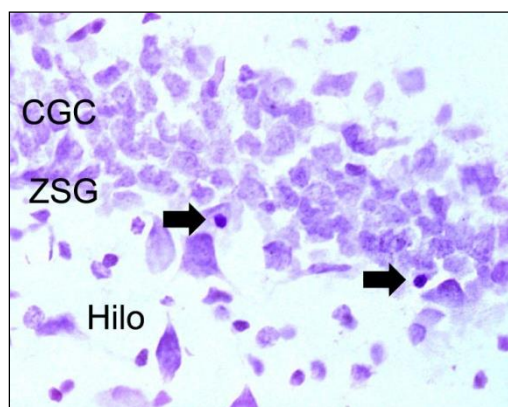
Uma série de cortes foi corada com violeta de cresila para a análise do volume e do número de células picnóticas (em processo de apoptose). Durante o processo de apoptose, a célula passa por mudanças morfológicas que incluem contração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA cromossomal. Quando estas células se encontram em um estado contraído e associado com hipercromatose, são classificadas como células picnóticas. HERRERA e colaboradores (2003) usam a análise quantitativa destas células como indicativo de apoptose e morte celular.

Primeiramente os cortes foram montados sequencialmente em lâminas especiais (Superfrostplus Gold, Fisher Scientific, EUA) e secos em estufa a 37°C durante 8 horas. As lâminas foram então coradas com violeta de cresila e montadas com lamínulas utilizando DPX (BDH, Gallard-Schlesinger Industries Inc., CarlePlace, NY, EUA) como meio de montagem.

Para a análise do volume hipocampal, as imagens foram capturadas através de câmera digital acoplada ao microscópio e analisadas pelo programa Axio Vision (Zeiss, Brasil). As áreas analisadas foram somadas, multiplicadas pela espessura do corte (40 μm) e pela distância entre os cortes para o cálculo da estimativa do volume total da estrutura, expresso em mm^3 .

Para a análise quantitativa de células picnóticas, foram consideradas células picnóticas apenas aquelas que apresentaram corpo contraído e condensação nuclear intensamente corada (Figura 15).

Figura 15: Células picnóticas no giro denteado do hipocampo.



Setas cheias – células picnóticas. ZSG – zona subgranular; CGC – camada granular celular. Aumento: 400x.

Os resultados da quantificação correspondem à média da somatória dos resultados encontrados em cada um dos múltiplos cortes de um animal. Para a análise estatística, foi utilizada ANOVA e o teste de múltipla comparação Bonferonni. O valor estatístico $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.5.4 Ki-67, BrdU e DCX – Imunohistoquímica

O Ki-67 é um marcador endógeno cujo antígeno está presente exclusivamente na estrutura nuclear de células em proliferação, nas fases G1, S e G2 do ciclo e na mitose. Células quiescentes ou na fase G0 do ciclo não apresentam o antígeno Ki-67 (GERDES et al, 1984). Apesar de ter a vantagem de ser um marcador endógeno, o Ki-67 só pode ser usado para a análise da proliferação celular, assim para o estudo da sobrevivência celular, deve-se usar o marcador exógeno BrdU.

Já o DCX (Doublecortin) é uma proteína associada a microtúbulos expressa em células precursoras neurais e neurônios imaturos em estruturas corticais. As células precursoras começam a expressar ativamente o DCX durante a divisão celular e suas células-filhas continuam a expressá-la por 2-3 semanas, até se tornarem neurônios maduros (BROWN et al, 2003).

Para o processamento do material com técnicas de imunohistoquímica contra Ki-67 (proliferação celular), BrdU (sobrevivência celular) e DCX (neurogênese e maturação celular), inicialmente os cortes foram montados sequencialmente em lâminas especiais (Superfrost plus Gold, Fisher Scientific, EUA) e secos em estufa a 37°C durante 8 horas.

Para desmascarar o antígeno, as lâminas foram fervidas em ácido cítrico (0,01 M, pH 6,0) por 6 minutos e resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, os cortes foram rapidamente mergulhados em água destilada e em seguida lavados em PBS. Nesta etapa, as lâminas processadas contra Ki-67 e DCX foram incubadas em anticorpo primário. As lâminas foram incubadas em anticorpo primário contra Ki-67 (feito em camundongo, 1:200,

Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, Reino Unido) em PBS contendo 0,5% de Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 48 horas à 4°C; ou em anticorpo primário contra DCX (feito em coelho, 1:500, ABCam, Cambridge, MA, EUA) em PBS contendo 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 48 horas à 4°C.

Já as lâminas processadas contra o BrdU passaram pelas etapas adicionais descritas a seguir. O tecido foi digerido em solução de tripsina (0,1% em tampão tris 0,1 M, pH 7,5, contendo 0,1% de CaCl₂) por 8 minutos. Após novas lavagem em PBS, os cortes foram denaturados em solução ácida (HCl 2,4N em PBS) durante 30 minutos. Após novas lavagens os cortes foram incubados em anticorpo primário contra BrdU (feito em camundongo, 1:200, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, Reino Unido) em PBS contendo 0,5% de Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 48 horas à 4°C.

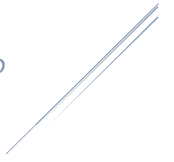
Após este período, os cortes processados contra Ki-67 e BrdU foram novamente lavados em PBS e incubados no anticorpo secundário biotilado (cavalo contra camundongo, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS durante 120 minutos em temperatura ambiente. Os cortes processados contra DCX foram incubados no anticorpo secundário biotilado (cabra contra coelho, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) pelo mesmo período de tempo.

Depois de novas lavagens em PBS, todos os cortes foram incubados no complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 90 minutos em temperatura ambiente. Após novas lavagens em PBS, os cortes foram reagidos utilizando o 3,3-

diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como cromógeno.

A reação foi interrompida com novas lavagens em PBS. As lâminas foram contra-coradas com violeta de cresila e montadas com lamínulas utilizando DPX (BDH, Gallard-Schlesinger Industries Inc., Carle Place, NY, EUA) como meio de montagem.

A análise quantitativa dos neurônios imunorreativos a Ki-67, BrdU e DCX foi feita de forma cega em microscopia de luz, considerando apenas as células com os limites bem estabelecidos e marcação evidente. A análise foi realizada bilateralmente em todos os cortes em toda a extensão do giro denteado do hipocampo. Os resultados da quantificação correspondem à média da somatória de neurônios encontrados em cada um dos múltiplos cortes de um animal. Para a análise estatística, foi utilizada ANOVA e o teste de múltipla comparação Bonferonni. O valor estatístico $p < 0,05$ foi considerado significativo.



Resultados e Discussão

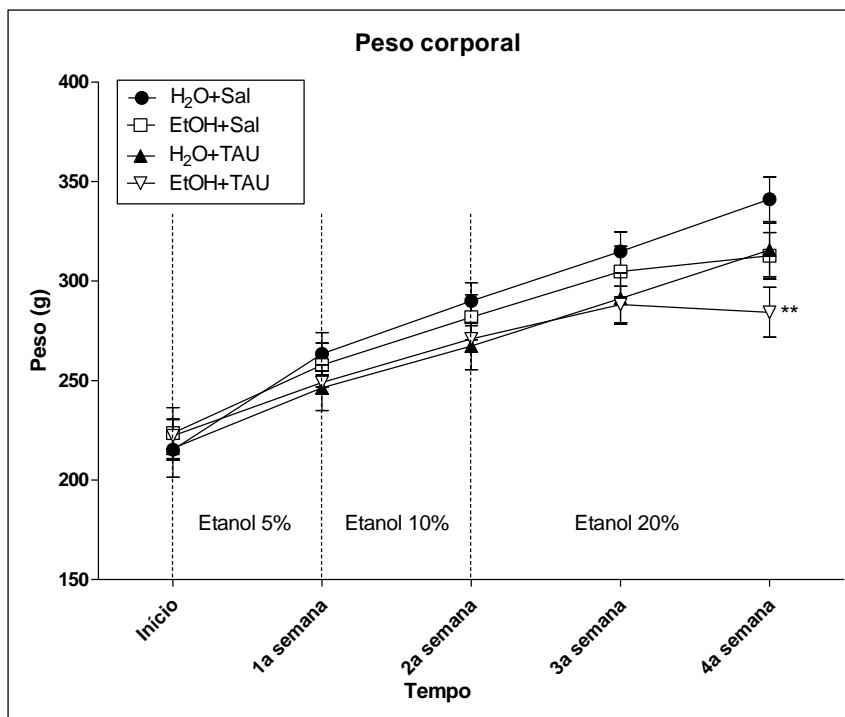
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1 - Análise do papel protetor da taurina no sistema cardiovascular e na neurogênese hipocampal contra os efeitos do consumo de etanol

4.1.1 Peso corporal

O acompanhamento do peso corporal dos animais realizado semanalmente mostrou aumento de peso constante e sem diferenças significantes entre os grupos até a 3ª semana do período experimental. Apenas na última semana foi observada significativa redução do peso corporal dos animais do grupo EtOH+TAU (16,7%) quando comparados com os animais do grupo H₂O+Sal (Figura 16 e Tabela 2). Os animais do grupo EtOH+Sal e EtOH+TAU receberam doses escalonadas de etanol, 5% na primeira semana, 10% na segunda e 20% nas duas últimas semanas.

Figura 16: Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.



Valores correspondem à média ±EP.

* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal

Análise estatística: Two-way Anova e teste de múltiplas comparações Bonferonni.

Tabela 2 - Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Início	215,3±5,2	223,6±12,8	216,0±14,6	222,2±8,2
1ª semana	263,4±10,6	257,8±11,0	246,4±11,5	249,0±5,8
2ª semana	290,0±9,2	281,8±11,3	267,3±11,9	270,9±6,7
3ª semana	314,9±9,8	304,8±12,7	291,2±12,8	288,2±9,2
4ª semana	341,1±11,2	312,7±11,7	315,6±13,4	284,3±12,6**

Valores correspondem à média ±EP.

* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal

Análise estatística: Two-way Anova e teste de múltiplas comparações Bonferonni.

Relatos da literatura mostram que a oferta de diferentes concentrações de etanol, variando de 5%, 20% e 40%, promoveram significativa diminuição do ganho de peso corporal de ratos quando comparados com seus respectivos controles (LARUE-ACHAGIOTIS et al., 1990; MACIEIRA et al., 1997).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a diminuição do peso foi significativa na última semana, com o grupo EtOH+TAU em comparação ao grupo controle. Os dados mostram que não houve aumento de peso entre a 3ª e 4ª semana.

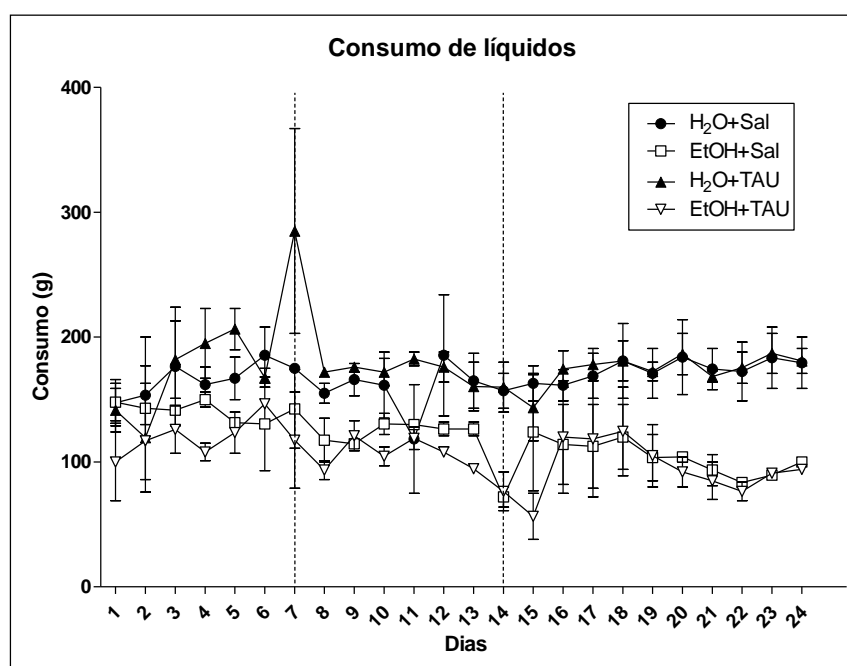
A ação da taurina que pode estar relacionada ao menor ganho de peso dos animais do grupo EtOH+TAU é sua ação no metabolismo de lipídios (CHEN et al., 2016). Estudos sugerem que a suplementação de taurina pode prevenir obesidade aumentando o gasto energético através de diversos mecanismos, como aumento da expressão de fatores envolvidos na oxidação de ácidos graxos, como a adiponectina (NARDELLI et al., 2011); e redução da lipogênese através da redução da oxidação pós-prandial da glicose (HARADA et al., 2004). Estes estudos mostraram que a suplementação da taurina diminuiu o peso corporal, mas sem modificar a quantidade de alimento ingerida pelos animais (CHEN et al., 2016).

ZHANG e colaboradores (2004) realizaram estudo duplo-cego randomizado utilizando voluntários com índice de massa corporal normal e sem sinais de diabetes. O grupo que recebeu suplementação de 3 g diárias de taurina durante sete semanas apresentou valores significativamente menores no peso corporal, triglicérides e índice aterogênico quando comparados ao grupo placebo.

4.1.2 Consumo de líquidos

O consumo de líquidos, água ou etanol, nos diferentes grupos experimentais foi avaliado diariamente durante o todo o período experimental (Figura 17).

Figura 17: Consumo de líquidos dos diferentes grupos experimentais ao longo do período experimental.



Os resultados mostraram tendência dos animais submetidos ao consumo forçado de etanol (grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU) de ingerir menor quantidade de EtOH em comparação aos animais mantidos com água *ad libitum* (grupos H₂O+Sal e H₂O +TAU). Esta tendência se acentuou mais nas duas últimas semanas de tratamento, quando os animais receberam solução com 20% de etanol.

A figura 18 mostra o consumo de etanol nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU durante o período experimental. Os resultados não mostraram diferenças significantes no consumo de etanol nos dois grupos experimentais.

O consumo total de líquidos durante o período experimental mostrou que os animais ingeriram menor quantidade de EtOH quando comparados com a água. Em reação o grupo que recebeu TAU, grupos que receberam etanol ingeriram menor quantidade de líquidos que os animais que receberam apenas água (Figura 19).

Figura 18: Consumo de etanol nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU durante o período experimental.

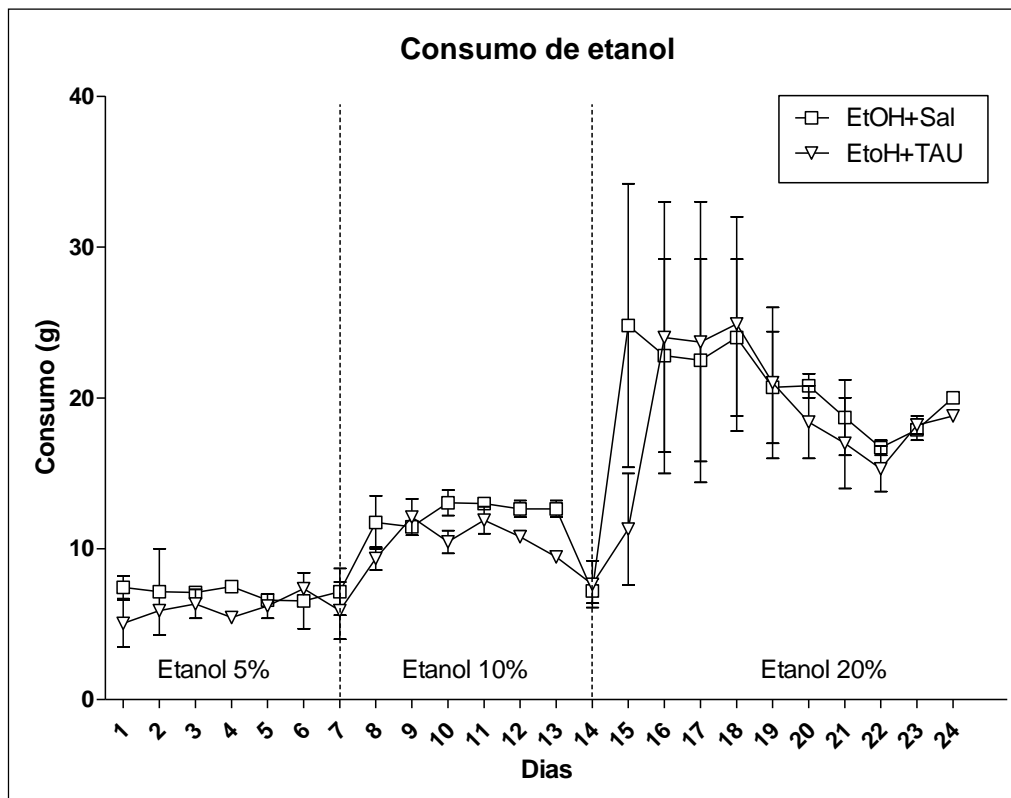
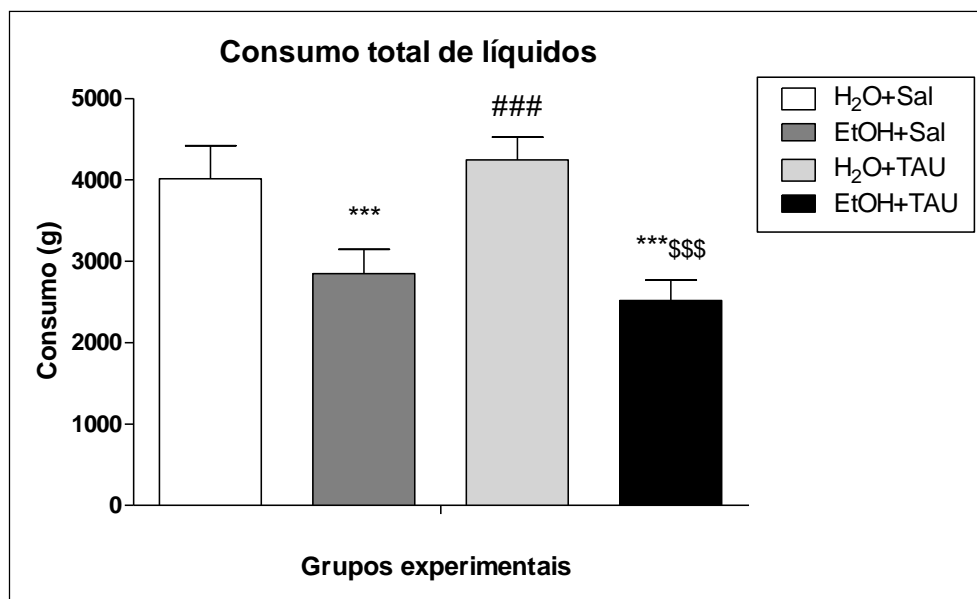


Figura 19 - Consumo total de líquidos dos diferentes grupos durante o período experimental.



*** p<0,001 vs. H₂O+Sal

p<0,001 vs. EtOH+Sal

\$\$\$ p<0,001 vs. EtOH+TAU

O grupo EtOH+Sal e EtOH+TAU consumiram quantidade significativamente menor de líquidos quando comparados aos grupos H₂O+Sal (29,0% e 37,3%, respectivamente) e H₂O+TAU (32,9% e 40,7%, respectivamente). Assim, os animais ingeriram menor quantidade de EtOH quando comparados com a água. A taurina promoveu diminuição significativa no consumo de EtOH, mas não alterou o consumo de água.

No grupo de animais que consumiram etanol 20%, houve 30% de mortalidade ao longo do período experimental. Estudos recentes demonstraram que a interação do etanol com altas concentrações de taurina pode causar intoxicação letal em camundongos neonatos, adultos e idosos (TARANUKHIN et al., 2013; 2015a; 2015b). Este estudo mostrou 100% de letalidade com as seguintes doses de taurina e etanol: camundongos neonatos (7 dias de idade),

6 g/kg de taurina e 5 g/kg de etanol; camundongos adultos (5-6 meses de idade), 10 g/kg de taurina e 8 g/kg de etanol; e ratos idosos (12-13 meses de idade), 6 g/kg de taurina e 6 g/kg de etanol. As mesmas doses de taurina e de etanol administradas isoladamente não causaram mortes nos camundongos (TARANUKHIN et al., 2015a; 2015b). Exames de sangue mostraram dramática diminuição da glicemia sanguínea em 25–40% dos animais após a administração de etanol e taurina. Estes dados sugerem que além da hipoglicemia, outros mecanismos podem estar envolvidos na intoxicação letal causada pelo etanol e taurina em camundongos.

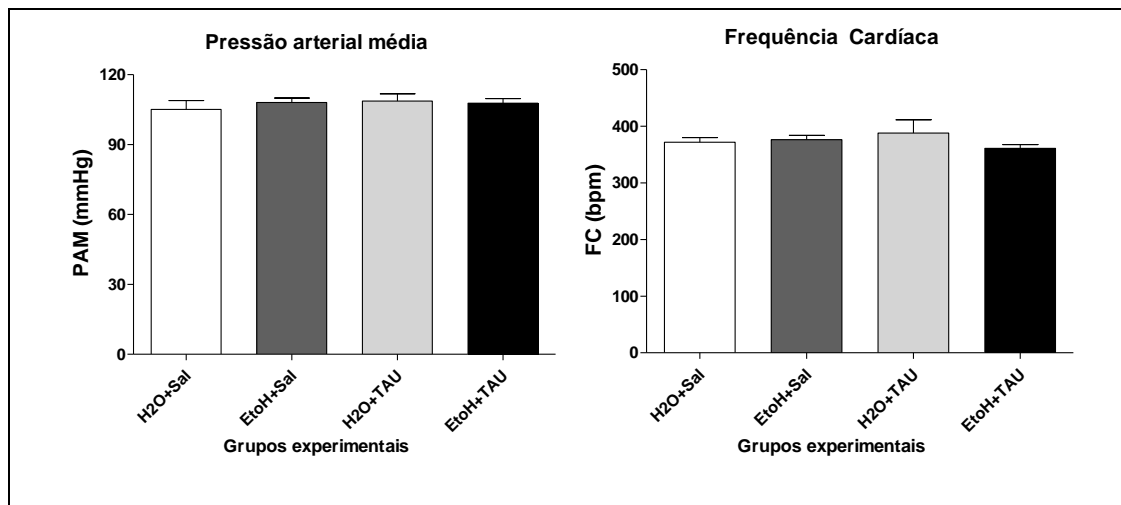
4.3 Função cardiovascular

Estudo utilizando o mesmo protocolo de consumo de etanol demonstrou a cascata de eventos neuroendócrinos induzidos pelo consumo de etanol e estabeleceu uma possível relação entre a desidratação causada pelo etanol e o aumento da pressão arterial (DA SILVA et al., 2013). Assim, os experimentos foram realizados com o intuito de observar a influência da taurina nesse distúrbio.

4.3.1 Valores basais de pressão arterial média e frequência cardíaca

A pressão arterial basal e frequência cardíaca basal foram aferidas (Figura 20). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes nos grupos experimentais.

Figura 20: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca média (FC) basais nos diferentes grupos experimentais.

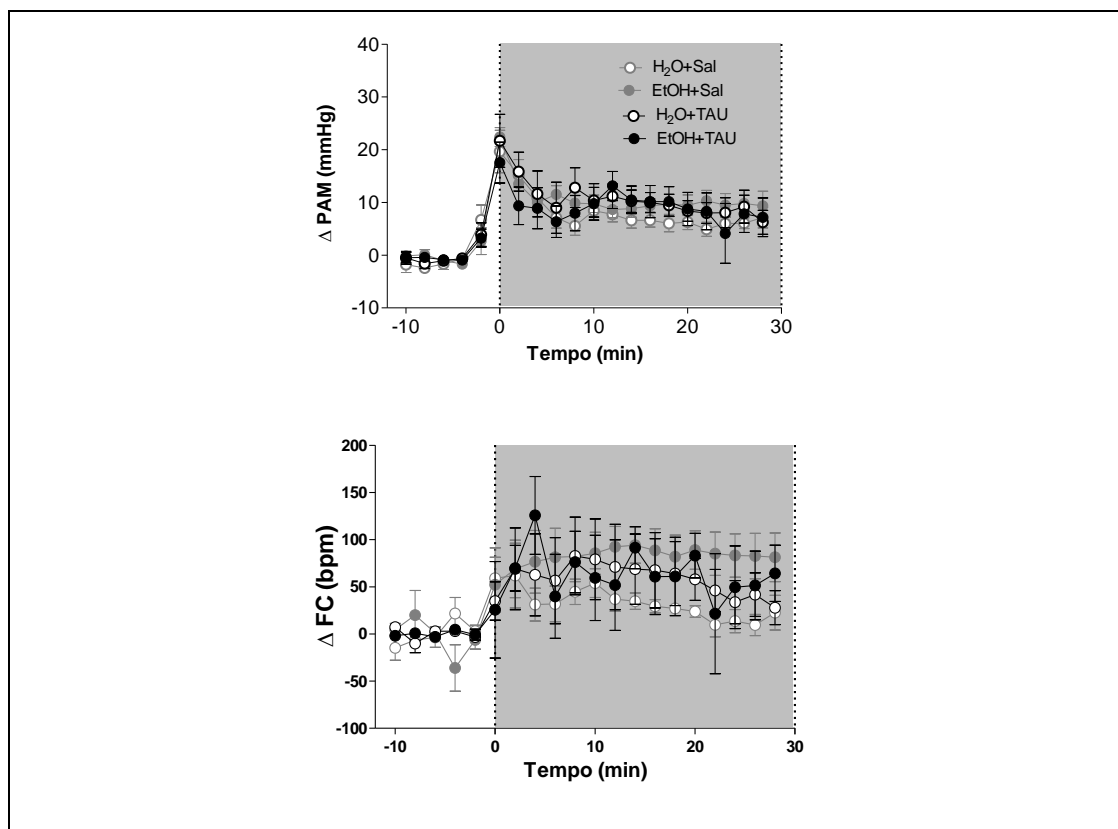


4.3.2 Respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo

Quando os animais (H2O+Sal) foram expostos ao estresse de restrição, promoveu aumento da PAM ($F_{(19,440)} = 19,34$; $P < 0,001$) e FC ($F_{(19,440)} = 4,31$; $P < 0,001$). Porém, este efeito não foi observado nos animais que consumiram etanol (salina) ou etanol (+ taurina) e nem no grupo água +taurina, sugerindo que a taurina não promoveu alteração cardiovascular.

A variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca média (Δ FC) induzida pelo estresse de restrição agudo (Figura 21) também não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais.

Figura 21: Variação da Pressão Arterial Média (Δ PAM) e Frequência Cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo nos diferentes grupos experimentais.



Apesar de diversos estudos mostrarem que o protocolo de consumo de etanol utilizado promovem efetivas alterações no sistema cardiovascular (RESSTEL et al., 2006; DA SILVA et al., 2013; CRESTANI et al., 2014), os resultados observados no presente trabalho não evidenciaram mudanças na pressão arterial, frequência cardíaca e mudanças na atividade barorreflexa nos animais.

Este fato pode ser explicado baseando-se nos trabalhos de DA SILVA e colaboradores (2013) que estabeleceram uma possível relação entre a desidratação causada pelo etanol e o aumento da pressão arterial. Desta maneira, acreditamos que, apesar do menor consumo de líquidos observado nos animais submetidos ao consumo de etanol, as injeções diárias de taurina ou de

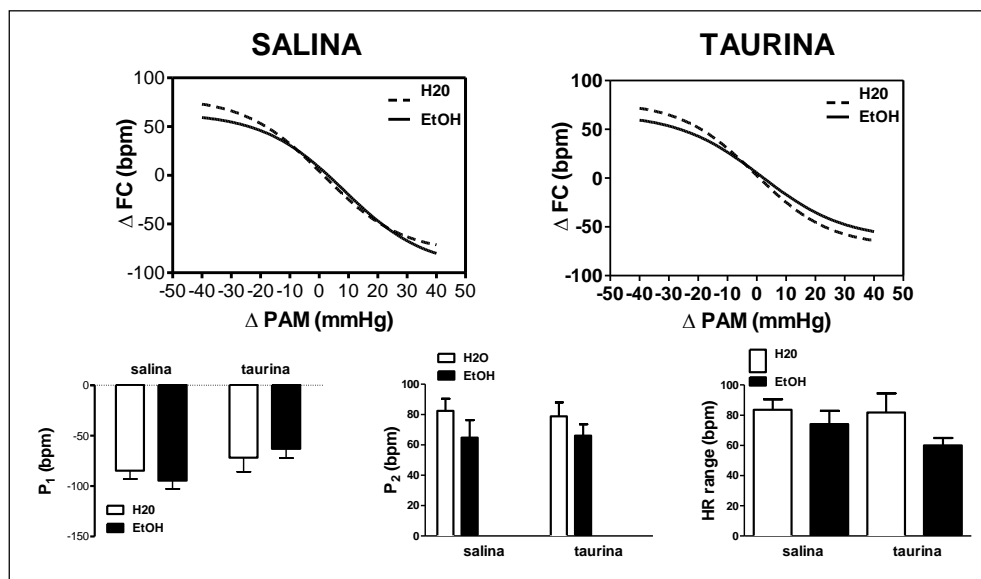
solução salina (1 mL) reidrataram os animais e preveniram a precipitação do quadro hipertensivo. Esta hipótese é suportada por dados de ENGI et al. (2016), que não observaram alterações na pressão arterial de animais tratados com solução de etanol 20%, mas também tiveram livre acesso a garrafa com água.

Um único trabalho foi encontrado na literatura, envolvendo consumo de etanol, hipertensão e taurina. HARADA e colaboradores (2000), realizaram dois experimentos, sendo que no primeiro experimento, um grupo de animais receberam etanol 15% e outro etanol 15% acrescido de taurina 1% na água de beber, durante 4 semanas. No segundo experimento, um grupo de animais recebeu taurina 1% e outro grupo etanol 5% acrescido de taurina 1% por 8 semanas. Os resultados demonstraram que o grupo que recebeu etanol apenas, promoveu aumento significativo de pressão arterial e após a quarta semana, a pressão artéria média foi de 104.9 ± 1.6 , 132.6 ± 47 e 105.7 ± 4.2 mmHg para o grupo controle, grupo etanol e grupo etanol + taurina, respectivamente (experimentos sem livre escolha).

4.3.3 Estimulação barorreflexa

Os resultados da avaliação da atividade barorreflexa (Figura 22) mostraram que a taurina reduziu a resposta bradicárdica nos animais com tratamento crônico do etanol ($F_{(1,29)}=4,2$; $P<0,05$), sem alterar o componente taquicárdico ($F_{(1,29)}=0,02$; $P>0,05$). Já nos demais grupos não houve diferenças estatísticas.

Figura 22: Análise de regressão não-linear do barorreflexo correlacionando Pressão Arterial Média (Δ PAM) e Frequência Cardíaca (Δ FC).



O presente trabalho mostrou que a dose de taurina utilizada é segura com relação às funções cardiovasculares. Os animais que receberam administração de taurina não apresentaram alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e atividade barorreflexa que possam sugerir efeito cardiotoxíco deste composto. Estes resultados são corroborados pelos estudos dos efeitos da taurina em diversos modelos de hipertensão que também não mostraram alterações da função cardiovascular em animais controle que receberam taurina (MAIA et al., 2014; LV et al., 2015).

Este composto vem ganhando espaço como um potencial agente na terapia de patologias cardiovasculares, prevenindo arteriosclerose, AVEs e hipertensão (YAMORI et al., 2010; ITO, SCHAFFER, AZUMA, 2014; MAIA et al., 2014).

Em humanos, a taurina mostrou efeito anti-hipertensivo em pacientes jovens pré-hipertensivos em um estudo duplo-cego com grupo placebo e grupo experimental (FUJITA et al., 1987). Interessantemente, pacientes com

hipertensão idiopática apresentaram deficiência em taurina (KOHASHI; KATORI, 1983) e a suplementação com este composto promoveu efeito anti-hipertensivo nestes pacientes (YAMORI et al., 1996).

A suplementação de taurina atenuou o aumento da pressão sistólica, diastólica e média em ratos com quadro de hipertensivo induzido pela restrição proteica crônica (MAIA et al, 2014). O estudo ainda mostrou ação antioxidante da taurina na prevenção da disfunção endotelial relacionada com estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram observados por SCABORA et al. (2015), que induziram hipertensão em camundongos através da restrição proteica gestacional.

Estudos demonstram que o composto preveniu o desenvolvimento de quadro hipertensivo em modelos animais (FUJITA; SATO, 1986; HARADA et al., 2000) e diminuiu a pressão arterial em casos de hipertensão arterial idiopática (YAMORI et al., 1996; SUWANICH et al., 2013).

HARADA et al. (2000) mostraram que a suplementação de taurina preveniu o desenvolvimento da hipertensão induzida pelo etanol. O estudo sugere que o efeito anti-hipertensivo da taurina está relacionado a diminuição da concentração de acetaldeído plasmático.

O acetaldeído é o produto metabólico primário do etanol na sua rota de conversão a ácido acético, por ser altamente reativo, pode se ligar a diversas proteínas plasmáticas e outros componentes biológicos, podendo causar os efeitos adversos da intoxicação alcoólica (SORRELL; TUMA, 1987). A taurina ativa a enzima aldeído desidrogenase, responsável pela degradação do acetaldeído (WATANABE et al., 1986; WU et al., 2013; HSIEH et al., 2014)

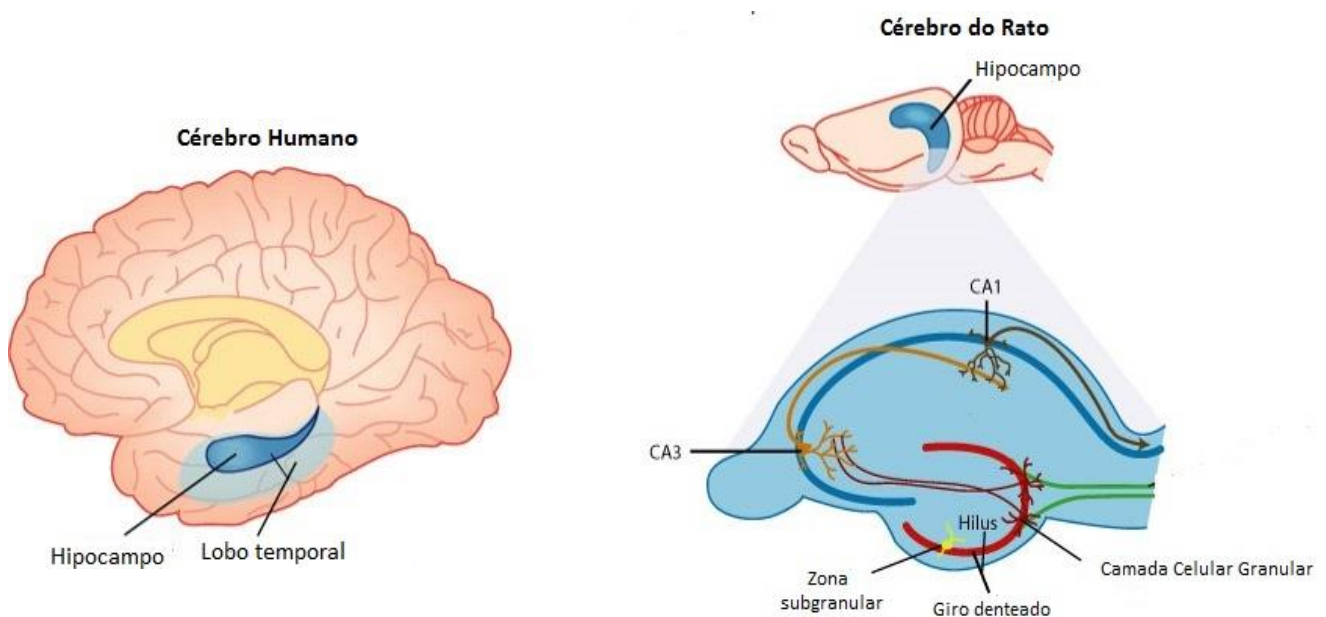
diminuindo os níveis deste composto após a exposição ao etanol (WATANABE et al., 1985; HARADA et al., 2000).

Diante dos dados apresentados, novos experimentos são necessários para a avaliação dos efeitos da administração da taurina na hipertensão induzida pelo consumo crônico de etanol. Outras vias de administração do composto devem ser exploradas para que o etanol provoque quadro hipertensivo nos animais, como a gavagem gástrica ou a sua diluição na solução de etanol.

4.4 Neurogênese

No intuito de facilitar a visualização dos tecidos estudados, a figura 23 mostra o hipocampo e suas estruturas e funções:

Figura 23: Hipocampo e suas estruturas no cérebro humano e de rato (adaptado de BIZON et al, 2005).



4.1.4.1 Análise volumétrica

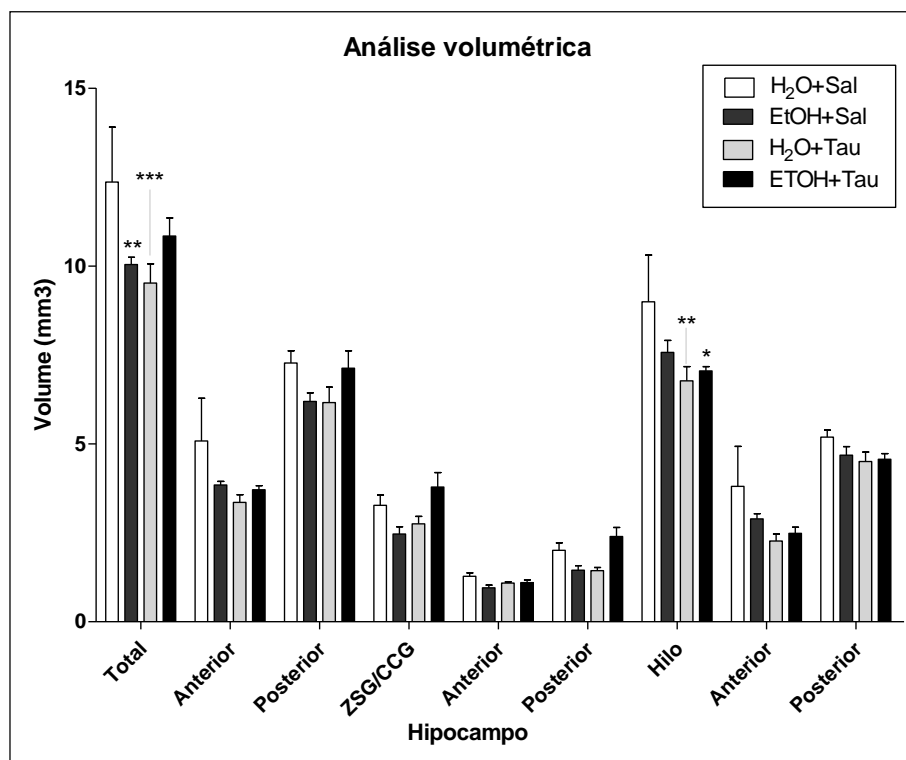
A análise volumétrica mostrou significativa redução no volume hipocampal de todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo H₂O+Sal (Tabela 3 e Figura 24). O grupo EtOH+Sal apresentou diminuição no volume no giro denteado como um todo (18,8%), o grupo H₂O+TAU apresentou diminuição no volume no giro denteado como um todo (23,0%) e no hilo (24,7%); e o grupo EtOH+TAU apresentou diminuição no volume apenas no hilo (6,9%).

Tabela 3 - Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.

Volume (mm ³)	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	12,36226±1,53917	10,04155±0,20212 **	9,52152±0,53921 ***	10,84123±0,51103
Anterior	5,08508±1,19848	3,84620±0,10077	3,35689±0,21497	3,71245±0,11551
Posterior	7,27718±0,34074	6,19536±0,24083	6,16464±0,43300	7,12878±0,48910
CCG/ZSG	3,27341±0,29104	2,46813±0,20353	2,75107±0,21078	3,78732±0,40809
Anterior	1,28045±0,09668	0,95367±0,07898	1,08909±0,03094	1,10152±0,07934
Posterior	2,00947±0,20732	1,44919±0,12654	1,43784±0,08977	2,39427±0,25436
Hilo	8,99334±1,31628	7,57343±0,33789	6,77045±0,40031 *	7,05391±0,12157 *
Anterior	3,80463±1,12453	2,89252±0,14875	2,26780±0,19631	2,48492±0,17100
Posterior	5,18870±0,19987	4,68090±0,24565	4,50266±0,27223	4,56899±0,16133

Valores correspondem à média ±EP.
 * p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal
 # p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vs EtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal
 Análise estatística: Two-way Anova e teste de múltiplas comparações Bonferonni.

Figura 24: Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.



* p < 0,05 vs. H₂O+Sal, ** p < 0,01 vs. H₂O+Sal, *** p < 0,001 vs. H₂O+Sal

Neuroimagens de pacientes alcóolicos demonstraram significativa diminuição no volume cerebral, especialmente no hipocampo (JERNIGAN et al., 1991; LAAKSO et al., 2000; SULLIVAN; MARSH, 2003). Estudos em modelos animais também mostraram significativa redução do volume hipocampal após exposição ao etanol (RILEY E WALKER, 1978; MIKI et al., 2000).

A interação da taurina com etanol no SNC tem mostrado resultados conflitantes. Estudos comportamentais mostraram que o pré-tratamento com taurina reduziu a duração do sono induzido pelo etanol e atenuou a perda de reflexo postural (IIDA; HIKICHI, 1976; BOGGAN et al., 1978). Entretanto, outros estudos mostraram que a taurina não promoveu melhoras no reflexo postural

(GINSBURG; LAMB, 2008) e até mesmo piorou os déficits causados pelo etanol (FERKO, 1987).

4.4.2 Proliferação celular – Ki-67

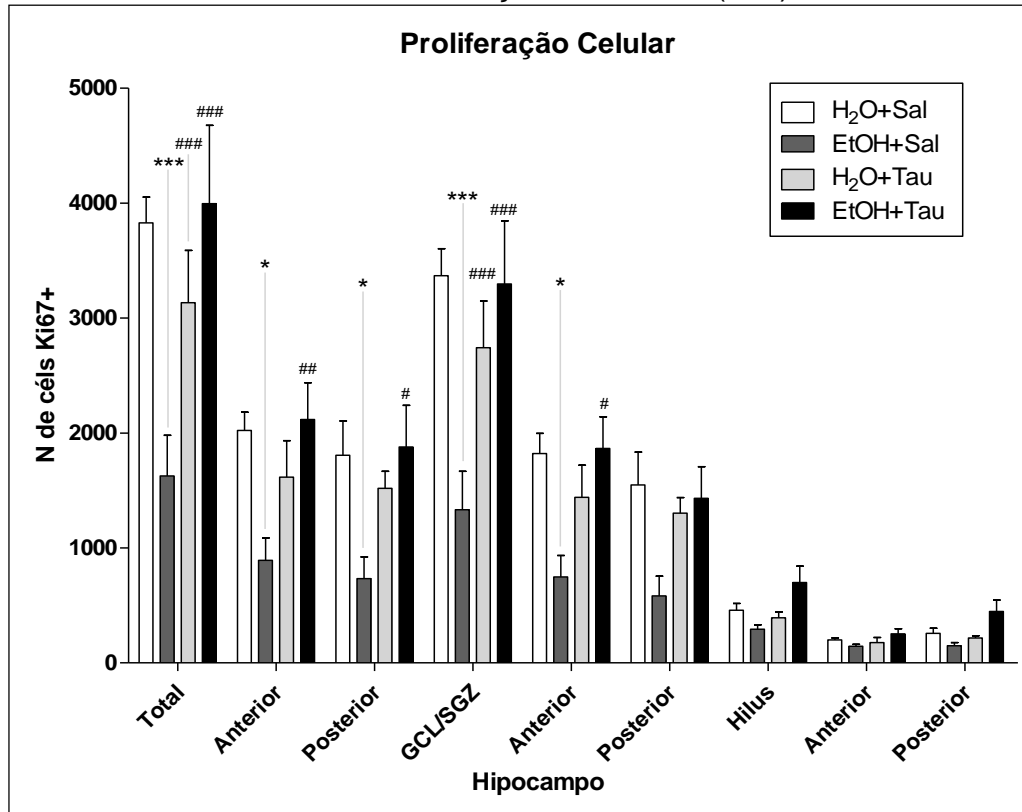
A análise da proliferação celular no giro denteado mostrou que a administração de taurina promoveu significativa neuroproteção contra os efeitos do etanol (Tabela 4 e Figura 25).

Tabela 4 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	3828±224	1626±354***	3135±453###	3996±681###
Anterior	2022±160	892±194*	1617±317	2118±319##
Posterior	1806±300	734±188*	1518±148	1878±364#
CCG/ZSG	3369±234	1332±335***	2742±407###	3297±549###
Anterior	1821±176	748±187*	1440±280	1866±275#
Posterior	1548±286	584±171	1302±136	1431±275
Hilo	459±59	294±37	393±50	699±142
Anterior	201±17	144±18	177±45	252±45
Posterior	258±44	150±27	216±21	447±100

Valores correspondem à média ±EP.
 * p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal
 # p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vsEtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal
 Análise estatística: *Two-way* Anova e teste de múltiplas comparações Bomferonni.

Figura 25: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

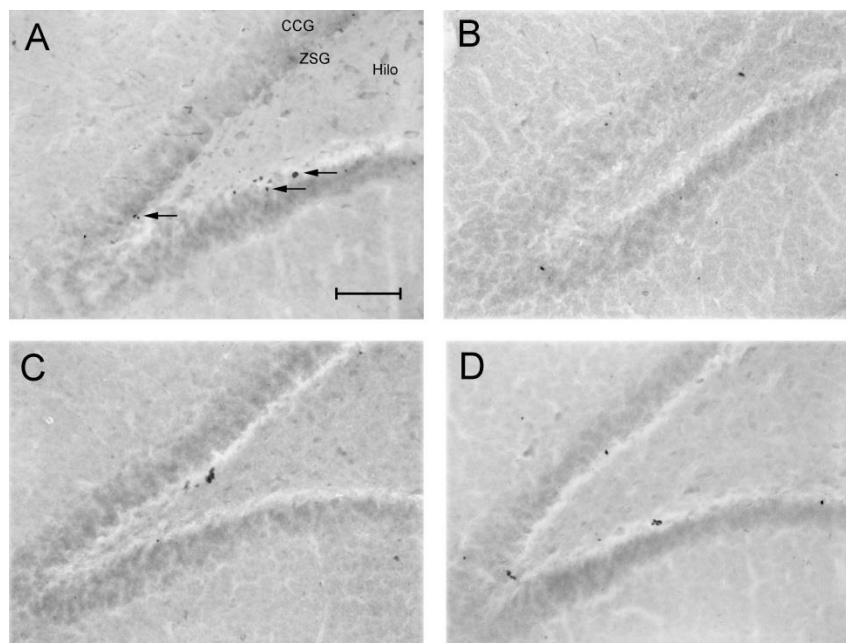


* $p < 0,05$ vs. H₂O+Sal, ** $p < 0,01$ vs. H₂O+Sal, *** $p < 0,001$ vs. H₂O+Sal
 # $p < 0,05$ vs. EtOH+Sal, ## $p < 0,01$ vs. EtOH+Sal, ### $p < 0,001$ vs. EtOH+Sal

O grupo EtOH+Sal apresentou o menor número de células imunopositivas ao Ki-67 dentre os grupos experimentais. O EtOH promoveu significativa diminuição da proliferação celular no giro denteado como um todo (57,5%), em sua porção anterior e posterior (55,9% e 59,4%, respectivamente) e na camada celular granular (CCG) (60,5%). Promoveu, quando comparado à H₂O, redução significativa na proliferação celular no giro denteado como um todo (57,5%), em sua porção anterior e posterior (55,9% e 59,4%, respectivamente) e na CCG (60,5%).

Porém, a taurina promoveu significativa neuroproteção contra os efeitos do etanol na proliferação celular no giro denteado do hipocampo, sendo esta, superior aos níveis controle. Os resultados (EtOH+ TAU) apresentaram significativo aumento no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado como um todo (145,8%), em sua porção anterior e posterior (137,4% e 155,9%, respectivamente); e na CCG (147,5%) e em sua porção anterior (149,5%). A figura 26 mostra o padrão de marcação das células imunorreativas ao Ki-67 nos diferentes grupos experimentais.

Figura 26 - Padrão de marcação das células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado do hipocampo nos diferentes grupos experimentais.



A - grupo H₂O+Sal, B - grupo EtOH+Sal, C - grupo H₂O+TAU, D - Grupo EtOH+TAU. CCG – Camada Celular Granular, ZSG – Zona Subgranular. Barra de calibração: 50µm.

A significativa redução no número de células imunorreativas ao Ki-67 observada nos animais tratados com etanol apenas é corroborada por estudos da literatura que descrevem significativo efeito inibitório do etanol sobre a

proliferação celular no hipocampo (JANG et al., 2002; NIXON; CREWS, 2002; HE et al., 2005; MORRIS et al., 2010).

No entanto, os efeitos do consumo crônico de etanol sobre a proliferação celular ainda mostram resultados conflitantes. Outras pesquisas não observaram diferenças estatisticamente significantes após 10 dias (RICE et al., 2004) ou 6 semanas (HERRERA et al., 2003) de administração crônica de etanol, sugerindo que o organismo dos animais adquiriu tolerância aos seus efeitos inibitórios.

4.4.3 Sobrevivência celular – BrdU

A análise da sobrevivência celular no giro denteado mostrou que a administração de taurina promoveu significativa neuroproteção contra os efeitos do etanol (Tabela 5 e Figura 27). A figura 28 mostra o padrão de marcação das células imunorreativas ao BrdU nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao BrdU no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	4686±330	3363±241***	4569±197 ###	5180± 397 ###
Anterior	2046±114	1629±174	2046±139	2292±280
Posterior	2640±216	1734±235 *	2523±120 ##	2888±117 ###
CCG/ZSG	3342±342	2439±190 *	3165±83 ##	3876±411 ###\$
Anterior	1548±96	1242±132	1497±75	1780±292
Posterior	1794±246	1197±164	1668±109	2096±122 ##
Hilo	1344±12	924±141	1404±130	1304±26
Anterior	498±18	387±68	549±81	520±29
Posterior	846±30	537±108	855±59	784±4

Valores correspondem à média ±EP.

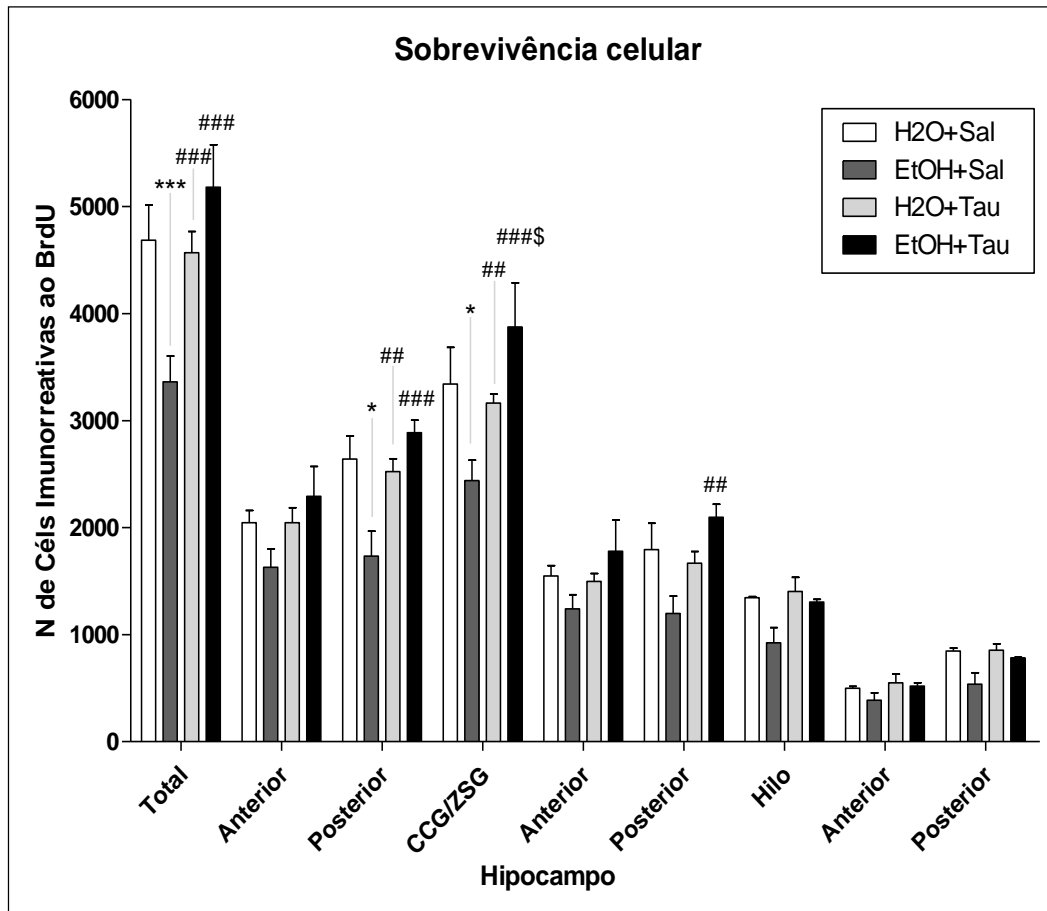
* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal

p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vsEtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal

\$ p<0,05 vs. EtOH+TAU, \$\$ p<0,01 vsEtOH+TAU, \$\$\$ p<0,001 vs. EtOH+TAU

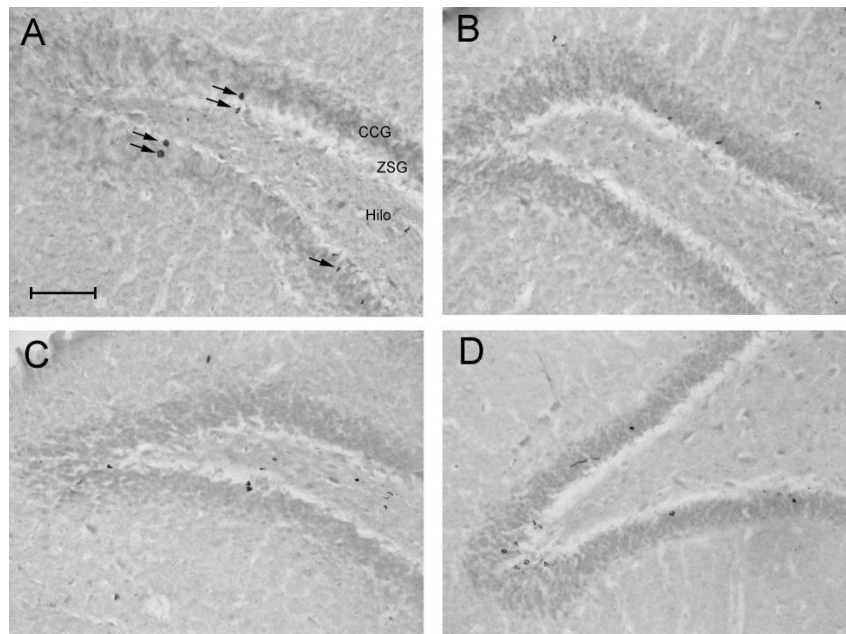
Análise estatística: *Two-way* Anova e teste de múltiplas comparações Bomferonni.

Figura 27: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao BrdU no giro dentado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).



* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal
 # p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vs EtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal
 \$ p<0,05 vs. EtOH+TAU, \$\$ p<0,01 vs EtOH+TAU, \$\$\$ p<0,001 vs. EtOH+TAU

Figura 28: Padrão de marcação das células imunorreativas ao BrdU nos diferentes grupos experimentais. As setas indicam células imunorreativas ao BrdU.



A - grupo H₂O+Sal, B - grupo EtOH+Sal, C - grupo H₂O+TAU, D - Grupo EtOH+TAU. CCG – Camada Celular Granular, ZSG – Zona Subgranular. Barra de calibração: 50µm.

O grupo EtOH+Sal apresentou o menor número de células imunopositivas ao BrdU dentre os grupos experimentais.

O etanol apresentou redução significativa na sobrevivência celular no giro denteado como um todo (28,2%), em sua porção posterior (34,3%) e na CCG (27,0%), enquanto a taurina promoveu aumento da sobrevivência celular no giro denteado como um todo (26,4%), em sua porção posterior (31,3%) e na CCG (22,9%), ambos quando comparados ao controle (H₂O + sal).

Os resultados mostraram que taurina promoveu proteção contra o efeito deletério do etanol. Observou-se aumento significativo de células imunopositivas ao BrdU no EtOH+TAU em comparação com EtOH + Sal, giro denteado como um todo (54,0%), em sua porção posterior (66,6%), na CCG (58,9%) e em sua

porção posterior (75,1%), valores acima aos observados com o grupo controle (H₂O+sal), mas não significativos. Porém, quando comparado ao grupo H₂O+TAU, foi significativamente maior na CCG (22,5%).

4.4.4 Neurogênese – DCX

A análise da neurogênese no giro denteado mostrou que a administração de etanol e/ou taurina promoveu alterações significativas na neurogênese hipocampal (Tabela 6 e Figura 29). A figura 30 mostra o padrão de marcação das células imunorreativas ao DCX nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU.

Tabela 6: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	679±56	411±43 ***	546±7 *	580±119 ###
Anterior	267±55	209±56	321±27	260±59
Posterior	412±3	202±15 **	225±21	321±90 #

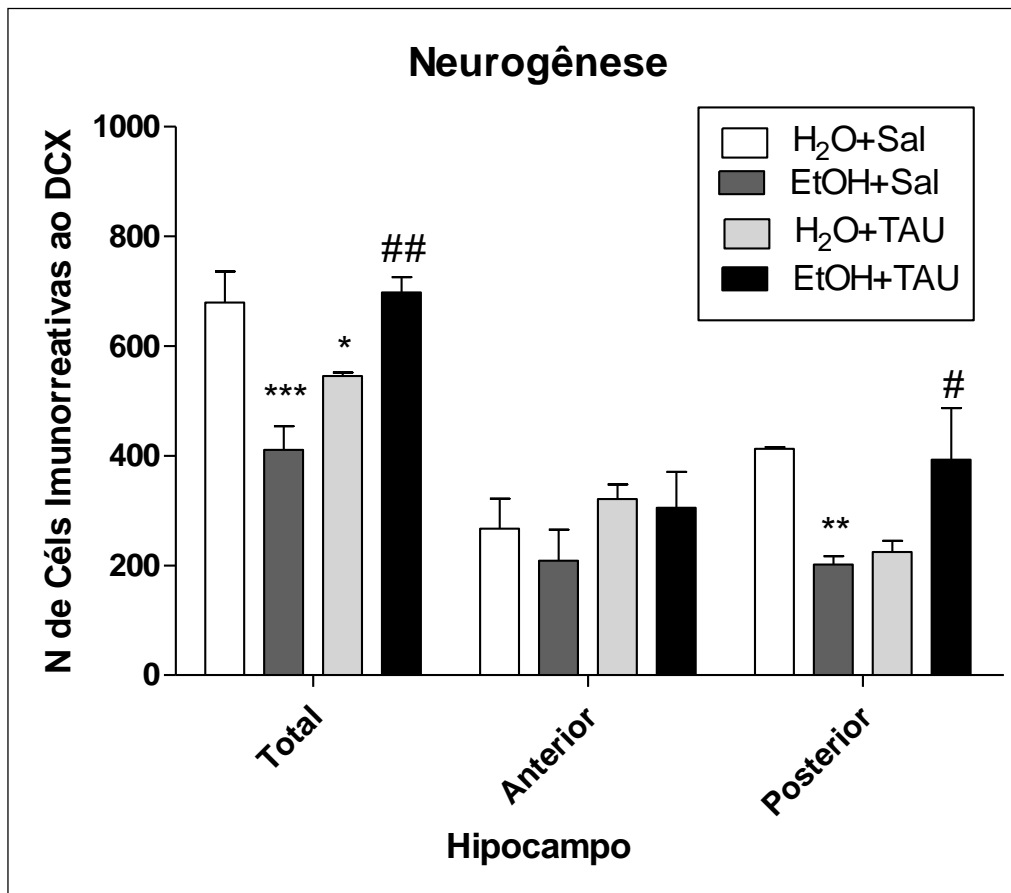
Valores correspondem à média ±EP.

* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal

p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vs EtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal

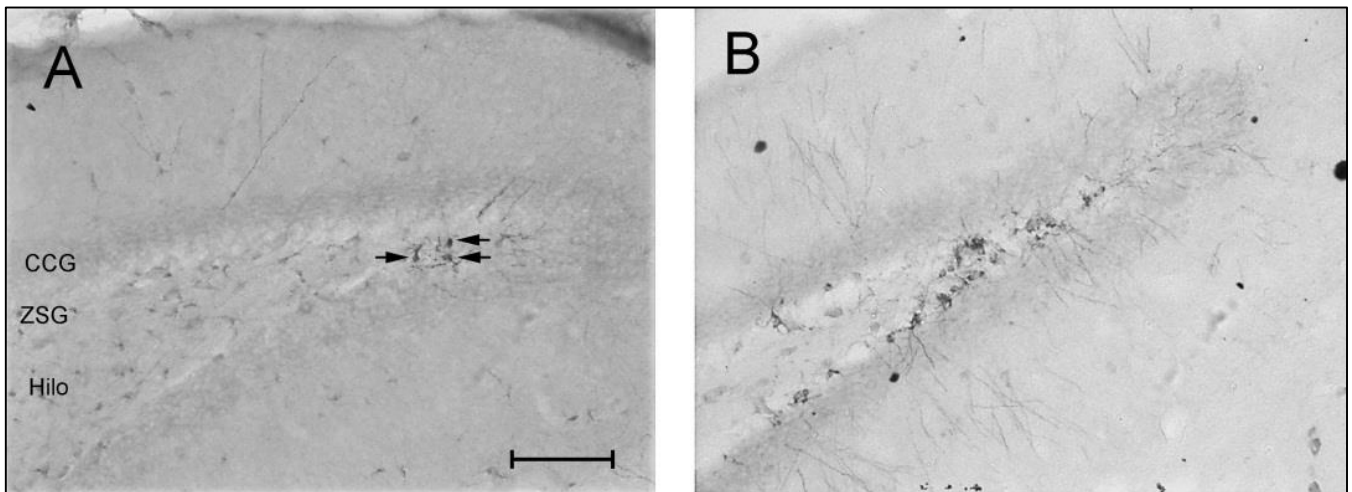
Análise estatística: Two-way Anova e teste de múltiplas comparações Bonferonni.

Figura 29: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).



* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal
 # p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vsEtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal

Figura 30: Padrão de marcação das células imunorreativas ao DCX no giro denteado do hipocampo nos diferentes grupos experimentais



. A - grupo EtOH+Sal, B - Grupo EtOH+TAU. Barra de calibração: 50µm.

A exposição ao etanol provocou significativa redução na neurogênese. Este grupo (ETOH+SAL) apresentou o menor número de células imunorreativas ao DCX dentre os grupos experimentais; quando comparado com a água, apresentou redução significativa da neurogênese no giro denteado como um todo (39,5%) e em sua porção posterior (51,1%).

A taurina promoveu significativa neuroproteção contra os efeitos do etanol na neurogênese. Este grupo (EtOH+TAU) apresentou significativo aumento no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado como um todo (41,3%) e em sua porção posterior (59%) em relação ao controle (EtOH + SAL).

A taurina apresentou, ainda, significativa redução da neurogênese no giro denteado como um todo (19,7%) quando comparado com o controle.

Os resultados mostraram que a taurina não promoveu aumento na neurogênese nos animais quando comparados ao grupo controle. Entretanto, trabalhos na literatura mostraram que a taurina pode promover melhoras cognitivas e estimular a neurogênese em animais com déficits causados por

fatores externos ou internos, mas não promove mudanças em animais saudáveis.

RIVAS-ARANCIBIA e colaboradores. (2000) mostraram que a administração de taurina promoveu melhoras cognitivas em animais jovens, adultos ou idosos expostos ao ozônio, que produz significativo estresse oxidativo. O mesmo trabalho mostrou ainda que os animais controles, não expostos ao ozônio, mas que receberam a taurina, não apresentaram mudanças nos testes cognitivos quando comparados aos animais controle que receberam injeção de salina. Outros estudos mostraram resultados semelhantes, onde a taurina promoveu melhoras na neurogênese hipocampal após injeção de lipopolissacarídeo (WU et al., 2013) ou em animais idosos (NEUWIRTH, 2013), mas não promoveu mudanças nos grupos controles ou animais jovens saudáveis, respectivamente.

Sabe-se que o uso de isofurano, um anestésico que pode induzir déficits cognitivos especialmente em pacientes idosos após cirurgia. Por isso, ZHANG e colaboradores (2016) verificaram que o pré tratamento com taurina, em ratos idosos que foram submetidos ao isofurano, impediu a disfunção cognitiva nesses animais por inibir a apoptose no hipocampo.

Assim, de acordo com estes dados, é provável que a taurina não estimule a neurogênese ou promova melhoras cognitivas em cérebros adultos saudáveis, mas somente em situações onde já existe um déficit pré-existente causado.

O consumo excessivo de etanol provoca neuroinflamação em diversas estruturas encefálicas. Estudos observaram aumento da produção e secreção de citocinas pela micróglia após a exposição ao etanol (CREWS et al., 2006; QIN et al., 2008). Estas citocinas são potentes fatores de inibição da neurogênese

hipocampal (EKDAHL et al., 2009). A IL-1 β pode inibir a neurogênese em praticamente todos seus estágios, desde a proliferação, sobrevivência até a maturação celular (ZOU; CREWS, 2012; ZUNSZAIN et al., 2012). A taurina tem importante função na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo relacionado a estes processos inflamatórios, tendo papel fundamental na citoproteção e atenuação da apoptose (RIPPS; SHEN, 2012; MARCINKIEWICZ; KONTNY, 2014). Estes dados sugerem que a neuroproteção na neurogênese da taurina pode estar relacionada com seus efeitos anti-inflamatórios.

4.1.4.5 Apoptose – células picnóticas

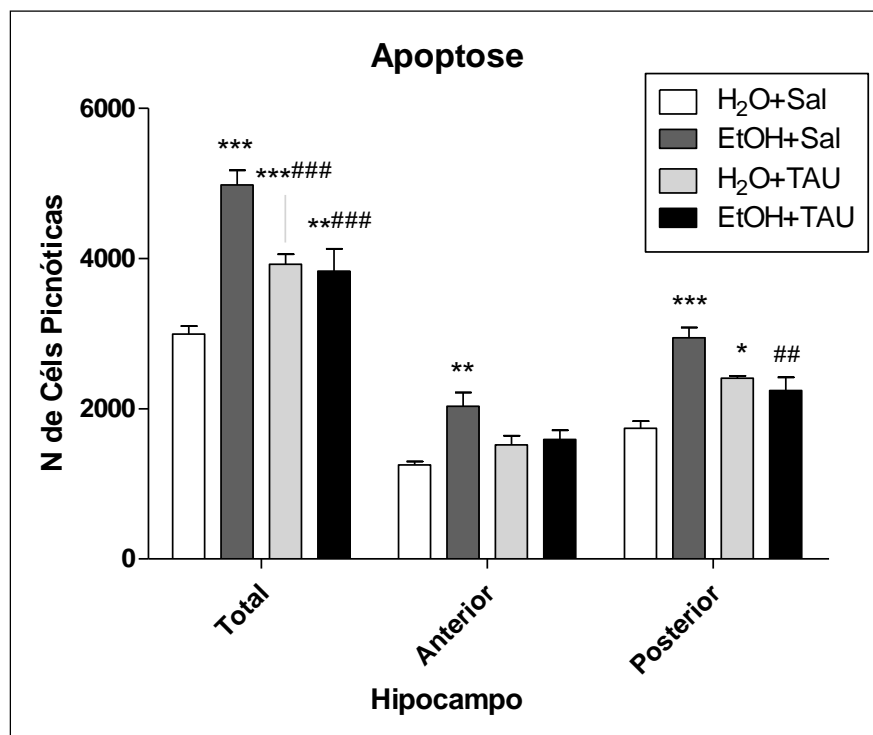
De maneira geral todos os grupos experimentais apresentaram significativo aumento na apoptose no giro dentado ou em suas divisões anterior e posterior, quando comparados ao grupo controle, sem tratamento (Tabela 7 e Figura 31).

Tabela 7 - Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H2O+Sal	EtOH+Sal	H2O+TAU	EtOH+TAU
Total	2994 \pm 108	4980 \pm 196 ^{***}	3924 \pm 135 ^{***###}	3834 \pm 295 ^{***##}
Anterior	1254 \pm 44	2034 \pm 181 ^{**}	1518 \pm 125	1590 \pm 124
Posterior	1740 \pm 97	2946 \pm 135 ^{***}	2406 \pm 30 [*]	2244 \pm 175 ^{##}

Valores correspondem à média \pm EP.
^{*} p<0,05 vs. H₂O+Sal, ^{**} p<0,01 vs. H₂O+Sal, ^{***} p<0,001 vs. H₂O+Sal
[#] p<0,05 vs. EtOH+Sal, ^{##} p<0,01 vs EtOH+Sal, ^{###} p<0,001 vs. EtOH+Sal
^{\$} p<0,05 vs. H₂O +TAU, ^{\$\$} p<0,01 vs H₂O +TAU, ^{\$\$\$} p<0,001 vs. H₂O +TAU
 Análise estatística: *Two-way* Anova e teste de múltiplas comparações Bomferonni.

Figura 31: Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.



* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal
p<0,05 vs. EtOH+Sal, ## p<0,01 vs. EtOH+Sal, ### p<0,001 vs. EtOH+Sal

A análise quantitativa mostrou significativo aumento do número de células picnóticas no giro dentado como um todo (66,3%) e em suas porções anterior e posterior (62,2% e 69,3% respectivamente) no grupo EtOH+Sal; a taurina promoveu proteção contra os efeitos do etanol, promovendo uma redução de 38,2% das células picnóticas no giro dentado como um todo, sendo estes valores semelhantes aos observados com o tratamento da taurina somente (H₂O + TAU)

A administração crônica de etanol também levou a um significativo aumento da apoptose na camada celular granular e diminuição do volume hipocampal quando comparados ao grupo controle. Estes dados também são consistentes

com trabalhos da literatura. O consumo crônico e excessivo de etanol pode prejudicar as vias de transdução de sinais neuronais (TATENO; SAITO, 2008).

Estudos *in vitro*, utilizando culturas de neurônios corticais de ratos revelaram que o etanol induziu uma redução da atividade do CREB e diminuiu a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que é essencial na síntese de neurotransmissores e outras moléculas necessárias para a sobrevivência neuronal (SAKAI et al., 2005). Estes dados sugerem que a morte neuronal após exposição ao etanol está relacionada com alteração da sinalização intracelular causada pela supressão da atividade de CREB e diminuição dos níveis do BDNF.

São poucos os estudos dos efeitos neuroprotetores da taurina contra o etanol, e até o presente momento, estes estudos analisam apenas o cerebelo de camundongos neonatos. TARANUKHIN et al. (2010, 2012), mostraram ação neuroprotetora da taurina em células cerebelares de camundongos neonatos submetidos à intoxicação aguda de etanol. Estes estudos mostraram significativa redução no número de células imunopositivas para os marcadores de apoptose Caspase-3 e Tunel em diversas regiões cerebelares após administração aguda de taurina em animais que receberam injeção subcutânea de etanol. No entanto, também mostraram que a taurina não foi capaz de neuroproteger as células de Punkinje em animais de 4 dias de vida. Desta maneira, os autores sugeriram que os efeitos neuroprotetores da taurina não são lineares, apresentando diferenças de acordo com o tipo neuronal estudado e a concentração de taurina no plasma.

A análise do número de células picnóticas através da coloração com violeta de cresila pode ser usada como indicativo de apoptose (FRYE; MCCORMICK,

2000). No entanto, novos estudos devem ser realizados utilizando técnicas de imunohistoquímica mais específicas para apoptose, como a Caspase-3.

4.2 EXPERIMENTO 2 - Análise dos efeitos da administração de taurina na reversão dos efeitos do consumo de etanol na neurogênese hipocampal

Neste experimento, diferentemente do anterior, os animais receberam taurina pos etanol, com o intuito de observar se a taurina promove reversão dos efeitos deletéricos do etanol, na neurogênese hipocampal. Assim, os parâmetros estudados foram os mesmos.

4.2.1 Peso corporal

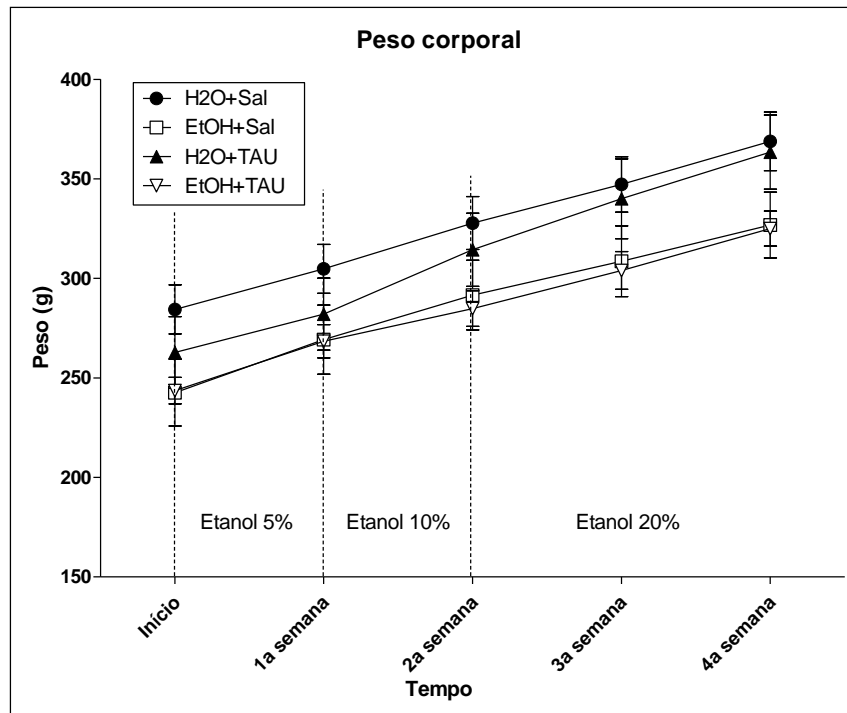
O acompanhamento do peso corporal dos animais realizado semanalmente mostrou aumento de peso constante e sem diferenças significantes entre os grupos em todo período experimental (Tabela 8 e Figura 32).

Tabela 8 - Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Início	284,4±12,3	242,6±16,8	262,8±18,0	243,6±6,7
1ª semana	304,8±12,3	269,2±17,4	282,0±18,1	268,4±8,3
2ª semana	327,8±13,3	291,6±17,5	314,4±18,4	284,8±8,9
3ª semana	347,2±13,9	308,6±17,8	340,0±20,0	304,0±9,4
4ª semana	368,8±14,7	326,8±16,5	363,4±18,6	325,0±8,8

Valores correspondem à média ±EP.
Análise estatística: *Two-way* Anova. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

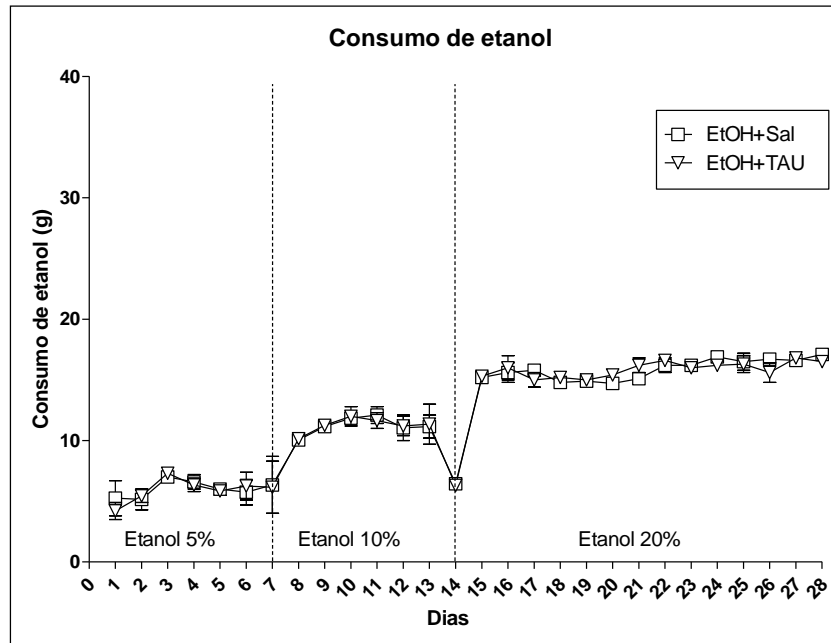
Figura 32: Efeitos da administração de taurina no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol. (n=8)



4.2.2 Consumo de etanol

A figura 33 mostra o consumo de etanol nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU durante o período experimental. Conforme esperado, os resultados não mostraram diferenças significantes no consumo de etanol nos dois grupos experimentais.

Figura 33: Consumo de etanol nos grupos EtOH+Sal e EtOH+TAU durante o período experimental.



4.2.3 Análise volumétrica

A análise volumétrica não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (Tabela 9 e Figura 34).

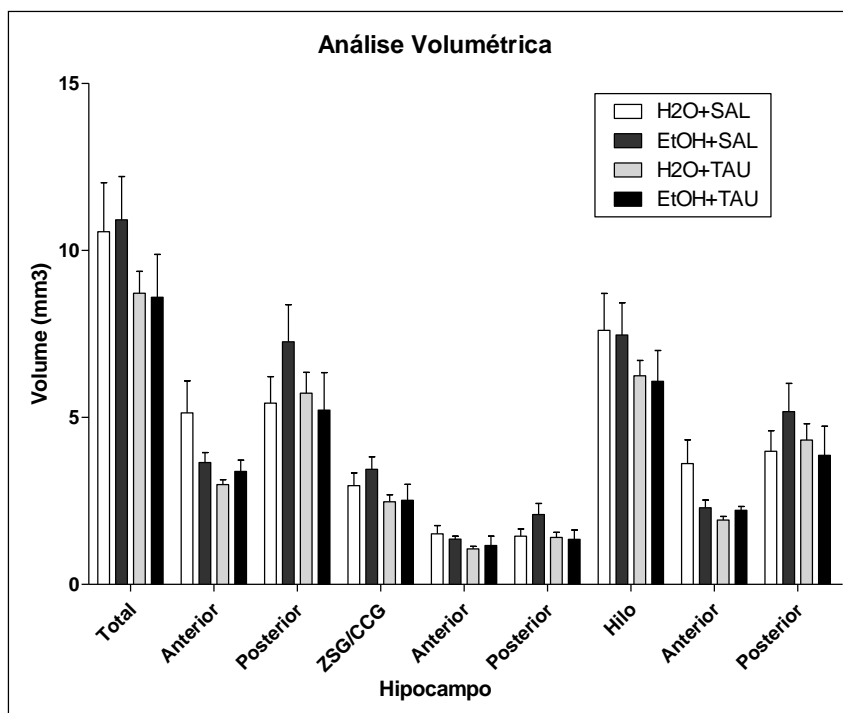
Tabela 9 - Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.

Volume (mm ³)	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	10,56060±1,46681	10,91056±1,30071	9,71863±1,14263	9,48331±1,37000
Anterior	5,13207±0,96041	3,64709±0,29817	3,31896±0,35086	3,38753±0,27393
Posterior	5,42852±0,79271	7,26346±1,10776	6,39967±0,85093	6,09578±1,27249
CCG/ZSG	2,95701±0,38283	3,44498±0,37652	2,96266±0,52089	2,64812±0,41388
Anterior	1,51283±0,25227	1,35442±0,09274	1,35019±0,29253	1,17730±0,23180
Posterior	1,44418±0,21550	2,09056±0,33438	1,61247±0,24195	1,47082±0,25428
Hilo	7,60359±1,10831	7,46558±0,96729	6,75597±0,64120	6,83519±1,06357
Anterior	3,61925±0,71099	2,29268±0,23049	1,96877±0,10218	2,21023±0,09516
Posterior	3,98434±0,61746	5,17290±0,84616	4,78720±0,62665	4,62496±1,03964

Valores correspondem à média ±EP.

Análise estatística: Two-way Anova. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 34: Efeitos da administração de taurina no volume hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.



4.2.4 Proliferação celular – Ki-67

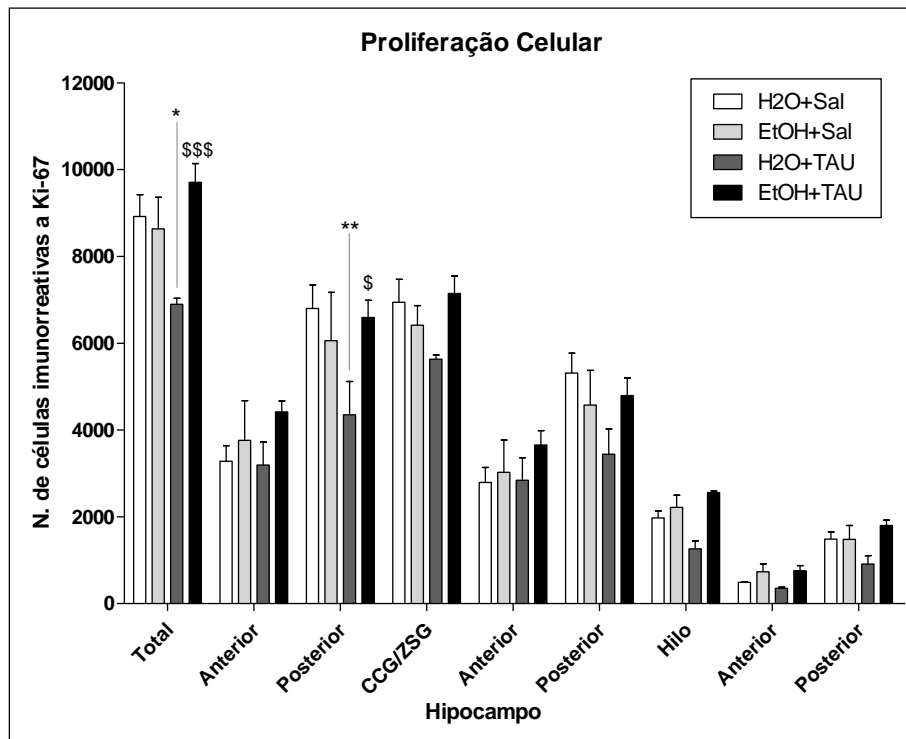
A análise da proliferação celular no giro denteado mostrou significativa redução na proliferação celular no grupo H₂O+TAU (Tabela 10 e Figura 35). Quando comparado ao grupo H₂O+Sal, apresentou redução significativa na proliferação celular no giro denteado como um todo (-22,7%), em sua porção posterior (-36,0%). Quando comparado ao grupo EtOH+TAU, apresentou redução significativa na proliferação celular no giro denteado como um todo (-28,9%), em sua porção posterior (-34%).

Tabela 10 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	8920±500	8632±729	6896±136 *	9704±436 \$\$\$
Anterior	3280±361	3760±918	3192±529	4416±257
Posterior	6800±545	6056±1116	4352±769 **	6592±394 \$
CCG/ZSG	6944±525	6416±448	5632±98	7144±405
Anterior	2792±347	3024±742	2840±520	3656±331
Posterior	5312±455	4576±798	3440±583	4792±409
Hilo	1976±161	2216±283	1264±180	2560±32
Anterior	488±16	736±179	352±29	760±118
Posterior	1488±168	1480±319	912±190	1800±123

Valores correspondem à média ±EP.
 * p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal, *** p<0,001 vs. H₂O+Sal
 \$ p<0,05 vs. H₂O +TAU, \$\$ p<0,01 vs. H₂O +TAU, \$\$\$ p<0,001 vs. H₂O +TAU
 Análise estatística: Two-way Anova e teste de múltiplas comparações Bomferonni.

Figura 35: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao Ki-67 no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).



* p<0,05 vs. H₂O+Sal, ** p<0,01 vs. H₂O+Sal
 \$ p<0,05 vs. H₂O +TAU, \$\$ p<0,01 vs. H₂O +TAU, \$\$\$ p<0,001 vs. H₂O +TAU

Os resultados observados neste experimento mostraram que após 28 dias do fim do consumo de etanol, a proliferação celular voltou aos parâmetros dos animais do grupo controle, que receberam apenas água. Provavelmente isto se deu ao fato de que após a exposição ao etanol, durante o período de abstinência, ocorre o processo natural de recuperação no cérebro, tanto em humanos (AGARTZ et al, 2003) quanto em animais (NIXON; CREWS, 2004; NIXON et al, 2008). Apesar deste mecanismo ainda não estar completamente entendido, ele pode fornecer importantes informações sobre este processo endógeno de auto reparação.

Estudos demonstraram que em resposta à exposição ao etanol, o hipocampo de roedores apresentaram dois períodos distintos de grande proliferação celular: o primeiro, após dois dias de abstinência (NIXON et al, 2008) e o segundo depois de sete dias (NIXON; CREWS, 2004). De acordo com estes estudos, neste segundo período, há um aumento de quatro vezes na proliferação celular, com as taxas de sobrevivência e diferenciação neuronal similar às observadas nos animais do grupo controle (NIXON; CREWS, 2004). Estes dados sugerem que este complexo mecanismo de auto-reparação hipocampal é o responsável pela repopulação neuronal nesta estrutura.

Estudos demonstraram que esta auto-reparação neuronal pode ser influenciada positivamente por diversos fatores como exercício físico (MAYNARD; LEASURE, 2013) e ambientes enriquecidos (WILL et al, 2004). Os animais do grupo EtOH+TAU não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos animais dos grupos H₂O+Sal e EtOH+Sal. Novos experimentos são necessários para avaliar se a taurina afetou a velocidade desta auto-reparação hipocampal.

Ao comparar os resultados obtidos nos dois experimentos deste trabalho, podem-se observar níveis de proliferação celular significante maiores nos animais do Experimento 2. O estresse é um importante fator inibitório na neurogênese, lembrando que os animais do Experimento 1 foram submetidos à cirurgia de canulação das artéria e veia femoral e também foram expostos ao estresse agudo de restrição antes da perfusão.

Fatores estressantes podem inibir significativamente a neurogênese em todas suas fases: proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (GOULD et al, 2000). A revisão publicada por SCHOENFELD e GOULD (2012) mostrou

diversos estudos onde foi observada significativa redução da neurogênese hipocampal após os animais serem submetidos a diferentes modelos de estresse agudo e crônico.

O estresse pode ativar diversos mecanismos fisiológicos responsáveis pela inibição da neurogênese. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-glândula supra-renal pelo estresse promove a liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea, que é considerado um potente fator inibitório na neurogênese (SCHOENFELD; GOULD, 2013).

Alguns fatores estressantes podem aumentar os níveis de citocinas, como a interleucina-1 (IL-1), central e periféricamente (GRIPPO et al, 2005; DEAK et al, 2005). A interleucina-1 pode inibir a neurogênese através da estimulação da liberação de glicocorticóides pelas glândulas supra-renais (BERNTON et al, 1987) e através da neuroinflamação mediada por esta citocina (KOO; DUMAN, 2008).

Estudos demonstraram que o modelo de estresse de restrição, tanto agudo (WOOD et al, 2003; BAIN et al, 2004) quanto crônico (WOOD et al, 2003; ROSENBROCK et al, 2005), promoveram significativa inibição da neurogênese.

4.2.5 Neurogênese – DCX

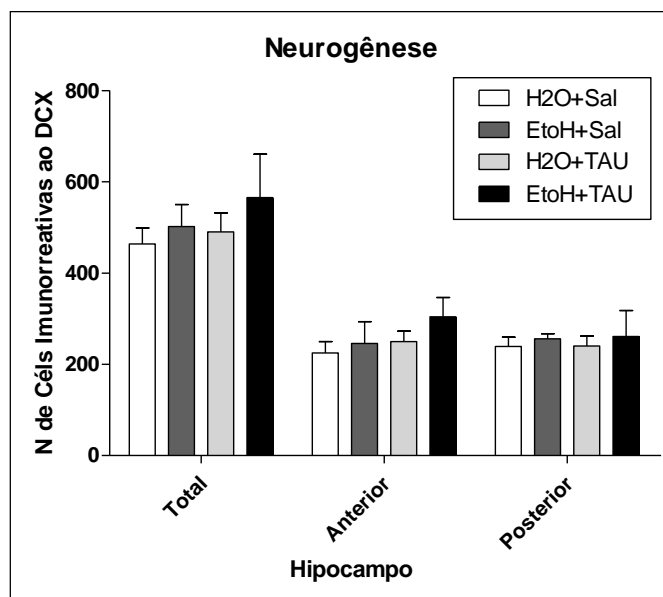
A análise da neurogênese não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (Tabela 11 e Figura 36).

Tabela 11 - Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	464±35	502±48	490±42	565±95
Anterior	225±25	246±48	250±23	304±42
Posterior	239±21	256±11	240±21	261±57

Valores correspondem à média ±EP.
Análise estatística: *Two-way* Anova. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 36: Efeitos da administração de taurina no número de células imunorreativas ao DCX no giro denteado de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.



Estudo recente realizados por GEBARA et al (2015), foi observado significativo aumento na neurogênese no hipocampo de camundongos idosos após administração crônica de taurina (i.p., 268 mg/kg durante 40 dias). Este resultado indica que talvez seja necessário maior tempo de administração e concentração do composto para observação dos efeitos. Lembrando que o metabolismo de camundongos é diferente do de ratos, desta maneira, 40 dias e

268 mg/kg para os primeiros, pode representar duração e concentração consideravelmente maiores nos segundos.

4.2.6 Apoptose – células picnóticas

A análise quantitativa do número de células picnóticas não mostrou diferenças estatisticamente significantes nos níveis de apoptose hipocampal nos diferentes grupos experimentais (Tabela 12 e Figura 37).

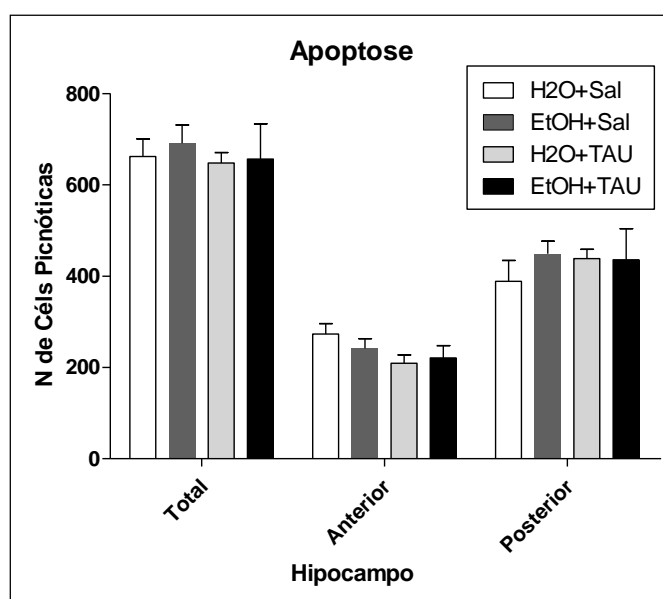
Tabela 12 - Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol (n=5).

	Grupos			
	H ₂ O+Sal	EtOH+Sal	H ₂ O+TAU	EtOH+TAU
Total	662±38	691±40	648±23	656±77
Dorsal	273±23	242±21	209±18	221±27
Ventral	389±46	449±27	438±20	436±69

Valores correspondem à média ±EP.

Análise estatística: Two-way Anova. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

Figura 37: Efeitos da administração de taurina na apoptose hipocampal de ratos submetidos ao modelo de consumo forçado de etanol.



Ao comparar o número de células em apoptose com os animais do Experimento 1, que foram submetidos à cirurgia de canulação e ao estresse agudo, os animais do experimento 2 apresentaram menor apoptose hipocampal. Assim como os resultados da proliferação celular, a neurogênese e apoptose observadas no grupo EtOH+TAU é similar aos dos grupos H₂O+Sal e EtOH+Sal. Novos experimentos são necessários para avaliar se a taurina afetou a velocidade desta auto-reparação hipocampal.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

No Experimento 1, após análise dos efeitos da taurina na função cardiovascular e neurogênese hipocampal de ratos submetidos ao protocolo de consumo forçado de etanol, podemos concluir:

- ✓ A dose de taurina utilizada no presente trabalho não promoveu mudanças significativas na função cardiovascular nos grupos experimentais, evidenciando que a taurina não apresentou efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular.
- ✓ A hidratação dos animais tem papel importante na precipitação do quadro hipertensivo no modelo utilizado no presente trabalho.
- ✓ O modelo de consumo crônico de etanol foi eficaz em promover significativa redução da neurogênese hipocampal.
- ✓ As análises da proliferação e sobrevivência celular, neurogênese e apoptose no giro denteado mostraram que a administração de taurina promoveu significativa neuroproteção contra os efeitos do etanol.

No Experimento 2, após análise dos efeitos da taurina na reversão dos efeitos do etanol na neurogênese hipocampal, podemos concluir:

- ✓ O hipocampo dos animais voltou a apresentar seus valores basais de proliferação celular, neurogênese e apoptose após 28 dias sem receber etanol, sugerindo complexo mecanismo de auto-reparação neuronal.
- ✓ Novos experimentos são necessários para analisar os possíveis efeitos da taurina neste mecanismo de auto-reparação.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, A.A.; WOOLLES, W.R. Ethanol-induced hypertension involves impairment of baroreceptors. **Hypertension**. v.10, n.1, p.67-73, 1987.

AGARTZ, I.; BRAG, S.; FRANCK, J.; HAMMARBERG, A.; OKUGAWA, G.; SVINHUFVUD, K.; BERGMAN, H. MR volumetry during acute alcohol withdrawal and abstinence: a descriptive study. **Alcohol Alcohol.**, Jan-Feb;v.38, n.1, p.71-78, 2003.

AGRAWAL, H.C.; DAVIS, J.M.; HIMWICH, W.A. Developmental changes in mouse brain: weight, water content and free amino acids. **J Neurochem**. Sep, v.15, n.9, p.917-23, 1968.

ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. Microvascular and vascular smooth muscle actions of ethanol, acetaldehyde, and acetate. **Fed Proc**. Jun, v.41, n.8, p.2447-2451, 1982.

ANDERSON, C.M.; HOWARD, A.; WALTERS, J.R.; GANAPATHY, V.; THWAITES, D.T. Taurine uptake across the human intestinal brush border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). **J Physiol**; v.587, p.731-744, 2009.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**. Oct; v.15, n.4, p.961-73,1995.

BAIN, M.J.; DWYER, S.M.; RUSAK, B. Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. **Neurosci Lett.**, Sep 16; v.368, n.1, p.7-10, 2004.

BERNTON, E.W.; BEACH, J.E.; HOLADAY, J.W.; SMALLRIDGE, R.C.; FEIN, H.G. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. **Science**. Oct 23; v.238, n.4826, p.519-521, 1987.

BIEBL, M.; COOPER, C.M.; WINKLER, J.; KUHN, H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. **Neurosci Lett**. Sep 8; v. 291, n.1, p.17-20, 2000.

BIZON, J.L.; GALLAGHER, M. More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in Long-Evans rats. **Sci Aging Knowledge Environ**. Feb 16; n.7, re2, 2005. DOI:10.1126/sageke.2005.7.re2.

BOGGAN, W.O.; MEDBERRY, C.; HOPKINS, D.H. Effect of taurine on some pharmacological properties of ethanol. **Pharmacol Biochem Behav.** v.9, p. 469–472, 1978.

BONTHIUS, D.J.; WEST, J.R. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. **Alcohol Clin Exp Res.**, Feb; v.14, n.1, p. 107-118, 1990.

BROWN, J.P.; COUILLARD-DESPRÉS, S.; COOPER-KUHN, C.M.; WINKLER, J.; AIGNER, L.; KUHN, H.G. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **J Comp Neurol.** Dec 1, v.467, n.1, p.1-10, 2003.

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. **Dados Epidemiológicos sobre o Uso de Álcool no Brasil.** 2016 Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/11/dados-epidemiologicos-sobre-uso-alcool-no.php>>. Acesso em: 22 de outubro de 2016.

CHAN, S.Y. Taurine and human spermatozoal capacitation. **Cell Biol Int Rep.** Feb; v.9, n.2, p.127-130, 1985.

CHAN, T.C.; SUTTER, M.C. Ethanol consumption and blood pressure. **Life Sci.** Nov 14; v.33, n.20, p.1965-1973, 1983.

CHAN-PALAY, V.; LIN, C.T.; PALAY, S.; YAMAMOTO, M.; WU, J.Y. Taurine in the mammalian cerebellum: demonstration by autoradiography with [3H] taurine and immunocytochemistry with antibodies against the taurine-synthesizing enzyme, cysteine-sulfinic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci USA.** Apr; v.79, n.8, p.2695-2699, 1982.

CHANRAUD, S.; MARTELLI, C.; DELAIN, F.; KOSTOGIANNI, N.; DOUAUD, G.; AUBIN, H.; REYNAUD, M.; MARTINOT, J. Brain morphometry and cognitive performance in detoxified alcohol-dependents with preserved psychosocial functioning. **Neuropsychopharmacol**, v. 32, n.2, p. 429-438, 2007.

CHEN, N.H.; REITH, M.E.A.; QUICK, M.W. Synaptic uptake and beyond: the sodium and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. **Pflugers Arch**, v.447, p. 519-531, 2004.

CHEN, W.; GUO, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. The beneficial effects of taurine in preventing metabolic syndrome. **Food Funct.**, Apr; v. 7, n.4, p. 1849-1863, 2016. Doi: 10.1039 / c5fo01295c.

CHRISTIE, B.R.; CAMERON, H.A. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus.** v.16, n.3, p.199-207, 2006.

CLOUD-CLON, CO. **Taurine Transporter (TAUT).** Disponível em: <<http://www.cloud-clone.com/items/E396.html>> Acesso em: 31 de outubro de 2016.

COSTARDI, J.V.; NAMPO, R.A.; SILVA, G.L.; RIBEIRO, M.A.; STELLA, H.J.; STELLA, M.B.; MALHEIROS, S.V. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. **Rev Assoc Med Bras**. Aug; v.61, n.4, p.381-387, 2015.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; RESSTEL, L.B.; CORRÊA, F.M. The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. **Neuroreport**. Oct 2; v.17, n.14, p.1531-1535, 2006.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; TAVARES, R.F.; CORRÊA, F.M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**. May; v.12, n.3, p.268-278, 2009.

CRESTANI, C.C.; LOPES DA SILVA, A.; SCOPINHO, A.A.; RUGINSK, S.G.; UCHOA, E.T.; CORREA, F.M.; ELIAS, L.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; RESSTEL, L.B. Cardiovascular alterations at different stages of hypertension development during ethanol consumption: time-course of vascular and autonomic changes. **Toxicol Appl Pharmacol**. Oct 15; v.280, n.2, 245-255, 2014.

CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; ALVES, F.H.; RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**. Jan; v.13, n.1, 61-72, 2010.

CREWS, F.; NIXON, K. **Alcohol, Neural Stem Cells and Adult neurogenesis**, 2004. Disponível em < <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-2/197-204.htm>> Acesso em: 17 de outubro de 2016.

CREWS, F.; NIXON, K.; KIM, D.; JOSEPH, J.; SHUKITT-HALE, B.; QIN, L.; ZOU, J. BHT blocks NF-kappa B activation and ethanol-induced brain damage. **Alcohol Clin Exp Res**. Nov; v.30, n.11, p.1938-1949, 2006.

CREWS, F.T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol**, Mar-Apr;44(2):115-27, 2009.

DA SILVA, A.L.; RUGINSK, S.G.; UCHOA, E.T.; CRESTANI, C.C.; SCOPINHO, A.A.; CORREA, F.M.; DE MARTINIS, B.S.; ELIAS, L.L.; RESSTEL, L.B.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Time-course of neuroendocrine changes and its correlation with hypertension induced by ethanol consumption. **Alcohol**. Jul-Aug; v.48, n.4, p.495-504, 2013.

DAS, J.; GHOSH, J.; MANNA, P.; SIL, P.C. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. **Biochem Pharmacol**. Apr 1; v.81, n.7, 891-909, 2011.

DAWSON, R.J.R.; LIU, S.; JUNG, B.; MESSINA, S.; EPPLER, B. Effects of high salt diets and taurine on the development of hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Amino Acids**, v.19, p. 643–665, 2000.

DAYER, A.G.; FORD, A.A.; CLEAVER, K.M.; YASSAEE, M.; CAMERON, H.A.; Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. **J. Comp Neurol.** Jun 9; v.460, n.4, 563-572, 2003.

DE LUCA, A.; PIERNO, S.; CAMERINO, D.C. Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. **J Transl Med**, v.13, Article 243, 2015. DOI:10.186 / s12967-015-0610-1.

DEAK, T.; BORDNER, K.A.; MC ELDERRY, N.K.; BARNUM, C.J.; BLANDINO P.J.R.; DEAK, M.M.; TAMMARIELLO, S.P. Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. **Brain Res Bull.**, Jan 30; v.64, n.6, p. 541-556, 2005.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. **Br. Med. J.**, v.1, p.1058-1061, 1976.

EKDAHL, C.T.; KOKAIA, Z. LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience.** Feb 6; v.158, n.3, p.1021-1029, 2009.

EL IDRISSE, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. **Amino Acids.** Feb; v.3, n.2, p.321-328, 2008.

ENGI, S.A.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Effect of Voluntary Ethanol Consumption Combined with Testosterone Treatment on Cardiovascular Function in Rats: Influence of Exercise Training. **PLoS One.** Jan 13; v.11, n.1, e0146974. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0146974. eCollection.

FADDA, F.; ROSSETTI, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog Neurobiol.** Nov; v.56, n.4, p.385-431, 1998.

FAGGIANO, A.; MELIS, D.; ALFIERI, R.; DE MARTINO, M.; FILIPPELLA, M.; MILONE, F. Sulfur amino acids in Cushing's disease: insight in homocysteine and taurine levels in patients with active and cured disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, p. 6616–6622, 2005.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil;** v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FERKO, A.P. Ethanol-induced sleep time: interaction with taurine and a taurine antagonist. **Pharmacol Biochem Behav.** v.27, p. 235–238, 1987.

FERNÁNDEZ-SOLÀ, J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. **Nat Rev Cardiol.** Oct; v.12, n.10, p.576-587, 2015.

FIGUEIRA, I.; LETA, J.; DE MEIS, L. Evaluating the scientific production among the main brazilian psychiatric journal from 1981 to 1995. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.21, n.4p. 201-208, 1999.

FRYE, C.A.; MCCORMICK, C.M. Androgens are neuroprotective in the dentate gyrus of adrenalectomized female rats. **Stress.** May; v.3, n.3, p.185-194, 2000.

FUJIOKA, H.; AKEMA, T. Lipopolysaccharide acutely inhibits proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus in adult rats. **Brain Res.** v.17, n. 1352, p. 35-42, 2010.

FUJITA, T.; ANDO, K.; NODA H, ITO Y, SATO Y. Effects of increased adrenomedullary activity and taurine in young patients with borderline hypertension. **Circulation.** v.75,n.3, p.525-532, 1987.

FUJITA, T.; SATO, Y. Changes in blood pressure and extracellular fluid with taurine in DOCA-salt rats. **Am J Physiol.** v.250, n.6 Pt 2, R1014-R1020,1986.

GAGE, F.H.; COATES, P.W.; PALMER, T.D.; KUHN, H.G.; FISHER, L.J.; SUHONEN, J.O.; PETERSON, D.A.; SUHR, S.T.; RAY, J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.92, n.25, p. 11879-11883, 1995.

GEBARA, E.; UDRY, F.; SULTAN, S.; TONI, N. Taurine increases hippocampal neurogenesis in aging mice. **Stem Cell Res.** May; v.14, n.3, p.369-379, 2015.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol.** Oct; v.133, n.4, p.1710-1715, 1984.

GINSBURG, B.C.; LAMB, R.J. Taurine and ethanol interactions: behavioral effects in mice. **Eur J Pharmacol.**578:228–237,2008.

GLASS, E.N.; ODLE, J.; BAKER, D.H. Urinary taurine excretion as a function of taurine intake in adult cats. **J Nutr,** v.122, p.1135–1142. 1992.

GOULD, E.; CAMERON, H.A.; DANIELS, D.C.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **J Neurosci.** v.12, n.9, p. 3642-3650, 1992.

GOULD, E.; MCEWEN, B.S.; TANAPAT, P.; GALEA, L.A.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci.** v.17, n.7, p.2492-2498, 1997.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; RYDEL, T.; HASTINGS, N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. **Biol Psychiatry.**, Oct 15; v.48, n.8, p.715-720, 2000.

GRASSI, G.M.; SOMERS, V.K.; RENK, W.S.; ABOUD, F.M.; MARK, A.L. Effects of alcohol intake on blood pressure and sympathetic nerve activity in normotensive humans: a preliminary report. **J Hypertens Suppl.** v.7, n.6, S20-S21, 1989.

GREEN, T.R.; FELLMAN, J.H.; EICHER, A.L.; PRATT, K.L. Antioxidant role and subcellular localisation of hypotaurine and taurine in human neutrophils. **Biochim Biophys Acta**, v.1073, p.91–97, 1991.

GRIPPO, A.J.; FRANCIS, J.; BELTZ, T.G.; FELDER, R.B.; JOHNSON, A.K. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. **Physiol Behav.**, Apr 13; v.84, n.5, p. 697-706, 2005.

GROSS, C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nat Rev Neurosci.** v.1, n.1, p. 67-73, 2000.

HAMELINK, C.; HAMPSON, A.; WINK, D.A.; EIDEN, L.E.; ESKAY, R.L. Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. **J Pharmacol Exp Ther.** v.314, n.2, p. 780-788, 2005.

HANSEN, S.H. Taurine homeostasis and its importance for physiological functions. In: Cynober, L. (Ed.), **Metabolic and Therapeutic Aspects of Aminoacids in Clinical Nutrition.** CRC Press, Boca Raton, 2004. p. 739-747.

HARADA, H.; KITAZAKI, K.; TSUJINO, T.; WATARI, Y.; IWATA, S.; NONAKA, H.; HAYASHI, T.; TAKESHITA, T.; MORIMOTO, K.; YOKOYAMA, M. Oral taurine supplementation prevents the development of ethanol-induced hypertension in rats. **Hypertens Res.**v. 23, n.3, p.277-284, 2000.

HARADA, N.; NINOMIYA, C.; OSAKO, Y.; MORISHIMA, M.; MAWATARI, K.; TAKAHASHI, A.; NAKAYA, Y. Taurine alters respiratory gas exchange and nutrient metabolism in type 2 diabetic rats. **Obes Res.** v.12, n.7, 1077-1084, 2004.

HAYES, K.C.; CAREY, R.E.; SCHMIDT, S.Y. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. **Science.** v.188, n.4191, p.949-951, 1975 .

HAYES, K.C.; STURMAN, J.A. Taurine in metabolism. **Annu Rev Nutr.** v.1, p. 401-425, 1981.

HE. J.; NIXON, K.; SHETTY, A.K.; CREWS, F.T. Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. **Eur J Neurosci.**, v.21, n.10, p. 2711-2720, 2005.

HEILIG, M.; KOOB, G.F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. **Trends Neurosci.** v.30, n.8, p.399-406, 2007.

HENSHALL, D.C.; ARAKI, T.; SCHINDLER, C.K.; LAN, J.Q.; TIEKOTER, K.L.; TAKI, W.; SIMON, R.P. Activation of Bcl-2-associated death protein and

counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. **J Neurosci.** Oct 1; v.22, n.19, p.8458-8465, 2002.

HERMAN, J.P.; SCHAFER, K.H.; SLADEK, C.D.; DAY, R.; YOUNG, E.A.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Chronic electroconvulsive shock treatment elicits up-regulation of CRF and AVP mRNA in select populations of neuroendocrine neurons. **Brain Res.**, v.501, n.2, p. 235-246, 1989.

HERNÁNDEZ-BENÍTEZ, R.; RAMOS-MANDUJANO, G.; PASANTES-MORALES, H. Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. **Stem Cell Res.**; v.9, n.1, p.24-34, 2012.

HERRERA, D.G.; YAGUE, A.G.; JOHNSEN-SORIANO, S.; BOSCH-MORELL, F.; COLLADO-MORENTE, L.; MURIACH, M.; ROMERO, F.J.; GARCIA-VERDUGO, J.M. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.100, n.13, p. 7919-7924, 2003.

HOFFMANN, E.K.; LAMBERT, I.H. Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. **J Physiol**, v.338, p. 613–625, 1983.

HSIEH, Y.L.; YEH, Y.H.; LEE, Y.T.; HUANG, C.Y. Effect of taurine in chronic alcoholic patients. **Food Funct.** v.5, n.7, 1529-1535, 2014.

HU, J. Antihypertensive Effect of Taurine in Rat. In: AZUMA, J. et al. (eds.). **Taurine 7.** New York: Springer Science, 2009. Chapt. 8, p. 75-84. (Advances in Experimental Medicine and Biology, 643).

HUSAIN, K.; ANSARI, R.A.; FERDER, L. Alcohol-induced hypertension: Mechanism and prevention. **World J Cardiol.**, v.6, n.5, 245-252, 2014.

HUXTABLE, R.J. Physiological actions of taurine. **Physiol Rev**; v.72, p. 101-163, 1992.

IBSEN, H.; CHRISTENSEN, N.J.; RASMUSSEN, S.; HOLLNAGEL, H.; DAMKJAER NIELSEN, M.; GIESE, J. The influence of chronic high alcoholintake on blood pressure, plasma noradrenaline concentration and plasma renin concentration. **Clin Sci**; v.61, Suppl 7, p. 377s-379s, 1981.

IIDA, S.; HIKICHI, M.; Effect of taurine on ethanol-induced sleeping time in mice. **J Stud Alcohol.** v.37, p. 19–26, 1976.

ITO, T.; SCHAFFER, S.; AZUMA, J. The effect of taurine on chronic heart failure: actions of taurine against catecholamine and angiotensin II. **Amino Acids.** Jan; v.46, n.1, p.111-119, 2014.

JACOBS, B.L.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F.H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Mol Psychiatry.** May; v.5, n.3, p. 262-269, 2000.

JACOBSEN, J.G.; SMITH, L.H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiol Rev.** v. 48, p. 424–511, 1968.

JANG, M.H.; SHIN, M.C.; JUNG, S.B.; LEE, T.H.; BAHN, G.H.; KWON, Y.K.; KIM, E.H.; KIM, C.J. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. **Neuroreport.**, v.13, n.12, p. 1509-1513, 2002.

JENKINS, J.S.; CONNOLLY, J. Adrenocortical response to ethanol in man. **Br Med J.** Jun 29; v.2, n.5608, p. 804-805, 1968.

JEON, S.H.; LEE, M.Y.; RAHMAN, M.M.; KIM, S.J. The antioxidant, taurine reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced generation of ROS, and activation of MAPKs and Bax in cultured pneumocytes. **Pulm Pharmacol Ther**, v.22, p. 562–566, 2009.

JERNIGAN, T.L.; SCHAFFER, K.; BUTTERS, N.; CERMAK, L.S. Magnetic resonance imaging of alcoholic Korsakoff patients. **Neuropsychopharmacology.** v.4, p.175-186, 1991.

JING, L.; LI, W.M.; ZHOU, L.J.; LI, S.; KOU, J.J.; SONG, J. Expression of renin-angiotensin system and peroxisome proliferator activated receptors in alcoholic cardiomyopathy. **Alcohol Clin Exp Res**; v.32, p. 1999-2007, 2008.

JONG, C.J.; AZUMA, J.; SCHAFFER, S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. **Amino Acids.** Jun; v.42, n. 6, p. 2223-2232, 2012.

KAWANO, Y. Physio-pathological effects of alcohol on the cardiovascular system: its role in hypertension and cardiovascular disease. **Hypertens Res.** Mar; v.33, n.3, p. 181-191, 2010.

KLAMT, F.; SHACTER, E. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. **J Biol Chem.** Jun 3; v.280, n.22, p. 21346-21352, 2005.

KOHASHI, N.; KATORI, R. Decrease of urinary taurine in essential hypertension. **Jpn Heart J.** Jan; v.24, n. 1, p. 91-102, 1983.

KONTNY, E.; RUDNICKA, W.; CHORAZY-MASSALSKA, M.; MARCINKIEWICZ J, MAŚLIŃSKI, W. Taurine chloramine inhibits proliferation of rheumatoid arthritis synoviocytes by triggering a p53-dependent pathway. **Inflamm Res.** Oct; v.55, n.10, p. 446-455, 2006.

KONTRO, P.; OJA, S.S. Co-operativity in sodium-independent taurine binding to brain membranes in the mouse. **Neuroscience.** Nov; v.23, n.2, p.567-570, 1987.

KOO, J.W.; DUMAN, R.S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Jan 15; v.105, n.2, p. 751-756, 2008.

KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **J Neurosci.** v.16, n.6, p. 2027-2033, 1996.

KUROSAWA, M.; SATO, A.; SWENSON, R.S.; TAKAHASHI, Y. Sympatho-adrenal medullary functions in response to intracerebro ventricularly injected corticotropin-releasing factor in anesthetized rats. **Brain Res.** Mar 5; v.367, n.1-2, p. 250-257, 1986.

LAAKSO, M.P.; VAURIO, O.; SAVOLAINEN, L.; REPO, E.; SOININEN, H.; ARONEN, H.J.; TIIHONEN, J. A volumetric MRI study of the hippocampus in type 1 and 2 alcoholism. **Behav Brain Res.** May; v.109, n. 2, p. 177-186, 2000.

LIDLAW, S.A.; GROSVENOR, M.; KOPPLE, J.D. The taurine content of common foodstuffs. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.** v.14, p. 183–188, 1990.

LAMBERT, I.H. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. **Neurochem Res.** v. 29, p.27–63, 2004.

LAMBERT, I. H.; KRISTENSEN, D. M; HOLM, J.B; MORTENSEN, O.H. Physiological role of taurine – from organism to organelle **Acta Physiol**, v.213, p. 191–212, 2015.

LAMBERT, I.H.; HANSEN, D.B. Regulation of taurine transport systems by protein kinase CK2 in mammalian cells. **Cell Physiol Biochem**, v.28, p.1099–1110, 2011.

LARUE-ACHAGIOTIS, C.; POUSSARD, A.M.; LOUIS-SYLVESTRE, J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. **Physiol Behav.** Mar; v.47, n.3, p. 545-548, 1990.

LEON, R.; WU, H.; JIN, Y.; WEI, J.; BUDDHALA, C.; PRENTICE, H.; WU, J.Y. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. **J. Neurosci Res.** Apr; v.87, n.5, p.1185-194, 2009.

LI, Z.; KANG, S.S.; LEE, S.; RIVIER, C. Effect of ethanol on the regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) gene expression. **Mol Cell Neurosci.** Jul; v.29, n.3, p.345-354, 2005.

LIAN, C. L'alcoolisme, cause d'hypertension arterielle. **Bull Acad Med**, v.74, p. 525-528, 1915.

LIU, J.; LIU, L.; CHEN, H. Antenatal taurine supplementation for improving brain ultrastructure in fetal rats with intrauterine growth restriction. **Neuroscience.** May 5; v.181, p. 265-270, 2011.

LV, Q.; DONG, G.; CAO, S.; WU, G.; FENG, Y.; MEI, L.; LIN, S.; YANG, Q.; YANG, J.; HU, J. Effects of Taurine on Blood Index of Hypothalamic Pituitary Adrenal (HPA) Axis of Stress-Induced Hypertensive Rat. **Adv Exp Med Biol.**; v.803, p.613-621, 2015.

MACAIONE, S.; RUGGERI, P.; DE LUCA, F.; TUCCI, G. Free amino acids in developing rat retina. **J Neurochem.** Jun; v.22, n.6, p.887-891, 1974.

MACIEIRA, M.S.; ALMEIDA, W.G.; SILVA, E.A.; SCHENBERG, L.C.; Nakamura-Palacios EM. Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent intake. **Braz J Med Biol Res.** Sep; v.30, 9, p.1107-1111, 1997.

MAGNUSSON, K.R.; CLEMENTS, J.R.; WU, J.Y.; BEITZ, A.J. Colocalization of taurine and cysteine sulfinic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampus of the rat. **Synapse.** v.4, n.1, p.55-69, 1989.

MAIA, A.R.; BATISTA, T.M.; VICTORIO, J.A.; CLERICI, S.P.; DELBIN, M.A.; CARNEIRO, E.M. DAVEL, A.P. Taurine supplementation reduces blood pressure and prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in post-weaning protein-restricted rats. **PLoS One.** Aug 29; v.9, n.8, Article e105851, 2014.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci.**, v.20, n.24, p. 9104-9110, 2000.

MARCHI, K.C.; MUNIZ, J.J.; TIRAPELLI, C.R. Hypertension and chronic ethanol consumption: What do we know after a century of study? **World J Cardiol.** May 26; v.6, n.5, p. 283-294, 2014.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BERETA, J.; BRYNIARSKI, K.; NOWAK, B. Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. **Immunopharmacology.** Jul; v.40, n.1, p. 27-38; 1998.

MARCINKIEWICZ, J.; KONTNY, E. Taurine and inflammatory diseases. **Amino Acids.** Jan; 46(1):7-20, 2014.

MARNELA, K.M., TIMONEN, M.; LAHDESMÄKI, P. Mass spectrometric analyses of brain synaptic peptides containing taurine. **J Neurochem.** v.43, p. 1650–1653, 1984.

MASLIAH, E.; MALLORY, M.; ALFORD, M.; TANAKA, S.; HANSEN, L.A. Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol.** Nov; v.57, n.11, p. 1041-1052, 1998.

MAYAS, M.D.; RAMÍREZ-EXPÓSITO, M.J.; GARCÍA, M.J.; CARRERA, M.P.; COBO, M.; CAMACHO, B.; MARTÍNEZ MARTOS, J.M. Chronic ethanol intake

modifies renin-angiotensin system-regulating aminopeptidase activities in mouse cerebellum. **Neuropeptides**. Apr; v.39, n.2, p. 67-72, 2005.

MAYNARD, M.E.; LEASURE, J.L. Exercise enhances hippocampal recovery following binge ethanol exposure. **PLoS One**. Sep 30; v.8, n.9, Article e76644, 2013.

MENZIE, J.; PAN, C.; PRENTICE, H.; WU J.Y. Taurine and central nervous system disorders. **Amino Acids**. 2014 Jan; v.46, n.1, p. 31-46. DOI: 10.1007/s00726-012-1382-z. Epub 2012 Aug 19.

MIKI, T.; HARRIS, S.J.; WILCE, P.; TAKEUCHI, Y.; BEDI, K.S. Neurons in the hilus region of the rat hippocampus are depleted in number by exposure to alcohol during early postnatal life. **Hippocampus**. v.10, n.3, p. 284-295, 2000.

MILITANTE, J.D.; LOMBARDINI, J.B. Treatment of hypertension with oral taurine: experimental and clinical studies. **Amino Acids**, v.23, n.4, p.381–393, 2002.

MILLER, T.J.; HANSON, R.D.; YANCEY, P.H. Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. Jan; v.125, n.1, p. 45-56, 2000.

MORALES, I.; DOPICO, J.G.; SABATE, M.; GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; RODRIGUEZ, M. Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement. **Am J Physiol Cell Physiol**. May; v.292, n.5, C1934-1941, 2007.

MORRIS, S.A.; EAVES, D.W.; SMITH, A.R.; NIXON, K. Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. **Hippocampus**. May; v.20, n.5, p. 596-607, 2010.

NARDELLI, T.R.; RIBEIRO, R.A.; BALBO, S.L.; VANZELA, E.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; BONFLEUR, M.L. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids**. v.41, n.4, p. 901-918, 2011.

NEUWIRTH, L.S.; VOLPE, N.P.; EL IDRISSE, A. Taurine effects on emotional learning and memory in aged mice: neurochemical alterations and differentiation in auditory cued fear and context conditioning. **Adv Exp Med Biol**. v.775, p.195-214, 2013.

NISHIMURA, N.; UMEDA, C.; ODA, H.; YOKOGOSHI, H. The effect of taurine on the cholesterol metabolism in rats fed diets supplemented with cholestyramine or high amounts of bile acid. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v.49, p. 21–26. 2003.

NIXON, K.; CREWS, F.T. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurochem**. v.83, n.5, p. 1087-1093, 2002.

NIXON, K., CREWS, F.T. Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. **J Neurosci**. Oct 27; v.24, n.43, p. 9714-9722, 2004.

NIXON, K. Alcohol and adult neurogenesis: roles in neurodegeneration and recovery in chronic alcoholism. **Hippocampus**.v.16, n.3, p. 287-295, 2006.

NIXON, K.; KIM, D.H.; POTTS, E.N.; HE, J.; CREWS, F.T. Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: microglia proliferation precedes neurogenesis. **Neurobiol Dis**. Aug; v.31, n.2, p.218-229, 2008.

OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Pharmacology of taurine. **Proc West Pharmacol Soc**. v.50, p. 8-15, 2007.

OKUNO, F.; ARAI, M.; ISHII, H.; SHIGETA, Y.; EBIHARA, Y.; TAKAGI, S.; TSUCHIYA, M. Mild but prolonged elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in alcoholics. **Alcohol**. Nov-Dec; v.3, n.6, p.357-359, 1986.

OLIVEIRA, M.W.S.; MINOTTO, J.B.; DE OLIVEIRA, M.R. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. **Pharm Reports**. v.62, p.185–193, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global alcohol report – Brazil**. 2011. Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/bra.pdf. Acesso em: 28 de agosto de 2016.

OVERTON, J.M.; FISHER, L.A. Central nervous system actions of corticotropin-releasing factor on cardiovascular function in the absence of locomotor activity. **Regul Pept**. Jun-Jul; v.25, n.3, p. 315-324, 1989.

PAULA-LIMA, A.C.; DE FELICE, F.G.; BRITO-MOREIRA, J.; FERREIRA, S.T. Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. **Neuropharmacology**. Dec; v.49, n.8, p. 1140-1148, 2005.

PASANTES-MORALES, H.; MORAN, J.; FELLMAN, J.H. Hypotaurine uptake by the retina. **J Neurosci Res**, v.15, p. 101–109, 1986.

PFEFFERBAUM, A.; SULLIVAN, E.V.; ROSENBLOOM, M.J.; MATHALON, D.H.; LIM, K.O. A controlled study of cortical gray matter and ventricular changes in alcoholic men over a 5-year interval. **Arch Gen Psychiatry**. v.55, n.10, p. 905-912, 1998.

PHAM, K.; NACHER, J.; HOF, P.R.; MCEWEN, B.S. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **Eur J Neurosci**. v.17, n.4, p. 879-886, 2003.

PINTO, Y.M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovasc Res.** v.39, p. 77–88, 1998.

PION, P.D.; KITTLESON, M.D.; ROGERS, Q.R.; MORRIS, J.G. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. **Science.** Aug14; v.237, n.4816, p. 764-768,1987.

PORTERA-CAILLIAU, C.; HEDREEN, J.C.; PRICE, D.L.; KOLIATSOS, V.E. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. **J Neurosci.** v.15, n.5 Pt 2, p. 3775-3787,1995.

POTTER, J.F.; WATSON, R.D.; SKAN, W.; BEEVERS, D.G. The pressor and metabolic effects of alcohol in normotensive subjects. **Hypertension.** Jul; v.8, n.7, p. 625-631,1986.

POZNYAK, V.; SARACENO, B.; OBOT, I.S. Breaking the vicious circle of determinants and consequences of harmful alcohol use. **Bull World Health Organ.** v.83, n.11, p. 803-804, 2005.

PUDDEY, I.B.; ZILKENS, R.R.; CROFT, K.D.; BEILIN, L.J. Alcohol and endothelial function: a brief review. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Dec; v.28, n.12, p.1020-1024, 2001.

QIN, L.; HE, J.; HANES, R.N.; PLUZAREV, O.; HONG, J.S; CREWS, F.T. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. **J Neuroinflammation.** Mar 18; v.5, Article 10, 2008. DOI: 10.1186/1742-2094-5-10. Disponível em: <http://www.jneuroinflammation.com/content/5/1/10>

RESSTEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; DE OLIVEIRA, A.M.; CORRÊA, F.M. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. **Life Sci.** Apr 4; v.78, n.19, p.2179-2187, 2006.

RICE, A.C.; BULLOCK, M.R.; SHELTON, K.L. Chronic ethanol consumption transiently reduces adult neural progenitor cell proliferation. **Brain Res.** v.1011, n.1, p. 94– 98, 2004.

RILEY, J.N.; WALKER, D.W. Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. **Science.** Aug18; v.201, n.4356, p. 646-648, 1978.

RIPPS, H.; SHEN, W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. **Mol Vis.** v.18, p. 2673–2686, 2012.

RIVAS-ARANCIBIA, S.; DORADO-MARTÍNEZ, C.; BORGONIO-PÉREZ, G.; HIRIART-URDANIVIA, M.; VERDUGO-DIAZ, L.; DURÁN-VÁZQUEZ, A.; COLIN-BARANQUE, L.; AVILA-COSTA, MR. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. **Environ Res.** Jan; v.82, n.1, p. 7-17, 2000.

RIVIER, C.; BRUHN, T.; VALE, W. Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). **J Pharmacol Exp Ther.** Apr; v.229, p.1, p. 127-131, 1984.

ROIG-PEREZ, S.; MORETO, M.; FERRER, R. Transepithelial taurine transport in caco-2 cell monolayers. **J Membr Biol.** v.204, p. 85–92, 2005.

ROSENBROCK, H.; BLOCHING, A.; WEISS, C.; BORSINI, F. Partial serotonergic denervation decreases progenitor cell proliferation in the adult rat hippocampus, but has no effect on rat behavior in the forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav.** v.80, n.4, p. 549-556, 2005a.

ROSENBROCK, H.; KOROS, E.; BLOCHING, A.; PODHORNA, J.; BORSINI, F.; Effect of chronic intermittent restraint stress on hippocampal expression of marker proteins for synaptic plasticity and progenitor cell proliferation in rats. **Brain Res.** Apr 8; v.1040, n.1-2, p. 55-63, 2005b.

ROSENWASSER, A.M. Chronobiology of ethanol: animal models. **Alcohol.** Jun; v.49, p.4, p.311-319, 2015.

RUPP, H.; MAISCH, B.; BRILLA, C.G. Drug withdrawal and rebound hypertension: differential action of the central antihypertensive drugs moxonidine and clonidine. **Cardiovasc Drugs Ther.** Jun; v.10, Suppl 1, p. 251-262, 1996.

RUSS, R.; ABDEL-RAHMAN, A.R.; WOOLES, W.R. Role of the sympathetic nervous system in ethanol-induced hypertension in rats. **Alcohol.** Jul-Aug; v.8, n.4, p. 301-307, 1991.

SAKAI, R.; UKAI, W.; SOHMA, H.; HASHIMOTO, E.; YAMAMOTO, M.; IKEDA, H.; SAITO, T. Attenuation of brain derived neurotrophic factor (BDNF) by ethanol and cytoprotective effect of exogenous BDNF against ethanol damage in neuronal cells. **J Neural Transm** (Vienna). Aug; v.112, n. 8, p.1005-1013, 2005.

SASTRY, P.S.; RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. **J. Neurochem.** Jan; v.74, n.1, p.1-20, 2000.

SCABORA, J.E.; DE LIMA, M.C.; LOPES, A.; DE LIMA, I.P.; MESQUITA, F.F.; TORRES, D.B.; BOER, P.A.; GONTIJO, J.A. Impact of taurine supplementation on blood pressure in gestational protein-restricted offspring: Effect on the medial solitary tract nucleus cell numbers, angiotensin receptors, and renal sodium handling. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** Mar; v.16, n.1, p. 47-58, 2015.

SCHOENFELD, T.J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Exp Neurol.** Jan; v.233, n.1, p. 12-21, 2012.

SCHOENFELD, T.J.; GOULD, E. Differential effects of stress and glucocorticoids on adult neurogenesis. **Curr Top Behav Neurosci.**v.15, p.139-164, 2013.

SCHAFFER, S.W.; BALLARD, C.; AZUMA, J. Mechanisms underlying physiological and pharmacological actions of taurine on myocardial calcium transport. **Adv Exp Med Biol.** v.359, p.171-180, 1994.

SHIVARAJ, M.C.; MARCY, G.; LOW, G.; RYU, J.R.; ZHAO, X.; ROSALES, F.J.; GOH, E.L. Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. **PLoS One.** v.7, n.8, e42935, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0042935. Epub 2012 Aug 20.

SHORS, T.J.; MIESEGAES, G.; BEYLIN, A.; ZHAO, M.; RYDEL, T.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature.** Dez. 20-27; v.414, n.6866, p. 938, 2001.

SHRUSTER, A.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Neurogenesis in the aged and neurodegenerative brain. **Apoptosis.** Nov; v.15, n.11, p.1415-1421, 2010.

SILBERMAN, Y.; MATTHEWS, R.T.; WINDER, D.G. A corticotropin releasing factor pathway for ethanol regulation of the ventral tegmental area in the bed nucleus of the striaterminalis. **J Neurosci.** Jan 16; v.33, n.3, p.950-960, 2013.

SMITH, J. Neutrophils, host defence, and inflammation: a double-edged sword. **J Leukoc Biol.** v.56, p.672–686, 1994.

SOARDO, G.; DONNINI, D.; MORETTI, M.; MILOCCO, C.; CATENA, C.; SECHI, L.A. Effects of antihypertensive drugs on alcohol induced functional responses of cultured human endothelial cells. **Hypertens Res.** v.31, p. 345-351, 2008.

SOMMER, W.H.; RIMONDINI, R.; MARQUITZ, M.; LIDSTRÖM, J.; SIEMS, W.E.; BADER, M.; HEILIG, M. Plasticity and impact of the central renin-angiotensin system during development of ethanol dependence. **J Mol Med (Berl).** Oct; v.85, 10, p.1089-1097, 2007.

SORRELL, M.F.; TUMA, D.J. The functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents. **Ann N Y Acad Sci.** v.492, p. 50-62, 1987.

STURMAN, J.A.; GAULL, G.E. Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. **J Neurochem.** Dec; v.25, n.6, p.831-835, 1975.

STURMAN, J.A. Taurine in development. **Physiol Rev.** Jan; v.73,1, p.119-147, 1993.

SULLIVAN, E.V.; MARSH, L. Hippocampal volume deficits in alcoholic Korsakoff's syndrome. **Neurology.** Dec 23; v.61, n.12, p.1716-1719, 2003.

SUN, M.; ZHAO, Y.; GU, Y.; XU, C. Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. **Amino Acids**. May; v.42, n.5, p.1735-1747, 2012.

SUN, Q. Taurine Supplementation Lowers Blood Pressure and Improves Vascular Function in Prehypertension: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Hypertension**. v.67, p. 541-549, 2016.

SUWANICH, A.; WYSS, J.M.; ROYSOMMUTI, S. Taurine supplementation in spontaneously hypertensive rats: Advantages and limitations for human applications. **World J Cardiol**. Nov 26; v.5, n.11, p.404-409, 2013.

TAKASE, L.F. Novos neurônios são gerados no cérebro adulto? **Ciência Hoje**, jan.-fev.; v. 45, n. 267, p.26-31, 2010.

TARANUKHIN, A.G.; SARANSAARI, P.; KIIANMAA, K.; OJA, S.S. Hypoglycemia is one possible mechanism in the combined toxicity of ethanol and taurine. **Adv Exp Med Biol**. v.803, p.305-312, 2015a.

TARANUKHIN, A.G.; SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Janus-faced taurine: protection or toxicity? In: EUROPEAN SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY BIENNIAL CONFERENCE: **Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System**. Tartu, Estonia: Springer Plus, 2015b. v.4, Supl 1, Abstract P47. DOI: 10.1186/2193-1801-4-S1-P47. Disponível em: <http://www.springerplus.com/supplements/4/S1>.

TARANUKHIN, A.G.; SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Lethality of taurine and alcohol coadministration in mice. **Adv Exp Med Biol**. v.776, p. 29-38, 2013.

TARANUKHIN, A.G.; TARANUKHINA, E.Y.; SARANSAARI, P.; PELTO-HUIKKO, M.; PODKLETNOVA, I.M.; OJA, S.S. Taurine protects cerebellar neurons of the external granular layer against ethanol-induced apoptosis in 7-day-old mice. **Amino Acids**. Oct; v.43, n.4, p. 1705-1711, 2012.

TARANUKHIN, A.G.; TARANUKHINA, E.Y.; SARANSAARI, P.; PODKLETNOVA, I.M.; PELTO-HUIKKO, M.; OJA, S.S. Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. **J Biomed Sci**. Aug 24; v.17, Supl. 1, S12, about 11p. 2010.

TATENO, M.; SAITO, T. Biological studies on alcohol-induced neuronal damage. **Psychiatry Investig**. Mar; v.5, n.1, p.21-27, 2008.

TIRAPELLI, C.R.; LEGROS, E.; BROCHU, I.; HONORÉ, J.C.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; DE OLIVEIRA, A.M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Chronic ethanol intake modulates vascular levels of endothelin-1 receptor and enhances the pressor response to endothelin-1 in anaesthetized rats. **Br J Pharmacol**. Jul; v.154, n.5, p.971-981, 2008.

THOMAS, E.L. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: effect of exogenous system on antibacterial action against *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.25, p.110–114, 1979.

TSUJI, A.; TAMAI, I. Sodium- and chloride-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. **Adv Exp Med Biol**. v.403, p.385-391, 1996.

TUNG, A.; TAKASE, L.F.; FORNAL, C.A.; JACOBS, B.L. Effects of sleep deprivation and recovery sleep upon cell proliferation in adult rat dentate gyrus. **Neuroscience**. v.134, n3, p. 721-723, 2005.

URQUHART, N.; PERRY, T.L.; HANSEN, S.; KENNEDY, J. Passage of taurine into adult mammalian brain. **J Neurochem**. v.22, n.5, p.871-872, 1974.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B.R.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.96, n.23, p. 13427-113431, 1999.

VASDEV, S.; MIAN, T.; LONGERICH, L.; PRABHAKARAN, V.; PARAI, S. N-acetyl cysteine attenuates ethanol induced hypertension in rats. **Artery**. v.21, n.6, 312-316, 1995a.

VASDEV, S.; WHALEN, M.; FORD, C.A.; LONGERICH, L.; PRABHAKARAN, V.; PARAI, S. Ethanol- and threonine-induced hypertension in rats: a common mechanism. **Can J Cardiol**. v.11, n.9, p. 807-815, 1995b.

VELOSSA, J.C.R; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Rev. Eletr. Farm**. v. 4, n.2, p. 119-130, 2007.

VIZIOLI, E.O. **Ensaio pré-clínicos de híbridos ftalimídicos e pró-fármacos taurínicos derivados de antiinflamatórios não esteroides**. Tese (Doutorado)-Araraquara: UNESP-FCF, 2009.

VOSS, J.W.; PEDERSEN, S.F.; CHRISTENSEN, S.T.; LAMBERT, I.H. Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. **Eur J Biochem**. v.271, p.4646–4658, 2004.

WALKER, D.W.; BARNES, D.E.; ZORNETZER, S.F.; HUNTER, B.E.; KUBANIS, P. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. **Science**. v.209, n.4457, p.711-713, 1980.

WARSKULAT, U.; FLÖGEL, U.; JACOBY, C.; HARTWIG, H.G.; THEWISSEN, M.; MERX, M.W.; MOLOJAVYI, A.; HELLER-STILB, B.; SCHRADER, J.; HÄUSSINGER, D. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. **FASEB J**. v.18, n.3, p.577-579, 2004.

WATANABE, A.; HOBARA, N.; NAGASHIMA, H. Activation and inhibition of yeast aldehyde dehydrogenase activity by pantethine and its metabolites. **Ann Nutr Metab.** v.30, n.1, p.54-57,1986.

WATANABE, A.; HOBARA, N.; NAGASHIMA, H. Lowering of liver acetaldehyde but not ethanol concentrations by pretreatment with taurine in ethanol-loaded rats. **Experientia.** v.41, n.11, p.1421-1422, 1985.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med.** v.320, p.365–376, 1988.

WEISS, S.J., KLEIN, R., SLIVKA, A.; WEI, M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. **J Clin Invest.** v.70, p.598–607, 1982.

WHO (World Health Organization). **Global status report on alcohol and health.** Geneva: Switzerland, 2014.

WILL, B.; GALANI, R.; KELCHE, C.; ROSENZWEIG, M.R. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). **Prog Neurobiol.** Feb; v.72, n.3, p.167-182, 2004.

WOJNAR, M.; WASILEWSKI, D.; MATSUMOTO, H.; CEDRO, A. Differences in the course of alcohol withdrawal in women and men: a Polish sample. **Alcohol Clin Exp Res.** v.21, n.8, p. 1351-1355, 1997.

WOOD, G.E.; YOUNG, L.T.; REAGAN, L.P.; MCEWEN, B.S. Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats. **Horm Behav.** Jan; v.43, n.1, p. 205-213, 2003.

WRIGHT, C.E., TALLAN, H.H., LIN, Y.Y.; GAULL, G.E. Taurine: biological update. **Annu Rev Biochem.** v.55, p.427–453, 1986.

WU, J.Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **J Biomed Sci.** Aug 24; v.17, Suppl 1, S1 about 6 p., 2010. DOI: 10.1186/1423-0127-17-S1-S1. Disponível em: <http://www.jbiomedsci.com/content/17/S1/S1>

WU, G.; YANG, J.; LIN, S.; FENG, Y.; YANG, Q.; LV, Q.; HU J. Taurine and Chinese traditional medicine accelerate alcohol metabolism in mice. **Adv Exp Med Biol.** v.776, p.21-28, 2013.

WU, J-Y; WU, H; JIN, Y; WEI, J; SHA, D; PRENTICE, H; LEE, H-H; LIN, C-H; LEE, Y-H; YANG, L-L. Mechanism of Neuroprotective Function of Taurine. *In:* J. Azuma et al. (eds.), Taurine 7, Advances in Experimental Medicine and Biology 643, **Adv Exp Med Biol.** v.643, p.169-179, 2009.

XU, Y.J.; ARNEJA, A.S.; TAPPIA, P.S.; DHALLA, N.S. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. **Exp Clin Cardiol.** Summer; v.13, n.2, p.57-65, 2008.

YAMORI, Y.; NARA, Y.; IKEDA, K.; MIZUSHIMA, S. Is taurine a preventive nutritional factor of cardiovascular diseases or just a biological marker of nutrition? **Adv Exp Med Biol.** v.403, p.623-629, 1996.

YAMORI, Y.; TAGUCHI, T.; HAMADA, A.; KUNIMASA, K.; MORI, H.; MORI, M. Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies. **J Biomed Sci.** Aug 24; v.17, Supl 1, p. S1-S6, 2010.

YANG, F.; LUO, J. Endoplasmic Reticulum Stress and Ethanol Neurotoxicity. **Biomolecules.** v.5, n.4, p. 2538-2553, 2015.

YAP, J.J.; TAKASE, L.F.; KOCHMAN, L.J.; FORMAL, C.A.; MICZEK, K.A.; JACOBS, B.L. Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus. **Behav Brain Res.** v.172, n.2, p. 344-350, 2006.

YATES, F.E.; RUSSELL, S.M.; DALLMAN, M.F.; HODGE, G.A.; MCCANN, S.M.; DHARIWAL, A.P. Potentiation by vasopressin of corticotropin release induced by corticotropin-releasing factor. **Endocrinology.** Jan; v.88, n.1, p. 3-15, 1971.

ZHANG, M.; BI, L.F.; FANG, J.H.; SU, X.L.; DA, G.L.; KUWAMORI, T.; KAGAMIMORI, S. Beneficial effects of taurine on serum lipids in overweight or obese non-diabetic subjects. **Amino Acids.** v.26, n.3, p.267-271, 2004.

ZHANG, Y.; LI, D.; LI, H.; HOU, D.; HOU, J. Taurine Pretreatment Prevents Isoflurane-Induced Cognitive Impairment by Inhibiting ER Stress-Mediated Activation of Apoptosis Pathways in the Hippocampus in Aged Rats. **Neurochem Res.** Oct; v.41, n.10, p. 2517-2525, 2016.

ZHAO, X.-H., Dietary protein, amino acids and their relation to health. **Asia Pac. J. Clin.Nutr.** v.3, p.131-134, 1994.

ZOU, J.; CREWS, F.T. Inflammasome-IL-1 β Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis. **Front Neurosci.** v.30, n.6, Article 77, About 16 p., 2012.

ZULLI, A. Taurine in cardiovascular disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v.14, p.57-60, 2011.

ZUNSZAIN, P.A.; ANACKER, C.; CATTANEO, A.; CHOUDHURY, S.; MUSAELYAN, K.; MYINT, A.M.; THURET, S.; PRICE, J.; PARIANTE, C.M. Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology.** v.37, n.4, p.939-949, 2012.

Anexo

7 ANEXO

7.1 Protocolo CEUA

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 72/2015

Interessada: PATRICIA RODELLA

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

Projeto: Estudo do papel protetor da taurina nos sistemas cardiovasculares e nervoso de ratos submetidos ao protocolo de hipertensão induzida pelo consumo de etanol

Parecer nº 11/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 03 de março de 2016, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo do papel protetor da taurina nos sistemas cardiovasculares e nervoso de ratos submetidos ao protocolo de hipertensão induzida pelo consumo de etanol", apresentado pela Pós-graduanda PATRICIA RODELLA, sob orientação da Professora Doutora Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em NOVEMBRO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 09 de março de 2016.


Profa Dra ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA