

47



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

**Efecto del Aminoácido Taurina Sobre la
Acumulación de Fosfato en Terminaciones
Nerviosas Aisladas.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

CARLOS CRUZ FUENTES

México, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSION	26
REFERENCIAS	37

INTRODUCCION

La taurina (ácido 2-amino etano sulfónico), forma parte de la p^oza de aminoácidos libres de numerosos tejidos animales. Sus concentraciones son particularmente elevadas en los tejidos excitables, tales como el corazón, el músculo tanto liso como esquelético, el sistema nervioso y las glándulas de secreción interna. En estos tejidos es uno de los aminoácidos más abundantes, encontrándose en concentraciones que varían desde 1 a 8 mM en el cerebro (1,2), de 20 a 25 mM en el corazón (3), hasta 100 mM en la hipófisis (4). La taurina no forma parte de la estructura de las proteínas, y a excepción de la formación en el hígado del ácido taurocólico no participa en reacciones metabólicas; es por ello que durante mucho tiempo se le consideró como un producto final y relativamente inerte del metabolismo de los aminoácidos azufrados. Sin embargo, como resultado de las investigaciones realizadas durante los últimos diez años, las cuales muestran una multiplicidad de efectos farmacológicos de la taurina en diversos sistemas como el corazón, el músculo y el sistema nervioso, se ha despertado un gran interés por profundizar en los estudios que lleven al conocimiento de su función.

En el sistema nervioso la taurina ejerce una serie de efectos farmacológicos sobre diversas funciones. Se ha demostrado por ejemplo que la administración de taurina produce hipotermia a ratones y ratas, cuando es aplicada por vía intraventricular e intraperitoneal respectivamente (5,6), el mecanismo responsable de este efecto no se conoce, aún cuando parece ser que parte de este efecto es controlado a través

de sistemas serotoninérgicos o colinérgicos en el hipotálamo (7). Asimismo se ha observado que este aminoácido disminuye la fiebre inducida por diversos agentes tales como la endotoxina de Escherichia coli (8), o por la prostaglandina E₁ (9). La taurina cuando es administrada intraperitonealmente en dosis que aumentan su concentración en el hipotálamo, disminuye significativamente la ingesta condicionada de agua y alimento en ratas y ratones, además de reducir la ganancia de peso de ratones genéticamente obesos (10). Por otra parte, se han descrito ciertas propiedades analgésicas de la taurina (11), así como también diversos efectos sobre el control del tono muscular (12,13). Asimismo, las observaciones hechas en el sentido de que en ciertos casos de ataxias el transporte de taurina se encuentra alterado (14), han llevado a considerar la posible participación de este aminoácido en la generación de desórdenes de la coordinación muscular de origen central.

Uno de los efectos farmacológicos de la taurina sobre el sistema nervioso central que más interés ha despertado, ha sido su acción anticonvulsiva. Las primeras observaciones que sugirieron la participación de la taurina en la actividad convulsiva, fueron hechas en 1972 por Van Gelder (15), quien señaló que los niveles de taurina disminuían en los focos epileptógenos humanos en comparación con el tejido circundante, reportando poco tiempo después, que este aminoácido ejercía una acción anticonvulsiva en ratones y gatos con lesiones corticales inducidas por cobalto (16), esta disminución en los niveles de taurina fué observada posteriormente, tanto en focos epileptógenos experimen-

tales inducidos por este metal (17), como en el suero de pacientes epilepticos (18). Estos resultados han llevado a probar la acción anti convulsiva de la taurina en diversos modelos de epilepsia experimental. La taurina ha mostrado tener un notable efecto protector en contra de las convulsiones producidas por ouabaína (19 a 21), pentilte - trazol (22) y estriçnina, así como también en focos epilepticos tanto agudos como crónicos, producidos por la aplicación tópica de alúmina, penicilina (23), cobalto (16,24,25), estriçnina y estrógenos en diversos animales de laboratorio como gatos (26), ratones (18,27), ratas (16,22,24,25 y 27) y aún en el mandril Papio papio (28). Estos resultados con animales de experimentación, han llevado a probar su efecto como antiepileptico en humanos (29 a 35). Los estudios han sido llevados a cabo principalmente con pacientes que no han respondido a la terapia usualmente utilizada. Los resultados obtenidos en general, son muy variables, ya que sólo se han observado modificaciones favorables en un limitado número de pacientes, principalmente en aquellos afectados por epilepsias parciales. El principal problema en la utilización de la taurina como agente terapéutico parece deberse a su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica. Los estudios llevados a cabo con animales experimentales indican que menos del 1% de la taurina cruza la barrera hematoencefálica (34). Es importante señalar, que en los casos en que la taurina ha mostrado ser un eficaz antiepileptico, su efecto, a diferencia de lo que se observa con las drogas antiepilepticas comunmente utilizadas, es el de normalizar en cierta forma las características electroencefalográficas del paciente (32),

asimismo las observaciones que indican que el efecto de la taurina consiste en prevenir la propagación de la actividad convulsiva fuera del foco, apoyan la idea de que su acción anticonvulsivante sea mediada a través de un efecto antidispersor (23,24). El mecanismo responsable de estos efectos de la taurina no se ha esclarecido, entre las diversas posibilidades que se han considerado se mencionan una acción directa sobre la excitabilidad de las membranas, debida quizá a una modificación de la permeabilidad iónica o bien un efecto mediado a través de cambios en el contenido de aminoácidos en el tejido epileptógeno.

La taurina presenta algunas de las propiedades características de los neurotransmisores. Este aminoácido ha probado tener un efecto depresor sobre una gran variedad de sistemas neuronales (36 a 40), acción que parece estar relacionada con un aumento en la conductancia de la membrana que da lugar a una hiperpolarización (37), a través de un incremento en la permeabilidad de la membrana a iones específicos como el potasio y el cloro (38). Sin embargo, este efecto depresor de la taurina es débil, puesto que se necesitan concentraciones comparativamente mayores del mismo, que las que se requieren para observar las mismas acciones con el GABA y la glicina. La presencia de un sistema de captación de alta afinidad localizado en sinaptosomas (41 a 43), el cual es específico y dependiente de sodio y energía (44,45), aunado a su presencia en vesículas sinápticas (46 a 48) son también argumentos en favor de una posible acción como neurotransmisor. Sin embargo, aún cuando su liberación en respuesta a una gran variedad de estímulos de depolarizantes ha sido plenamente probada (49 a 52), esta no parece ser

claramente dependiente de calcio, en contraposición con lo observado con la mayoría de los neurotransmisores conocidos (53,54).

La especificidad de los efectos de la taurina sobre la actividad neuronal no ha podido ser probada hasta la fecha, debido principalmente a la ausencia de antagonistas específicos. Los efectos depresores que la taurina ejerce sobre el tallo cerebral (55) y la médula espinal (36,56), son bloqueados por la estriquina, un antagonista específico de la acción de la glicina, en tanto que en la corteza cerebral y el tálamo es la bicuculina un antagonista reconocido de la acción del GABA, la que bloquea los efectos de la taurina (36,57). Por otra parte no se ha encontrado una relación entre la distribución de la taurina y su posible función, como en los casos de los aminoácidos neurotransmisores ya mencionados, en los cuales existe una correspondencia entre sus máximas concentraciones y los sitios donde la sensibilidad a su respectiva acción fisiológica es mayor.

La localización de la taurina en tejidos excitables, como el tejido contráctil y las glándulas de secreción, además de en el sistema nervioso, han llevado a pensar en la posibilidad de que la taurina este involucrada en un proceso común a todos ellos.

Un gran número de las acciones farmacológicas y fisiológicas de la taurina, se han asociado a una posible interacción de este aminoácido con los movimientos iónicos a través de las membranas biológicas (58); en particular se ha observado que la taurina aumenta el calcio asociado a las mitocondrias de corazón (59) e hígado (60), además de producir una inhibición en la liberación de este catión (61), estos

hechos aunados a la presencia de altas concentraciones de taurina en los tejidos secretor, muscular y nervioso, hacen pensar en la posible participación de la taurina en la regulación de los niveles intracelulares de calcio en el sistema nervioso. Es bien sabido que el calcio desempeña un papel básico en el funcionamiento de los tejidos excitables (62), es por ello que las funciones de contracción, secreción y transmisión nerviosa, implican la existencia de mecanismos muy precisos y eficientes de la regulación de los niveles de calcio intracelular, sin embargo no esta aun claramente definida la forma en que funcionan estos mecanismos. La regulación de los flujos de calcio en las terminales sinápticas parece llevarse a cabo a través de un proceso complejo. En las terminaciones nerviosas, se ha sugerido la existencia de cuando menos dos distintos mecanismos intraterminales involucrados en el mantenimiento y regulación del calcio; uno de estos mecanismos posee propiedades relacionadas con la acumulación de calcio por las mitocondrias, el otro parece encontrarse asociado a la participación del retículo endoplásmico liso (63).

Los estudios previos realizados en terminaciones nerviosas aisladas de cerebro de rata (64), han mostrado la existencia de dos mecanismos distintos relacionados con la acumulación de calcio, los cuales poseen propiedades características. El primero de estos mecanismos funciona a concentraciones bajas de calcio, es estimulado notablemente por la presencia de ATP y no parece ser sensible al efecto de los venenos mitocondriales oligomicina y dinitrofenol, lo cual ha llevado a considerar que este proceso se lleve a cabo en organelos intrasinapto

somales. El segundo mecanismo relacionado con la acumulación de calcio en las terminales nerviosas, se observa a las concentraciones fisiológicas del mismo 2.5 mM, no es sensible a la presencia de ATP, ouabaina o concentraciones depolarizantes de KCL, sin embargo parece depender marcadamente de la presencia de fosfato en el medio de incubación (64). El efecto de este anión sobre el transporte de calcio ha sido descrito en otros sistemas. Asimismo la taurina al ser añadida al medio de incubación produce una disminución en la acumulación de calcio, la cual parece ser ejercida sobre el proceso dependiente de fosfato ya que no se observa en una preparación libre de fosfato exógeno (64). Estas observaciones han abierto la posibilidad de una posible interacción calcio-fosfato, en la vecindad de la membrana del sinaptosoma de tal manera que el efecto de la taurina podría deberse inicialmente a una acción directa sobre el transporte de fosfato, y que a través de ella produciría una modificación subsecuente del transporte de calcio. Esta posibilidad fue explorada en el presente estudio, en el cual se determinó el efecto que produce la taurina sobre el transporte de fosfato, por las terminales nerviosas de cerebro de rata, así como también de caracterizar previamente el sistema de transporte de fosfato, sobre el cual la taurina tiene efecto en virtud de que se ha descrito que este proceso presenta características particulares en distintas estructuras, como en axón, sarcolema, eritrocitos y células de tejido cardíaco.

MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo se utilizaron cerebros de ratas albinas (cepa Wistar) adultas, de 2 a 3 meses de edad, de la colonia local (Centro de Investigaciones en Fisiología Celular).

Separación de terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) de cerebro de rata.

Se obtuvieron por el método de Hajós (65), según el siguiente procedimiento:

El cerebro de una rata (de 90 a 135 g) se homogeneizó en sacarosa 0.32M (10% peso/volumen) a 550 rpm, durante un minuto en un homogeneizador tipo Potter Elvenhjeim de vidrio con pistón de teflón. El homogeneizado se centrifugó a 850 x g durante 10 minutos, obteniéndose un sedimento y un sobrenadante. El sobrenadante fue cuidadosamente recuperado teniendo especial cuidado de no coleccionar la capa viscosa y blanquecina situada alrededor del sedimento. El sedimento correspondiente a la fracción nuclear (P_1), se lavó con el mismo volumen de sacarosa 0.32 M repitiéndose la centrifugación. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se mezclaron y se centrifugaron a 11,000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante correspondiente a la fracción soluble se desechó y el sedimento que corresponde a la fracción sinaptosomal cruda (P_2), se resuspendió en 5 ml de sacarosa 0.32 M. Esta suspensión, se colocó sobre una capa de 20 ml de sacarosa 0.8 M y se centrifugó a 9,000 x g durante 25 minutos.

Durante la centrifugación el tejido se distribuye en tres zonas;

la superior, de un volumen aproximado de 5 ml, corresponde a la fracción de mielina; la media, de un volumen aproximado de 12 a 16 ml, corresponde a la fracción sinaptosomal, y la última, el sedimento, corresponde a la fracción mitocondrial.

La capa de mielina se extrajo con una pipeta Pasteur y se descartó. La fracción sinaptosomal se extrajo también, diluyéndose con agua bidestilada (1:1) con el objeto de restaurar la osmolaridad. Este proceso se llevó a cabo lentamente, en frío y con agitación constante a fin de evitar la lisis de los sinaptosomas por choque osmótico. Esta suspensión se centrifugó a 24,000 x g durante 20 minutos, obteniéndose un sedimento que corresponde a la fracción sinaptosomal purificada. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4° C.

Captación de fosfato. La fracción sinaptosomal se resuspendió en glucosa 0.32 M y se preincubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Algunas alícuotas de 100 μ l de la suspensión que contenían de 0.9 a 1.8 mg de proteína, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos en medio Krebs-bicarbonato, que contenía, $^{32}\text{PO}_4$ (1 μ Ci) y KH_2PO_4 a las concentraciones indicadas en cada experimento en un volumen final de un mililitro. Al término de la incubación se tomaron alícuotas de 0.3 ml, por duplicado, las cuales se centrifugaron durante un minuto en una Microfuga Beckman modelo 152. El sobrenadante se desechó y el sedimento correspondiente se lavó superficialmente con agua fría bidestilada, solubilizándose después con 0.2 ml de NCS (Tissue Solubilizar, Amersham/Searle). La radioactividad incorporada en el tejido se

midió después de la adición de 5 ml de Tritosol (PPO 3 g, Tritón X-100 27 ml, etilenglicol 37 ml, etanol 106 ml y xilol 600 ml, volumen final un litro), en un contador de centelleo Packard para muestras líquidas modelo 2425. Los valores obtenidos de tubos blancos sin tejido, preparados en paralelo para cada una de las condiciones experimentales, fueron restados de los valores de los tubos experimentales.

Con el objeto de caracterizar el transporte de fosfato, sobre el cual tiene efecto la taurina, los sinaptosomas fueron sometidos a distintas condiciones experimentales como por ejemplo, rojo de rutenio, N-etil maleimida etc., y a diferentes medios de incubación. Los detalles se mencionarán en cada uno de los experimentos correspondientes.

Los diferentes medios de incubación que se utilizaron, se prepararon modificando el medio básico Krebs-bicarbonato, según se detalla a continuación.

Medio Krebs-bicarbonato (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.17 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucosa 5.6 mM, NaHCO₃ 25 mM.

- a) Medio sin Calcio. El cloruro de calcio del medio Krebs-bicarbonato se eliminó del medio de incubación.
- b) Medio Krebs-TRIS. Se substituyó el NaHCO₃ por TRIS (hidroximetil amino metano)-HCl pH 7.4 25 mM para mantener el pH .
- c) Medio sin Magnesio. El sulfato de magnesio se eliminó del medio de incubación.
- d) Medio sin Sodio y con bicarbonato de potasio. (I) El cloruro

- de sodio se substituyó por cloruro de colina a la misma osmolaridad y el bicarbonato de sodio por bicarbonato de potasio 25 mM.
- e) Medio sin Sodio y con bicarbonato de potasio (II). El NaCl se substituyó por sacarosa 118 mM y el bicarbonato de sodio por bicarbonato de potasio 25 mM.
- f) Medio sin Cloro. El cloruro de sodio del medio se substituyó por acetato de sodio 118 mM o por isetionato de sodio 118 mM.

Determinación de Proteínas . Se llevó a cabo por el método de Lowry y colaboradores (66), utilizando una curva patrón de albúmina desarrollada paralelamente a los datos experimentales.

RESULTADOS

CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE FOSFATO.

- a) Acumulación de fosfato por los sinaptosomas en un medio Krebs-bicarbonato (KH_2PO_4 , 1.2 mM)

La acumulación de H_3PO_4 por los sinaptosomas fue medida en un medio Krebs-bicarbonato, conteniendo KH_2PO_4 a una concentración de 1.2 mM. La incubación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C sin agitar durante 10 minutos.

El transporte de fosfato por los sinaptosomas mostró ser un proceso dependiente de la cantidad de proteína sinaptosomal presente en la mezcla de incubación, en el rango utilizado para nuestros experimentos (0 a 700 μg) (Fig. 1).

- b) Efecto de la concentración de KH_2PO_4 en el medio sobre la acumulación de H_3PO_4 .

Con el objeto de mostrar la cinética del transporte de fosfato por los sinaptosomas, éstos fueron incubados en el medio básico Krebs-bicarbonato el cual contenía diferentes concentraciones de KH_2PO_4 desde 0.1 mM hasta 6 mM.

La curva de acumulación de H_3PO_4 por los sinaptosomas a diferentes concentraciones de sustrato (Fig. 2), se observó que consta de dos componentes. En la primera fase del proceso se obtiene un aumento gradual en la acumulación a medida que se incrementaron las concentraciones de KH_2PO_4

Fig. 1 Acumulación de fosfatos por terminaciones nerviosas aisladas de cerebro de rata en función de la concentración de proteína.

La incubación se llevó a cabo durante 10 minutos a 25°C en un medio Krebs- bicarbonato, pH 7.4, que contenía KH_2PO_4 1.2 mM y 1 μCi de $^{32}\text{PO}_4$, en un volumen final de un mililitro. Cada punto representa el promedio \pm el error estandar de 4 experimentos separados.

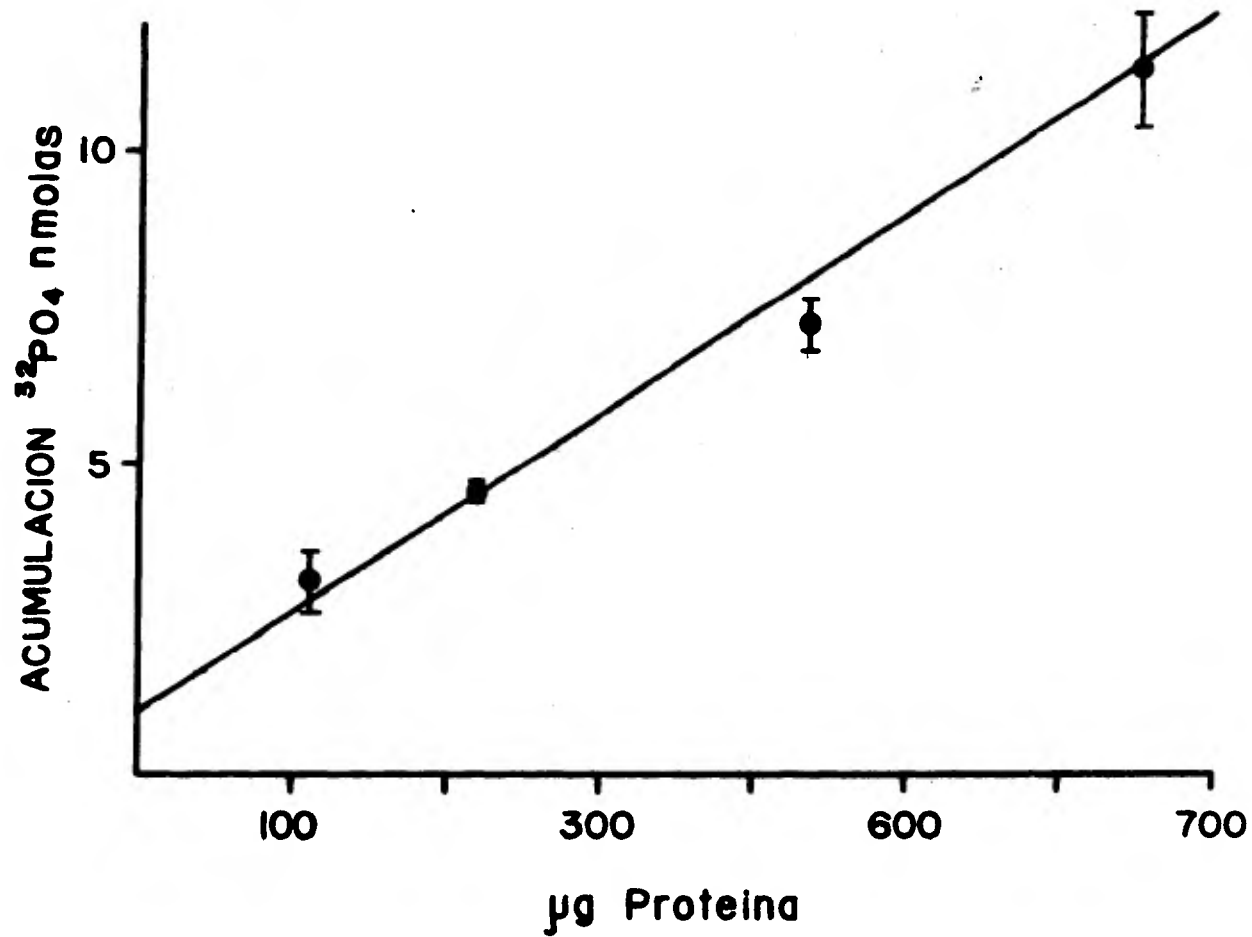
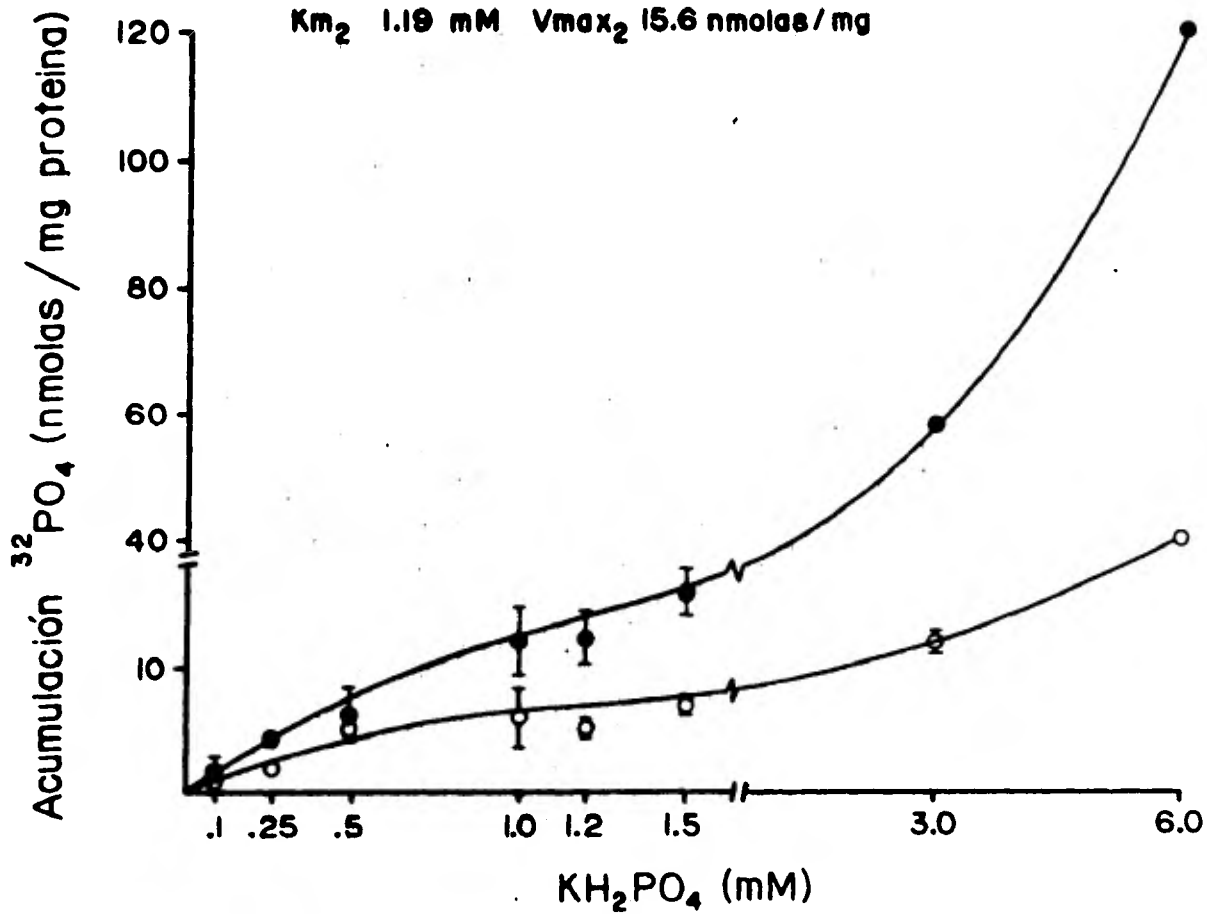


Fig. 2 Efecto de la taurina 25 mM sobre la captación de $^{32}\text{PO}_4$ en presencia de diferentes concentraciones de KH_2PO_4 . Los sinaptosomas fueron incubados en un medio Krebs-bicarbonato a 25°C , en presencia de $^{32}\text{PO}_4$ (1 $\mu\text{Ci/ml}$) y las concentraciones de KH_2PO_4 indicadas. La taurina a la concentración mencionada estuvo presente durante todo el periodo de incubación. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de por lo menos 4 experimentos separados.

K_{m_1} 25.0 mM V_{max_1} 100 nmolas / mg
 K_{m_2} 12.5 mM V_{max_2} 100 nmolas / mg
 K_{m_2} 1.19 mM V_{max_2} 15.6 nmolas / mg



entre 0.1 y 1.5 mM , hasta alcanzar un nivel cercano al de saturación, a partir de este punto la acumulación volvió a incrementarse y este proceso a parentemente no se saturó con las concentraciones utilizadas.

c) Efecto de inhibidores del transporte de fosfato.

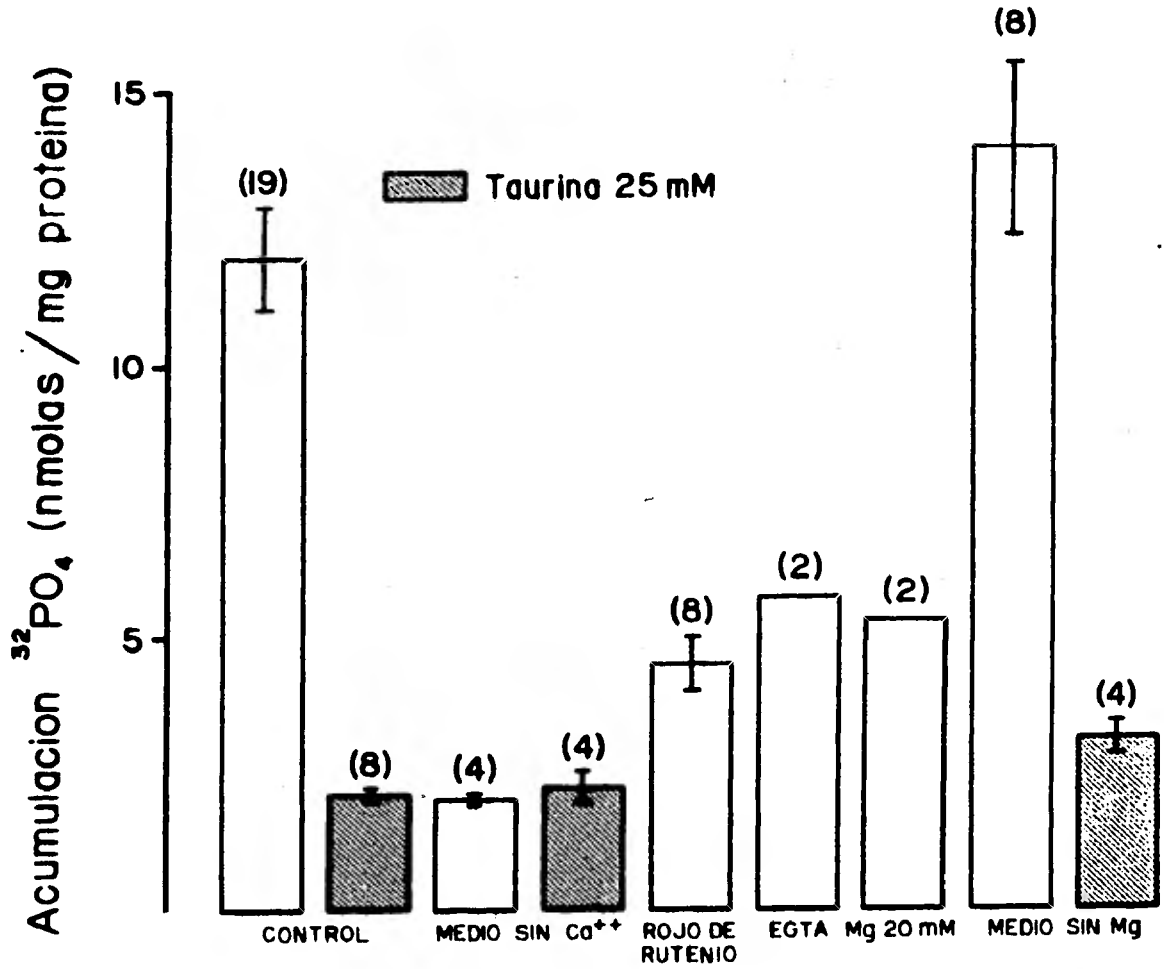
Se probaron diversas condiciones experimentales que se conoce que afectan los movimientos o flujos de fosfato en otros tejidos.

La captación de fosfato por los sinaptosomas no fue estimulada en presencia de ATP en el medio de incubación a concentraciones de 2 mM y 5 mM. Este proceso no fue dependiente de temperatura, observándose los mismos niveles de acumulación a 4°C y a 25°C. La N-etil maleimida , un inhibidor conocido del transporte de fosfato en mitocondrias, produjo un decremento en la captación de alrededor de un 30% cuando se añadió en una concentración de 100 µM. Asimismo la adición de fosfato de piridoxal, un inhibidor del transporte de aniones a través de un acarreador de la membrana, causó un decremento del 73% en la acumulación cuando estuvo presente en el medio de incubación en una concentración de 1 mM.

d) Efecto de iones.

Con el objeto de discriminar si los movimientos de fosfato a través de los sinaptosomas son dirigidos por la existencia de un gradiente de sodio transmembrana o bien a través de un mecanismo de intercambio con otros aniones, se midió el efecto de la ausencia del sodio y/o el cloro sobre la acumulación de fosfato por las terminaciones nerviosas aisladas. Como se observa en la figura 3, la substitución del cloruro de so

Fig. 3 Efecto del cloro y del sodio sobre la captación de fosfato por los sinaptosomas de cerebro completo de rata. La fracción fué incubada en cada caso durante 10 minutos en el medio básico Krebs- bicarbonato modificado según se indica. Las barras representan el promedio \pm el error estandar del número de experimentos indicados entre paréntesis.



dio del medio por cloruro de colina a la misma osmolaridad produjo un aumento del 43% en los niveles de captación con respecto al valor control; la substitución del cloro del medio por acetato de sodio o por el ión no permeante isetionato causó una disminución en la incorporación de fosfato del 37.5% y del 27.5% respectivamente. Cuando el cloruro de sodio fue substituído por sacarosa a una concentración de 118 mM, se observó un marcado aumento en la acumulación, la cual alcanzó un nivel aproximado del 660% (6.6 veces), sobre el valor control en presencia de sodio.

Cuando la fracción de sinaptosomas fue incubada en un medio que contenía TRIS en substitución del bicarbonato de sodio como especie a mortiguadora (Tabla 1), la tasa de acumulación se redujo en un 46.7% con respecto al valor control, sugiriendo una probable interacción entre el fosfato y el bicarbonato bajo estas condiciones.

El efecto de la omisión de calcio sobre el transporte de fosfato por los sinaptosomas (Figura 4), se examinó midiendo este proceso en medios libres de calcio y en presencia de situaciones experimentales que se conoce que bloquean tanto la captación como la unión de calcio a las membranas.

En esta figura, se muestran los resultados obtenidos bajo tales condiciones. Se observó que la omisión del calcio en el medio de incubación, produjo una reducción en la incorporación de fosfato del 83%. La adición de rojo de rutenio, un colorante que se sabe a bajas concentraciones bloquea muy eficazmente la unión del calcio a diversas membranas biológicas, también redujo considerablemente la acumulación de fosfato

Fig. 4 Efecto de la omisión del calcio y de inhibidores de la captación de calcio sobre la acumulación de fosfato por terminaciones nerviosas aisladas de cerebro de rata. Los sinaptosomas fueron incubados en un medio Krebs-bicarbonato que contenía 1 μCi de $^{32}\text{PO}_4$ en un volúmen final de un mililitro y bajo las condiciones que se señalan debajo de cada una de las barras. Los resultados representan el promedio \pm el error estandard del número de experimentos indicados entre paréntesis.

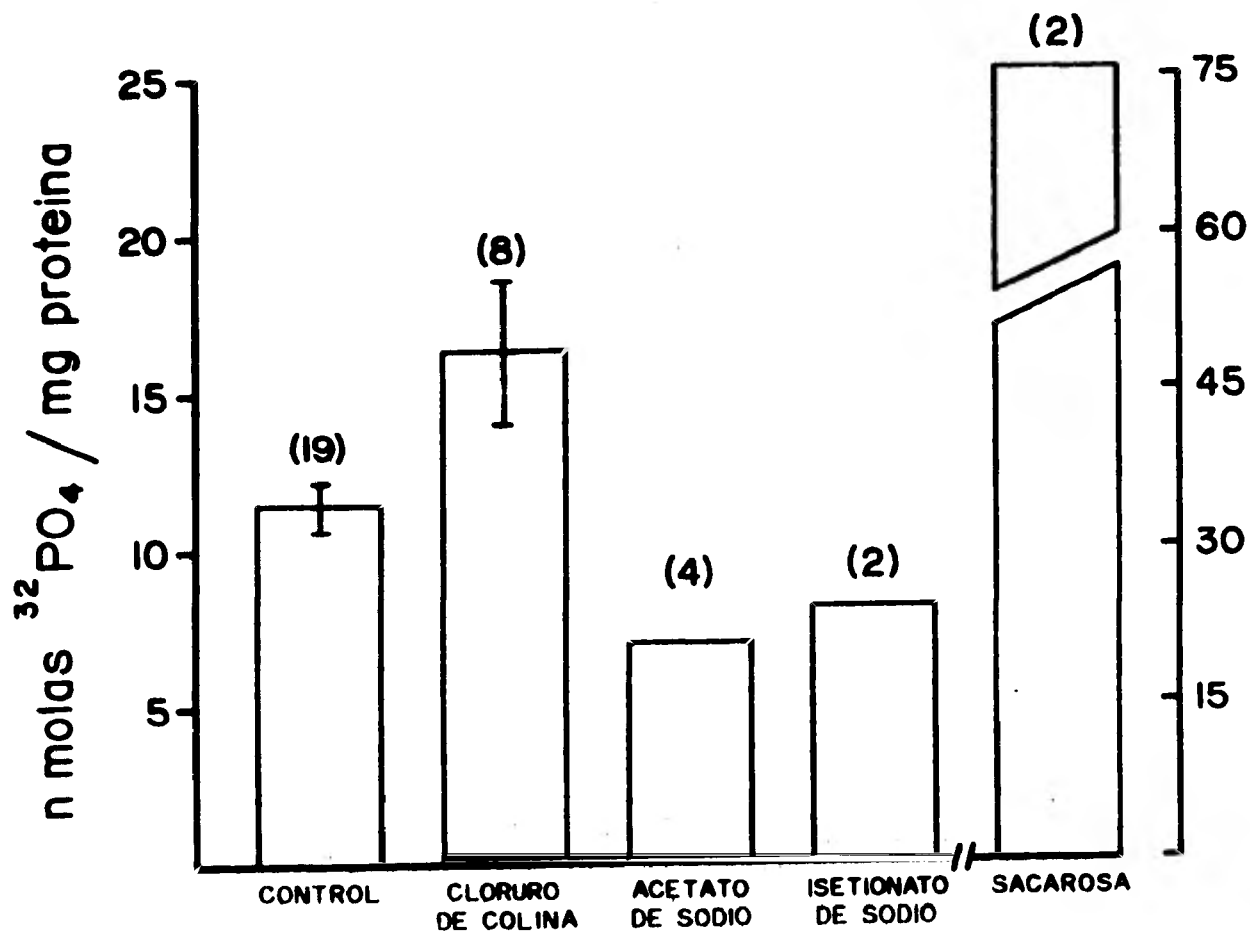


TABLA I

EFFECTO DE LA TAURINA SOBRE LA CAPTACIÓN DE $^{32}\text{PO}_4$ POR SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA

MEDIO	CAPTACIÓN DE $^{32}\text{PO}_4$ (NMOLAS/MG PROTEINA)	
	CONTROL	TAURINA (25 mM)
KREBS-BICARBONATO	11.3 ± 0.9 (19)	5.4 ± 0.5 (19)
KREBS-TRIS	6.1 ± 0.6 (10)	5.9 ± 0.3 (6)

LOS RESULTADOS REPRESENTA EL PROMEDIO ± EL ERROR ESTANDAR DEL NÚMERO DE EXPERIMENTOS INDICADOS ENTRE PARÉNTESIS.

cuando se agregó a la mezcla de incubación en una concentración de 100 μ M. El incremento en la concentración de magnesio de 1 a 20 mM redujo los niveles de acumulación de fosfato en un 39.5%.

Finalmente la adición de EGTA, un poderoso quelante del calcio, produjo igualmente una reducción muy notable en la incorporación de fosfato cuando se añadió en una concentración de 2 mM.

Acumulación de ^{45}Ca dependiente de fosfato.

Con el objeto de correlacionar los resultados mencionados en el párrafo anterior, referentes a la influencia del calcio sobre el transporte de fosfato y en espera de considerar una posible interacción entre estas dos especies iónicas, se juzgó conveniente examinar el proceso complementario, es decir, el de medir la incorporación de ^{45}Ca por los sinaptosomas, dependiente de las concentraciones de fosfato.

La acumulación de ^{45}Ca fue medida en un medio Krebs-bicarbonato, que contenía 2.5 mM de CaCl_2 , variando las concentraciones de KH_2PO_4 del mismo desde 0.1 mM hasta 6 mM.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos bajo tales condiciones.

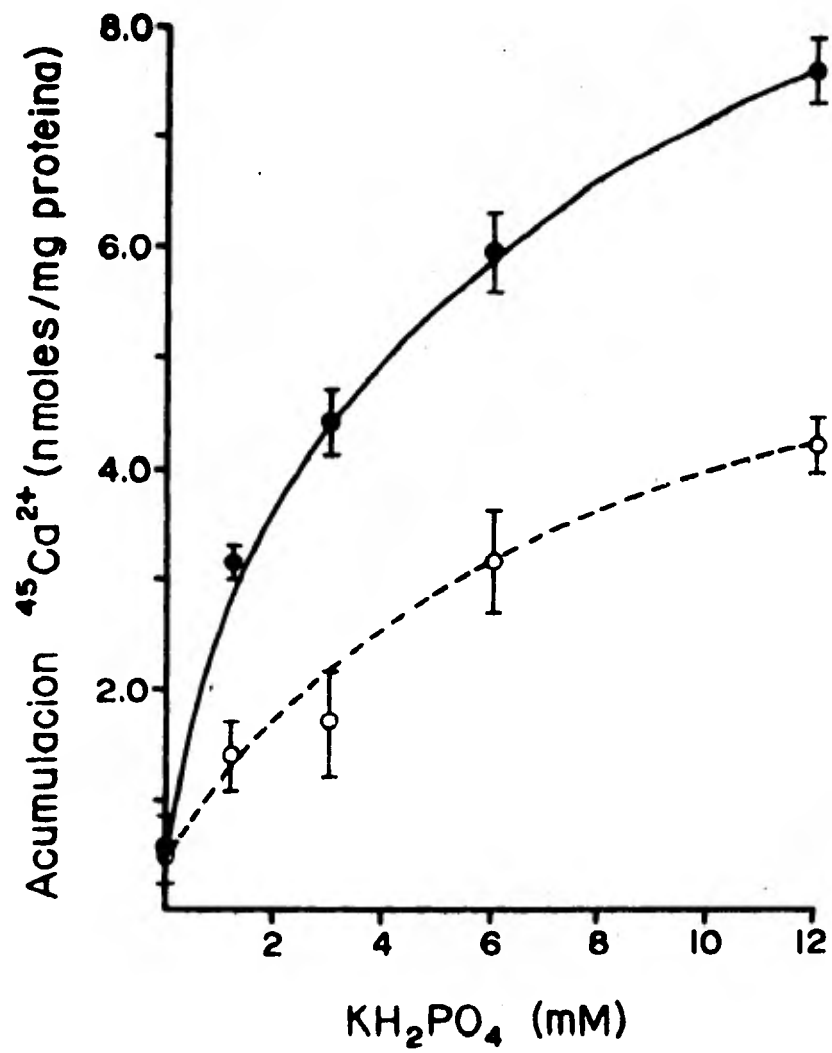
La acumulación de ^{45}Ca por los sinaptosomas mostró ser un proceso dependiente de las concentraciones extracelulares de fosfato, ya que se observa un aumento paralelo al incremento en las concentraciones de este anión en el medio.

Los niveles de captación fueron de 3.3 nmolas/ mg de proteína, a una concentración de 1.2 mM de KH_2PO_4 , alcanzándose un máximo de 5.8 nmolas/ mg cuando las concentraciones de fosfato presentes fueron de 6 mM.

Fig. 5 Efecto de la taurina (25 mM) sobre la acumulación de ^{45}Ca por sinaptosomas de cerebro de rata en presencia de diferentes concentraciones de KH_2PO_4 . Los sinaptosomas fueron incubados durante 5 minutos a 37°C en el medio básico Krebs-bicarbonato, que contenía $0.5 \mu\text{Ci}$ de ^{45}Ca y las concentraciones de fosfato indicadas. Cada punto sobre la gráfica representa el promedio \pm el error estandard.

Control (●—●)

Taurina 25 mM (○---○)



EFFECTO DE LA TAURINA SOBRE LA ACUMULACION DE H_3PO_4

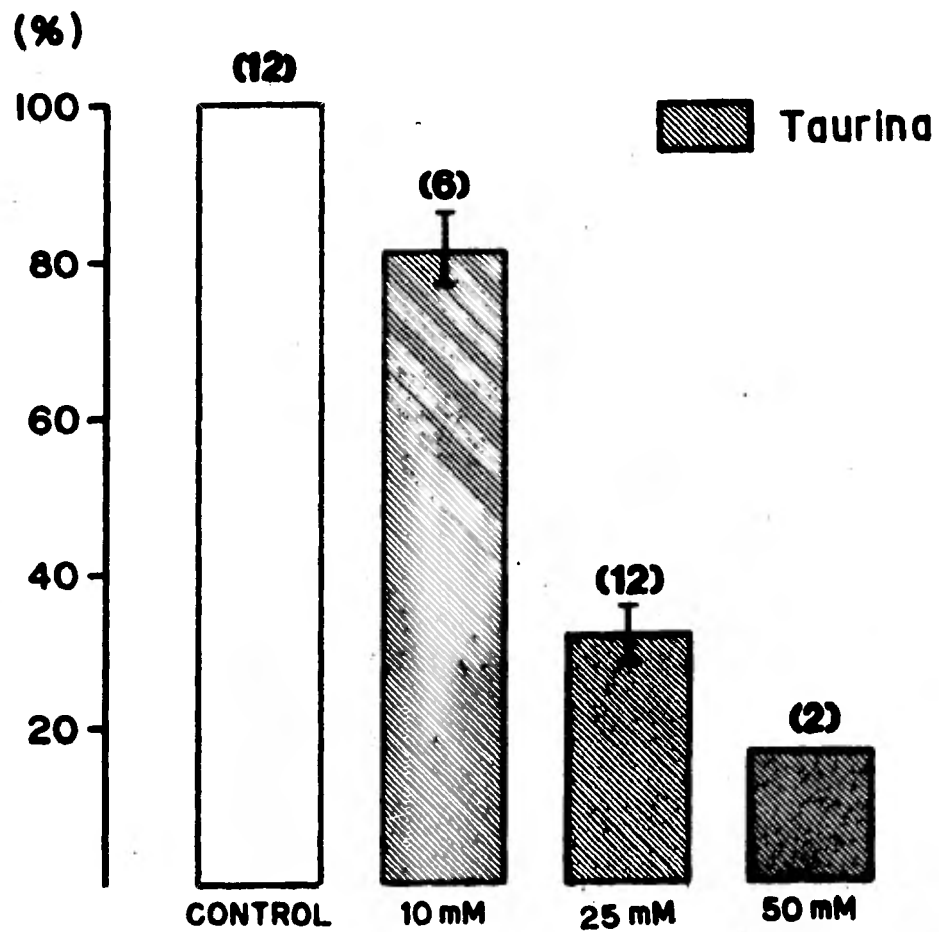
La presencia de taurina a concentraciones de 10, 25 y 50 mM (Fig.6), produjo una inhibición en la captación de fosfato por los sinaptosomas. Este efecto parece ser dependiente de la dosis en el rango examinado; a una concentración de 10 mM la taurina produjo una inhibición del 18.6% con respecto al valor control, a una concentración de 25 mM la taurina produjo una disminución del 68.2% y a 50 mM la inhibición fue del 83.2%

El efecto inhibidor de la taurina a una concentración de 25 mM fue observado consistentemente (Fig. 2), a medida que las concentraciones de fosfato en el medio aumentaron de 0.1 mM a 6 mM, alcanzándose un máximo en la inhibición del 97.9% cuando la concentración de KH_2PO_4 fue de 3.0 mM.

Tomando en consideración que la taurina al ser añadida a la mezcla de reacción disminuye el pH del medio, se probó el efecto producido por este aminoácido a una concentración de 25 mM cuando fue previamente neutralizado al pH de la solución pH 7.4 . Bajo estas condiciones los niveles de acumulación de fosfato se vieron igualmente afectados, lo que sugiere que el efecto inhibitorio producido por la acción del aminoácido taurina no depende únicamente de la alteración en las condiciones del medio sino que deben tomar parte otro tipo de mecanismos.

Cuando los sinaptosomas fueron expuestos en un medio en el cual se substituyó el sodio del medio por colina a la misma osmolaridad, la tau produjo una disminución del 63.8% en la incorporación de fosfato con respecto a la condición control correspondiente. Asimismo la actividad

Fig. 6 Efecto de la taurina a diferentes concentraciones 10, 25 y 50 mM sobre la acumulación de fosfato por terminaciones nerviosas aisladas de cerebro de rata. La altura de las barras representa el porcentaje de captación de $^{32}\text{PO}_4$ en relación al valor control. El tejido se incubó durante 10 minutos a 25°C en un medio Krebs-bicarbonato que contenía $1\ \mu\text{Ci}$ de $^{32}\text{PO}_4$ y taurina a las concentraciones referidas. Los resultados representan el promedio \pm el error estandar del número de experimentos indicados entre paréntesis.



depresora de la taurina parece requerir la presencia de bicarbonato, ya que no se observó cambio alguno en los niveles de inhibición cuando se substituyó el bicarbonato de sodio del medio por TRIS (Tabla 1).

Puesto que se ha mostrado en este estudio que la presencia de calcio en el medio de incubación es una condición indispensable para que se lleve a cabo el proceso acumulativo de fosfato, se estudió el efecto producido por la taurina bajo condiciones que modifican los niveles de calcio externo. Estos resultados se muestran en la Fig. 4. Puede observarse que el efecto inhibitor de la taurina 25 mM se hace notorio a condición de que se encuentre presente calcio disponible. La acción de la taurina en un medio en el cual se ha omitido el calcio produjo un efecto similar al que se observa en un medio con las concentraciones fisiológicas de calcio. Por otra parte la acción inhibitoria que el aminoácido ejerce se ve estimulada en un medio libre de magnesio (Fig. 4), bajo estas circunstancias la inhibición alcanza un valor del 77% con respecto al valor control correspondiente.

Tomando en cuenta estos resultados que sugieren que el efecto de la taurina se lleva a cabo sobre un cotransporte acoplado calcio - fosfato, se examinó el efecto de este aminoácido sobre el transporte de ^{45}Ca a diferentes concentraciones de fosfato externo. La figura 5 muestra que a la concentración fisiológica de calcio externo, es decir 2.5 mM, la captación de ^{45}Ca fue marcadamente dependiente de la presencia de KH_2PO_4 en el medio. La presencia de taurina a una concentración de 25 mM en el medio de incubación, redujo en un 49% la acumulación de calcio radioactivo. Este efecto se hizo más notorio a medida que se incre

mentaron las concentraciones de fosfato externo (Fig. 5). La omisión de fosfato sin embargo, no produjo efecto inhibitorio alguno por parte del aminoácido sobre la acumulación de ^{45}Ca , lo cual confirma la observación mencionada anteriormente en el sentido de que la acción inhibitoria de la taurina se ejerce sobre la acumulación de calcio dependiente de fosfato.

DISCUSION

La ubicuidad de la taurina en los tejidos animales, así como su presencia desde los grupos más elementales de la escala biológica, es indicio de su participación en alguna o algunas de las funciones características de múltiples sistemas; sin embargo poco se sabe hasta la fecha acerca de su posible función. En los últimos años se ha despertado un creciente interés en conocer el probable papel de la taurina en el sistema nervioso central, debido a su posible asociación con los mecanismos que regulan la excitabilidad neuronal. La amplia gama de efectos farmacológicos en los que la taurina se encuentra involucrada, entre los que se destacan su efecto inhibitor sobre neuronas de diversa índole, (36 a 40) así como su acción anticonvulsiva y anti epiléptica en humanos (29 a 35), ha llevado a considerar que este aminoácido pueda ejercer sus efectos a través de un mecanismo básico y común a todos los tejidos en donde se le localiza (67). Entre las diversas posibilidades que se han propuesto, destacan su posible papel como modulador de la excitabilidad membranar (29,18,68), ya sea a través de la disminución en la liberación de otros neurotransmisores, efecto que podría ocurrir por una acción directa sobre la membrana de la célula nerviosa, mediada por un bloqueo en la entrada de calcio a la terminal nerviosa, reduciéndose así los niveles de calcio intranaptosomal disponibles para la liberación de los neurotransmisores y provocando a su vez un incremento en las concentraciones de calcio libre en la vecindad de la membrana, o bien que la taurina podría actuar

como un neuromodulador de las concentraciones intraneuronales de calcio probablemente a través de los mecanismos de retención de calcio por la mitocondria o el retículo endoplásmico liso (61). Los resultados del presente trabajo se discutirán en relación a estas posibilidades.

Existen ciertas bases experimentales que apoyan la hipótesis de una acción de la taurina a través de sus interacciones con el calcio. Observaciones previas de Dolara y colaboradores (69), han demostrado que las acciones producidas por la taurina en el corazón, principalmente su efecto inotrópico positivo así como también los efectos observados sobre el potencial de acción en fibras de Purkinje, pudieran estar relacionadas con modificaciones en los niveles de calcio intracelular inducidas por la taurina, quizá a través de un aumento en la acumulación o retención de calcio, provocando así la formación de una poza de calcio mucho más abundante disponible para la contracción. Izumi y colaboradores (70), por otra parte han demostrado que el efecto protector producido por la taurina en contra de las convulsiones producidas por metrazol, desaparece al inyectar simultáneamente taurina y un quelante de calcio como el EDTA. La taurina asimismo también protege en contra de las convulsiones producidas por la 4 amino-piridina, la cual probablemente causa convulsiones al incrementar la entrada de calcio a la terminal y produce la subsecuente liberación masiva de neurotransmisores.

Se ha sugerido que el transporte de calcio a través de la membra

na plasmática del sinaptosoma involucra varios mecanismos: un intercambio de calcio por sodio independiente de la presencia de ATP, el cual es también capaz de intercambiar calcio por calcio, una captación neta de calcio a través de canales sensibles a voltaje, así como una difusión pasiva de calcio (71). Los estudios previos realizados por Pasantes-Morales y Gamboa (64), han mostrado la existencia de dos mecanismos de acumulación de calcio presentes en las terminales nerviosas aisladas. Uno de estos mecanismos funciona a concentraciones submicromolares de calcio externo y es dependiente de la presencia de ATP. El segundo mecanismo de acumulación de calcio se observa a concentraciones fisiológicas del mismo, es independiente del aporte de energía y requiere de la presencia de fosfato y bicarbonato para su efecto. Esta acción parece ser específica del fosfato pues no se observa cuando es reemplazado por otros aniones como acetato u oxalato. Las propiedades de este proceso acumulativo de calcio sugieren que la incorporación de este ión se lleva a cabo a través de un mecanismo pasivo. Una captación de calcio dependiente de fosfato ha sido observada en mitocondrias de riñón y corazón (72,73), en las cuales el transporte de calcio es estimulado por fosfato únicamente cuando las concentraciones de calcio externo son mayores de 2.5 mM. Se ha sugerido que en estos organelos el fosfato es requerido por los sitios de unión de calcio en el interior de la membrana interna mitocondrial, para aceptar calcio del sitio acarreador.

En el presente estudio se describe una acción inhibitoria de la

taurina dependiente de dosis sobre la entrada de calcio estimulada por fosfato en los sinaptosomas, lo que ha llevado a sugerir la existencia de un mecanismo de difusión calcio-fosfato en esta preparación. Se sabe que compuestos que poseen grupos sulfónicos, como por ejemplo los derivados de los ácidos isotiocianoestilbendisulfónicos (SITS y DIDS) (74), tienen la capacidad de inhibir el transporte de aniones, de tal manera que el efecto de la taurina sobre el transporte de calcio a nivel de la membrana del sinaptosoma, podría situarse a través de una acción primaria sobre los mecanismos de transporte de fosfato.

En el presente trabajo se ha examinado una posible relación entre el calcio y el sistema de transporte de fosfato presente en los sinaptosomas, así como también el efecto que la taurina ejerce sobre este sistema. Se han descrito varios sistemas de transporte de fosfato en diversas preparaciones biológicas. En mitocondrias los movimientos de fosfato se llevan a cabo a través de un gradiente transmembrana de protones (75); sin embargo parece improbable que en las terminales nerviosas el proceso acumulativo de fosfato se lleve a cabo por un mecanismo similar ya que el gradiente mitocondrial de protones se encuentra orientado en dirección inversa con respecto al de la captación de fosfato. El transporte de fosfato en otras células parece estar acoplado a los movimientos de otros iones como el sodio, entre los que se incluyen epitelios intestinales y renales de mamíferos, nervio ciático de conejo (76,77), fibroblastos transformados por el virus SV 40 (78,79), así como también en preparaciones de músculo cardíaco (80).

En estos ejemplos la formación de un gradiente de sodio parece proporcionar la energía necesaria ya sea eléctrica, química o ambas, necesaria para concentrar el fosfato en el interior de las células.

Tratando de identificar el mecanismo de transporte de fosfato presente en los sinaptosomas, se midió la acumulación de este anión en condiciones en donde el sodio del medio fue substituido por colina (Fig. 3). Bajo estas condiciones experimentales, sin embargo, no ocurrió ninguna disminución en el proceso de incorporación de fosfato; por el contrario se produjo un aumento significativo del 43.3% en la acumulación.

La incubación a bajas temperaturas o en presencia de ATP no produjeron efecto alguno sobre la translocación de fosfato por parte de los sinaptosomas, sugiriendo que el proceso se lleva a cabo sin aporte de energía, mecanismo que como se sabe ocurre en una gran diversidad de membranas biológicas entre las que se destaca principalmente la del eritrocito (81). En estas células se ha observado que la inhibición del transporte de fosfato reduce significativamente el transporte pasivo de calcio, lo que ha llevado a sugerir que bajo condiciones fisiológicas, esto es en presencia de bicarbonato, a pH neutro y altas concentraciones externas de calcio, éste entra a los eritrocitos principalmente vía un cotransporte anión-calcio en el cual probablemente se esté utilizando el sistema de transporte aniónico de la membrana (81). Este sistema de transporte se sabe consta de un acarreador conocido como la banda III (82), el cual atraviesa de un lado

a otro la membrana y a través del que se lleva a cabo un intercambio electroneutro anión-anión (83). Se ha descrito que este acarreador prefiere como sustratos al cloro y al bicarbonato y que el mecanismo de transporte es inhibido por diversos agentes como el fosfato de piridoxal y la NAP-aurina (84).

En nuestra preparación observamos que la adición de fosfato de piridoxal (1 mM) redujo la acumulación de fosfato por parte de los sinaptosomas en un 73%, sin embargo en contraposición a lo esperado encontramos que el reemplazo de casi todo el cloro del medio de incubación por acetato o por el ión no permeante isetionato (hidroxietansulfonato) produjo una marcada reducción en los niveles de acumulación de fosfato, disminución que también fue observada cuando se substituyó el bicarbonato de sodio por TRIS como especie amortiguadora. Un efecto interesante fue observado cuando se reemplazó el cloruro de sodio del medio por sacarosa a la misma osmolaridad, pues bajo estas condiciones los niveles de acumulación de fosfato por parte de los sinaptosomas fueron estimulados alrededor de 7 veces con respecto al valor control. Esta respuesta activadora pudiera ser atribuida al surgimiento de un potencial de difusión, de tal manera que el interior de la célula se volviera positivo condicionando de esta forma la entrada de fosfato. Los resultados antes mencionados parecen así descartar la posibilidad de la participación de un acarreador aniónico en la membrana del sinaptosoma, del tipo del que se encuentra en el eritrocito. Se ha hecho patente durante el transcurso de diversos estu-

dios, que la naturaleza y concentración de los aniones presentes en el medio de incubación alteran o modifican el curso seguido por el proceso acumulativo de calcio (85), en particular y como se había mencionado anteriormente se ha mostrado que la acumulación de ^{45}Ca por las terminales nerviosas aisladas requiere de la presencia de fosfato en el medio (64), observación que hemos podido confirmar y extender mostrando que la translocación de calcio en los sinaptosomas es estimulada a medida que se incrementan las concentraciones de fosfato exógeno. Análogamente la acumulación de fosfato en las terminales nerviosas mostró ser marcadamente dependiente de la presencia de calcio en el medio de incubación, ya que la omisión del calcio del medio, produjo una notable reducción en la incorporación de fosfato radioactivo. Estos resultados sugieren la posible presencia de un mecanismo de transporte acoplado calcio-fosfato. Es difícil distinguir, sin embargo, si los cambios observados son debidos a una entrada neta de fosfato a la terminal nerviosa o como resultado de una unión no específica en la vecindad de la membrana. La disminución en la radioactividad observada tanto en presencia de EGTA como bajo condiciones que disminuyen o impiden la interacción del calcio con los componentes de la membrana, tales como la adición del colorante rojo de rutenio o la presencia de altas concentraciones de magnesio, sugieren que la interacción entre el calcio y el fosfato se lleva a cabo en las inmediaciones de la membrana del sinaptosoma, quizá como resultado de la formación previa de complejos o agregados cristaloides. Esta posibilidad

se ve apoyada por el hecho de que el proceso de acumulación de fosfato, no mostró ser un proceso saturable a las concentraciones de sustrato utilizadas, ya que si el transporte de fosfato al interior de los sinaptosomas fuera un proceso mediado, los niveles de acumulación deberían alcanzar un valor saturante a medida que se incrementaran las concentraciones del mismo. La importancia de este tipo de complejos cristaloides ha sido descrita en varias investigaciones, en particular se ha mostrado que la presencia de complejos cristaloides de fosfato de calcio, facilitan extensamente tanto la fusión de vesículas de fosfolípidos (86), como de eritrocitos humanos y que este efecto se debe a la interacción de complejos de fosfato de calcio con los fosfolípidos acídicos de la membrana; se ha descrito que estas reacciones dependen de varios factores como la temperatura, la concentración de las especies iónicas y especialmente del pH observándose los efectos principalmente en el rango de 7.0 a 7.5. Además se ha mostrado que una gran variedad de compuestos biológicos como el ATP o los aminoácidos influyen en la formación de este tipo de complejos (86).

De los resultados del presente trabajo resalta el hecho de que a concentraciones fisiológicas de calcio, la taurina inhibe la acumulación tanto de calcio dependiente de fosfato, como el proceso complementario es decir, la translocación de fosfato dependiente de calcio. Asimismo, los efectos inhibidores del aminoácido no se observan en ausencia de bicarbonato. Sus efectos podrían así situarse como posible alternativa, bajo un efecto disociante sobre la formación de complejos

cristalinos de fosfato y/o bicarbonato de calcio, lo cual podría ser un paso previo en la unión a los sitios acarreadores. En apoyo a esta posibilidad se cuentan nuestras observaciones en el sentido de que en preparaciones libres de células, la taurina muestra un efecto desestabilizante sobre la formación de cristales de fosfato de calcio.

Los resultados presentados en esta discusión apoyan la idea de un papel regulatorio ejercido por la taurina sobre los flujos de calcio en la terminal sináptica, sugerencia que podría hacerse extensiva a todos los tejidos excitables, sin embargo surge la inquietud por conocer si los efectos de la taurina sobre los flujos de calcio y fosfato antes descritos poseen implicaciones fisiológicas, y si también pudieran ser responsables de los efectos farmacológicos descritos para el aminoácido en el sistema nervioso.

Una posible acción de la taurina podría residir en los mecanismos que regulan la participación del calcio en los procesos de excitación y liberación de neurotransmisores; los mecanismos por medio de los cuales la taurina lleva a cabo estas acciones no se ha podido esclarecer aún, sin embargo sobre la base del mismo efecto desestabilizante antes propuesto, podemos especular acerca de los posibles efectos de la taurina en la terminal nerviosa. Se ha descrito que en mitocondrias el fosfato puede activar el transporte de calcio al formar precipitados de fosfato de calcio y de esta forma eliminar el calcio para que la reacción alcance el equilibrio, la taurina al desestabilizar los complejos de calcio y fosfato pudiera proporcionar más fosfato disponi-

ble para el transporte de calcio ya que la presencia de este anión parece ser necesaria para la separación del calcio a sus sitios acarreadores. La taurina actuando de esta manera pudiera contribuir a la disminución de los niveles de calcio intraterminales y por lo tanto a la terminación de los procesos de liberación de neurotransmisores. Otra posibilidad podría referirse a una acción indirecta de la taurina sobre la membrana presináptica de la célula nerviosa a nivel de la fusión de vesículas sinápticas, la taurina al impedir la nucleación o agregación de los complejos cristaloides bloquearía la fusión y subsecuente liberación de las moléculas de neurotransmisor. Asimismo, los efectos anticonvulsivos producidos por la taurina, podrían deberse a un efecto sobre la excitabilidad de la membrana mediada posiblemente a través de una interacción con las propiedades características que tiene el calcio de interactuar con los sitios aniónicos en el exterior de la membrana especialmente con los fosfolípidos acídicos, los cuales parecen ser importantes sitios de unión de este catión (88). Se ha propuesto que la taurina a través de su grupo sulfonato pudiera quelar o movilizar el calcio, sin embargo la interacción entre el calcio y la taurina medida a rangos de pH fisiológico por medio de resonancia magnética nuclear, ha mostrado ser muy débil (89). A pesar de ello no puede excluirse la posibilidad de que la acción de la taurina se vea incrementada por interacciones del grupo amino con las macromoléculas de la membrana y que dichos complejos pudieran secuestrar más fácilmente al calcio al dejar libre el grupo sulfonato. Esta posibilidad ex-

plicaría muchos de los efectos de la taurina, tanto a nivel farmacológico in vivo, como en preparaciones in vitro.

REFERENCIAS

1. Jacobsen, J.G. y Smith, L.L.H. (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivates. Physiol. Rev. 48: 424-511.
2. Collins, G.G.S. (1974) The rate of synthesis, uptake and disappearance of ¹⁴C-taurine in eight areas of the rat central nervous system. Brain Res. 76: 447-449.
3. Kocsis, J.J., Kostos, U.J. y Baskin, S.I. (1976) Taurine levels in the heart tissues of various species. En: R. Huxtable and A. Barbeau (Eds.) Taurine, Raven Press, New York, pp. 145-153.
4. Crabai, F., Sitzia, A. y Pepeu, G. (1964) Taurine concentration in the neurohypophysis of different animal species. J. Neurochem. 23: 1091-1092.
5. Sgaragli, G.P. y Pavan, F. (1972) Effects of aminoacids compounds injected into cerebrospinal fluid spaces on colonic temperature, arterial blood pressure and behaviour of the rat. Neuropharmacology 11: 45-46.
6. Hruska, R.E., Thut, P.D., Huxtable, R. y Bressler, R. (1973) Taurine : Hypothermic effect in mice. Pharmacologist 15: 301
7. Sgaragli, G.P., Pavan, F. y Celli, A. (1975) Is taurine induced hypothermia in the rat mediated by 5-HT? Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 288: 179-184.
8. Lipton, J.M. y Thickner, C.B. (1979) Central effect of taurine and its analogues on fever caused by intravenous leukocytic pyrogen in the rabbit. J. Physiol. 287: 535-543.
9. Sgaragli, G.P. (1978) Effects of taurine on animal behaviour. En: A. Barbeau y R.J. Huxtable (Eds.) Taurine and Neurological Disorders, Raven Press, New York. pp 307-318.
10. Thut, P.D., Hruska, R.E., Huxtable, R.J. y Bressler, R. (1976) Effect of taurine on eating and drinking behaviour. En: R. Huxtable and A. Barbeau (Eds.) Taurine, Raven Press, New York, pp. 357-364.
11. Sugihara, H., Nagasawa, S. y Okabe, H. (1936) Experimentible and Klinische Unterschugen uber Taurin. Klin. Wochensch 15: 751-756.
12. Sgaragli, G.P., Magnani, M., Carla, V. y Giotti, A. (1976) Muscle relaxation induced in the rabbit by intracerebroventricular taurine injection: A supraspinal effect. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 295: 95-97.
13. Sgaragli, G.P. y Pavan, F. (1973) Effects of neutral aminoacids injected into cerebrospinal fluid space on glucose metabolism in the rat brain. Neuropharmacology 12: 653-661.
14. Barbeau, A. (1978) Taurine and Friedreich's Ataxia. En: A. Barbeau y R.J. Huxtable (Eds.) Taurine and Neurological Disorders, Raven Press, New York pp. 429-440.

15. Van Gelder, N.M., Sherwin, A.L. y Rasmussen, T. (1972) Aminoacid content of epileptogenic human brain: focal versus surrounding regions. Brain Res. 40: 385-393.
16. Van Gelder, N.M. (1972) Antagonism by taurine of cobalt induced epilepsy in cat and mouse. Brain Res. 47: 157-168.
17. Craig, C.R. y Hartmann, E.R. (1973) Concentration of aminoacids in the brain of cobalt-epileptic rat. Epilepsia (Amst.) 14: 409-414.
18. Van Gelder, N.M., Sherwin, A.L., Sacks, C. y Anderman, F. (1975) Biochemical observations following administration of taurine to patients with epilepsy. Brain Res. 94: 297-306.
19. Donaldson, J. St. Pierre, T., Minnich, J. y Barbeau, A. (1971) Seizure in rat associated with divalent cation inhibition of Na-K-ATPase. Can. J. Biochem. 49: 1217-1224.
20. Izumi, K., Donaldson, J., Minnich, J.L. y Barbeau, A. (1973) Ouabain induced seizures in rats: Suppressive effects of taurine and - aminobutyric acid. Can. J. Physiol. Pharmacol. 51: 885-889.
21. Tsukada, Y., Inoue, N., Donaldson, J. y Barbeau, A. (1974) Suppressive effects of various aminoacids against ouabain-induced seizure in rats. Can. J. Neurol. Sci. 1: 214-221.
22. Izumi, K. Igisu, H. y Fukuda, T. (1974) Suppression of seizures by taurine specific or non-specific? Brain Res. 76: 171-173.
23. Durelli, L., Mutani, R., Delsedime, M., Quattrocchio, G., Buffa, C., Mazzarion, M. y Fumero, S. (1976) Electroencephalographic and biochemical study of the antiepileptic action of taurine administered by cortical superfusion. Exp. Neurol. 52: 30-39.
24. Mutani, R., Bergamini, L., Fariello, R. y Delsedime, H. (1974) Effects of taurine on cortical acute epileptic foci. Brain Res. 70: 170-173.
25. Joseph, M.H. y Eneson, P.C. (1976) Taurine and cobalt induced epilepsy in the rat: A biochemical and electroencephalographic study. J. Neurochem. 27: 1495-1501.
26. Kaczmarek, L.K. y Adey, W.R. (1974) Factors affecting the release of ¹⁴C-Taurine from cat brain: the electrical effects of taurine on normal and seizure prone cortex. Brain Res. 76: 83-94.
27. Trusby, M.H. y Nevis, A.H. (1974) Anticonvulsant activity of taurine in electrically and osmotically induced seizures in mice and rats. Fed. Proc. 33: 1494-
28. Derouax, M., Puil, E. y Naquet, R. (1973) Antiepileptic effect of taurine in photosensitive epilepsy. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 34:770

29. Barbeau, A. y Donaldson, J. (1974) Zinc, Taurine and epilepsy. Arch. Neurol. 30: 52-58.
30. Sbarbaro, V. (1974) Electroclinical effects of taurine in some epileptic patients. Preliminary results. Acta Neurol. (Napoli) 29: 33-37.
31. Striano, S., Grosso, A., Buscaino, G.A. y Perreti, P. (1974) Primi risultati sugli effetti della taurina nella epilessia umana. Acta Neurol. (Napoli) 29: 537-542.
32. Bergamini, L., Mutani, R., Delseide, M. y Durelli, L. (1974) First clinical experience on the antiepileptic action of taurine. Eur. Neurol. 11: 261-269.
33. Borromei, A., Sacquegna, T. y Coccagna, G. (1975) Use of taurina in continuous partial epilepsy. Observations of a case. Phronesis 17:401-415.
34. Barbeau, A., Tsukada, Y. y Inove, N. (1976) Neuropharmacologic and behavioral effects of taurine. En: R. Huxtable and A. Barbeau (Eds.) Raven Press, New York, pp. 253-266.
35. Takahashi, R., y Nakane, Y. (1978) Clinical trial of taurine in epilepsy En: A. Barbeau and R. Huxtable (Eds.) Taurine and Neurological disorders, Raven Press, New York, pp. 375-386.
36. Curtis, D.R., Hosli, L. y Johnston, G.A.R. (1968) A pharmacological study of the depression of spinal neurons by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res. 6: 1-18.
37. Curtis, D.R., y Tebécis, A.K. (1972) Bicuculline and thalamic inhibition. Exp. Brain Res. 16: 210-218.
38. Curtis, D.R., y Watkins, J. C. (1960) The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. J. Neurochem. 6:117-141.
39. Pasantes-Morales, H., Bonaventure, N., Wioland, N. y Mandel, P. (1973) Effect of intravitreal injections of taurine and GABA on chicken ERG. Int. J. Neurosci. 5: 235-241.
40. Gruener, R. y Bryant, H.J. (1975) Excitability modulation by taurine. Action on axon membrane permeabilities. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194:514-521.
41. Lahdesmaki, P. y Oja, S.S. (1973) On the mechanism of taurine transport at brain cell membranes. J. Neurochem. 20: 1411-1417.
42. Sieghart, W. y Karobath, M. (1974) Evidence for specific synaptosomal localization of exogenous accumulated taurine. J. Neurochem. 23: 911-
43. Schimid, R., Sieghart, W. y Karobath, M. (1975) Taurine uptake in synaptosomal fractions of rat cerebral cortex. J. Neurochem. 25: 5-9.

44. Lombardini, J. B. (1977) High affinity uptake system for taurine in tissue slices and synaptosomal fractions prepared from various regions of the rat central nervous system. Correction of transport data by different experimental procedures. J. Neurochem. 29: 305-312.
45. Hruska, R. E., Huxtable, R. y Yamamura, H. I. (1978) High affinity, Temperature-sensitive and sodium-dependent transport of taurine in rat brain. En: A. Barbeau and R. Huxtable (Eds.) Taurine and Neurological Disorders, Raven Press, New York.
46. De Belleruche, J.S. y Bradford, H. F. (1973) Aminoacids in synaptic vesicles from mamalian cerebral cortex: A reappraisal. J. Neurochem. 21: 441-451.
47. Lahdesmaki, P., Karppinen, A., Saarni, H. y Winter, R. (1977) Aminoacids in the synaptic vesicle fraction from calf brain: Content, uptake and metabolism. Brain Res. 138: 295-308.
48. Kontro, P., Marnela, K.M. y Oja, S.S. (1980) Free amino acids in the synaptosome and synaptic vesicle fractions of different bovine brain areas. Brain Res. 184: 129-141.
49. Hammerstadt, J.P., Murray, J.E. y Cutler, R.W.P. (1971) Efflux of amino acids neurotransmitters from rat spinal cord slices. II Factors influencing the electrically induced efflux of ^{14}C -glycine and ^3H -GABA. Brain Res. 36: 357-367.
50. Kaczmarek, L.K. y Davison, A.N. (1972) Uptake and release of taurine from rat brain slices. J. Neurochem. 19: 2355-2362.
51. Orrego, F., Miranda, R. y Saldade, C. (1978) Electrically induced release of labelled taurine, -and alanine, Glycine, glutamate and others amino acids from rat neocortical slices in vitro. Neuroscience 3: 1069-
52. Collis, G.G.S., y Topiwala, S.H. (1974) The release of ^{14}C -taurine from slices of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium concentration. Proc. B. Pharm. Soc. :451-452.
53. Clark, R.M. y Collins, G.G.S. (1975) The release of endogenous amino acids from the mammalian visual cortex. J. Physiol. (Lond.) 246: 16-
54. Sieghart, W. y Heckl, K. (1976) Potassium evoked release of taurine from synaptosomes fractions of rat cerebral cortex. Brain Res. 116: 538-543.
55. Haas, H.L. y Hosli, L. (1973) The depression of brain stem neurons by taurine and its interaction with strychnine and bicuculline. Brain Res. 52: 399-402.
56. Curtis, D.R., Duggan, A.W. Felix, D., Johnston G.A.R. (1971) Bicuculline an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat. Brain Res., 32: 69-96.
57. Curtis, D.R., Duggan, A.W. Felix, D., Johnston G.A.R. y McLennan, H. (1971) Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. Brain Res. 33: 57-73.

58. Gruener, R., Bryant, H., Markovits, D., Huxtable, R. y Bressler, R. (1976) Ionic Actions of taurine on nerve and muscle membranes: electrophysiologic studies. En: R. Huxtable and A. Barbeau (Eds.) Taurine, Raven Press, New York, pp. 225-242.
59. Dolara, P., Agresti, A., Giotti, A. y Pasquini (1973) Effect of taurine on calcium kinetics of guinea pig heart. Eur. J. Pharmacol. 24: 352-358.
60. Dolara, P., Marino, P. y Buffoni, F. (1973) Effect of 2-amino ethane sulphonic acid (isethionic acid) on calcium transport by liver mitochondria. Biochem. Pharmacol. 22: 2085-2094.
61. Kuriyama, K., Muramatzu, M., Nakagawa, K. y Kakita, K. (1978) Modulating role of taurine of neurotransmitters and calcium transport in excitable tissues. En: A. Barbeau and R.J. Huxtable (Eds.) Taurine and Neurological Disorders, Raven Press, New York, pp. 201-216.
62. Rubin, R.P. (1974) Calcium and Secretory Process. Plenum Press, N. York.
63. Blaunstein, M.P., Ratzlaff, R.W., Kendrick, N.C. y Schwietzer, E.S. (1977) Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. I Evidence for involvement of a nonmitochondrial ATP-dependent sequestration mechanism. J. Gen. Physiol. 72: 15-41.
64. Pasantes-Morales, H. y Gamboa, A. (1980) Effect of taurine on $^{45}\text{Ca}^{++}$ accumulation in rat brain synaptosomes. J. Neurochem. 34: 244-246.
65. Hajós, F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. 93: 485-
66. Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
67. Barbeau, A., Tsukada, Y., y Jnove, N. (1976) Neuropharmacologic and behavioral effects of taurine. En: R. Huxtable and A. Barbeau (Eds.) Taurine Raven Press, New York.
68. Huxtable, R., and Bressler, R. (1973) Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. Biochim. Biophys. Acta. 323: 573-583.
69. Dolara, P., Ledda, F., Mugelli, A., Mantelli, L., Zetelli, L., Franconi, F. y Giotti, A. (1978) Effect of taurine on calcium inotropism, and electrical activity of the heart. En: A. Barbeau and R. J. Huxtable (Eds.) Taurine and Neurological Disorders, Raven Press, New York pp-151-159.
70. Izumi, K., Igisu, H. y Fukuda, T. (1975) Effects of edetate on seizure suppressing actions of taurine and GABA, Brain Res. 88: 576-579.
71. Blaustein, M.P., Ratzlaff, R. W. y Kendrick, N. K. (1978) The regulation of intracellular calcium in presynaptic nerve terminals. En: Calcium Transport and Cell Function. A. Scarpa and E. Carafoli (Eds.) Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 307 pp. 195-212.

72. Vasington, F.D. y Murphy, J.V. (1962) Ca^{2+} uptake in rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem. 237: 2670-2677.
73. Brierley, G.P., Murer, E. y Bachmann, E. (1964) Studies on Ion Transport. III. The accumulation on calcium and inorganic phosphate by heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 105: 89-102.
74. Barzilay, M., Ship, S., Cabantchick, Z.I. (1979) Anion transport in red blood cells. I. Chemical properties of anion recognition sites as revealed by structures-activity relationships on aromatic sulfonic acids. Memb. Biochem. 2: 227-254.
75. Wehrle, J.P. y Pederson, P.L. (1979) Phosphate transport in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 254: 7269-7275.
76. Anner, B., Ferrero, J., Jinourek, P., Jones, G.J., Salamin, A. y Straub, R.W. (1976) Sodium-dependent influx on orthophosphate in mammalian non-myelinated nerve. J. Physiol. 260: 667-686.
77. Ferrero, J., Jinourek, P., Rouiller, M. y Straub, R.W. (1978) Efflux of inorganic phosphate from mammalian non-myelinated nerve fibres. J. Physiol. 282: 507-519.
78. Lever, J.E. (1978) Active phosphate ion transport in plasma membrane vesicles isolated from mouse fibroblasts. J. Biol. Chem. 253: 2081-2084.
79. Hamilton, R.T. y Nielsen-Hamilton, M. (1978) Transport of phosphate in membrane vesicles from mouse fibroblasts transformed by simian virus 40. J. Biol. Chem. 253: 8247-8256.
80. Medina, G. y Illingworth, J. (1980) Some factors affecting phosphate transport in a perfused rat heart preparation. Biochem. J. 188: 297-311.
81. Szász, I., Sardaky, B. y Gárdos, G. (1978) Mechanisms for passive calcium transport in human red cell. Acta Biochim et Biophys. Acad. Sci. Hung. 13: 239-242.
82. Ho, M.K. y Guidotti, G. (1975) A membrane protein from human erythrocytes involved in anion exchange. J. Biol. Chem. 250: 675-683.
83. Gunn, R.B. (1980) Co- and Counter-transport mechanisms in cell membranes. Ann. Rev. Physiol. 42: 249-259.
84. Rothstein, A., Cabantchick, Z.I. y Knauf, P. (1976) Mechanism of anion transport in red blood cells: role of membrane proteins. Fed. Proc. 35: 3-M
85. Waisman, D.M., Gimble, J.M., Goodman, D.B.P. y Rasmussen, H. (1981) Studies of the Ca^{2+} transport mechanism of human erythrocyte inside-out plasma membrane vesicles. II. Stimulation of the Ca-pump by phosphate. J. Biol. Chem. 256: 409-414.

86. Fraley, R., Wilschut, J., Duzgunes, N., Smith, C. y Papahadjopoulos, D. (1980) Studies on the mechanism of membrane fusion: Role of phosphate in promoting calcium ion induced fusion of phospholipid vesicles. Biochemistry 19: 6021-6029.
87. Avnimelech, Y. (1980) Calcium-carbonate-phosphate surface complex in calcareous systems. Nature (lond.) 290: 255-257.
88. Philipson, K.D., Bers, D.M. y Nishimoto, A.Y. (1980) The role of phospholipids in the Ca^{2+} binding of isolated cardiac sarcolemma. J. Mol. Cell Cardiol. 12: 1159-1173.
89. Dolara, P., Franconi, F., Giotti, A., Basoni, R. y Valensin, G. (1978) Taurine - calcium interactions measured by means ^{13}C -nuclear magnetic resonance. Biochem. Pharmacol. 27: 803-804.