

03062
1ej. 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS IÓNICOS IN-
VOLUCRADOS EN LA ACCION ANTICONVULSI-
VA DE LA TAURINA"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

MARIA ELENA ARZATE VALDES

NOVIEMBRE DE 1983

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
NIVELES Y METABOLISMO DE LA TAURINA EN EL SISTEMA NERVIOSO	1
POSIBLES FUNCIONES DE LA TAURINA EN EL SISTEMA NERVIOSO	3
POSIBLES MECANISMOS DE LA ACCIÓN FISIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA DE LA TAURINA	7
4-AMINOPIRIDINA, EFECTOS GENERALES	9
MATERIALES Y METODOS	12
ADMINISTRACION DE DROGAS	12
SEPARACION DE TERMINACIONES NERVIOSAS AISLADAS	12
CAPTACION DE ⁴⁵ Ca EN FRACCION SINAPTOSOMAL	13
CAPTACION DE ³⁵ S-TAURINA EN CORTEZA CEREBRAL DE RATÓN	14
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	14
FIJACION DE CALCIO A LA MEMBRANA SINAPTOSOMAL MONITOREADA POR CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROTETRACICLINA (CTC)	15
CAPTACION DE ³ H-GABA Y ¹⁴ C-GLUTAMATO EN FRACCIÓN SINAPTOSOMAL	15
LIBERACIÓN DE ³ H-GABA Y ¹⁴ C-GLUTAMATO DE FRACCIÓN SINAPTOSOMAL	16
RESULTADOS	17
EFECTO DE LA 4-AMINOPIRIDINA	17

EFFECTO DE LA TAURINA CONTRA LAS CONVULSIONES PRODUCIDAS POR LA 4-AP	17
TRANSPORTE DE ³⁵ S-TAURINA	22
EFFECTO DE GABA Y GLICINA	22
EFFECTO DE TAURINA Y EDTA	25
EFFECTO DE TAURINA Y 4-AP SOBRE LA ACUMULACIÓN DE ⁴⁵ Ca EN FRACCIÓN SINAPTOSOMAL	27
ENSAYOS DE UNIÓN DE CALCIO A LA MEMBRANA SINAPTOSOMAL MONITOREADO POR CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE CTC	27
EFFECTO DE TAURINA Y 4-AP SOBRE LA LIBERACIÓN DE NEURO- TRANSMISORES	31
DISCUSION	36
REFERENCIAS	50

INTRODUCCION

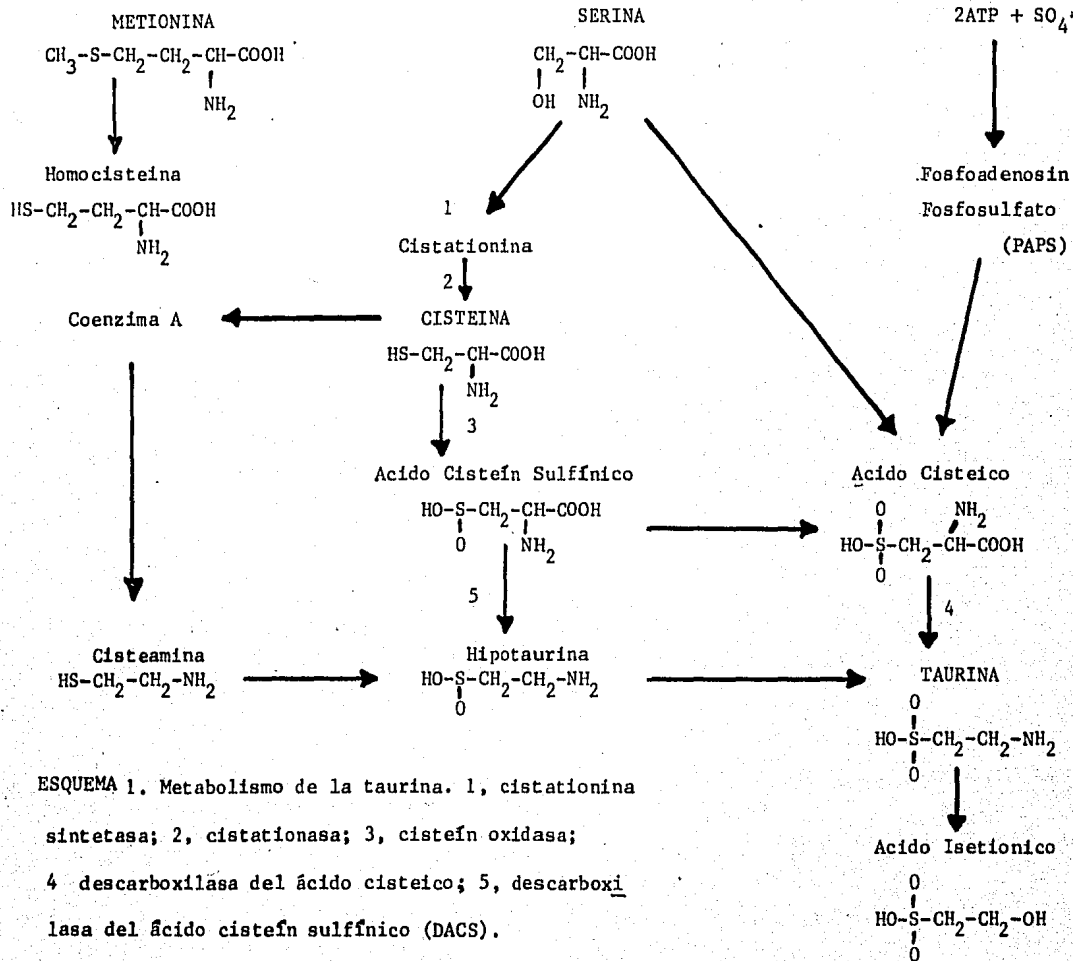
Niveles y Metabolismo de la Taurina en el Sistema Nervioso.

A raíz del descubrimiento de la taurina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$) en la bilis de buey en el año de 1827 (Tiedemann y Gmelin, 1827), su presencia y distribución ha sido demostrada en la mayoría de los tejidos animales (Jacobsen y Smith 1972).

En el sistema nervioso de los mamíferos, la taurina es uno de los constituyentes cuantitativamente más importantes de la poza de aminoácidos libres, cuya concentración solamente es excedida por la del ácido glutámico (Jacobsen y Smith 1972). Los niveles de taurina en el tejido nervioso varían dependiendo de la edad y de la especie, dentro de un rango de 10 a 40 mM. En el sistema nervioso central la distribución de este aminoácido es muy heterogénea. En regiones tales como la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo raquídeo, el cerebelo y el cuerpo estriado, la taurina alcanza concentraciones de 6 a 10 mM (Perry et al, 1971a; Perry et al, 1971b; Shank y Aprison 1970; Guidotti et al, 1972; Collins 1974), mientras que en otras áreas como la médula espinal y el hipotálamo, sus niveles son de 2 a 5 veces menores.

La taurina se encuentra en concentraciones particularmente elevadas no sólo en el sistema nervioso sino también en otros tejidos como en los músculos esquelético, cardíaco y liso, encontrándose también en el bazo, el riñón y la retina, llegando a alcanzar en algunos de ellos en concentraciones de 20 a 100 mM (Jacobsen y Smith 1972; Perry et al, 1971b; Shank y Aprison 1970).

Por lo que se refiere a la síntesis de la taurina, se han propuesto diferentes vías cuya preponderancia relativa puede variar en los diferentes tejidos (Ver Esquema 1). En el sistema nervioso, la vía de síntesis parece ser aquella que se inicia con la oxidación de la cisteína por acción de



ESQUEMA 1. Metabolismo de la taurina. 1, cistationina sintetasas; 2, cistationasa; 3, cisteín oxidasa; 4 descaboxilasa del ácido cisteico; 5, descaboxilasa del ácido cisteín sulfínico (DACS).

la cisteín oxidasa, para formar el ácido cisteín sulfínico; éste a su vez es descarboxilado mediante la descarboxilasa del ácido cisteinsulfínico formando la hipotaurina, la cual por oxidación, forma la taurina (Chatagner y Bergeret 1952; Fromageot et al, 1948). Una dificultad para considerar operativa a esta vía en los tejidos animales, es que la enzima que cataliza el último paso no ha sido identificada. Se han sugerido otras vías de menor importancia y no bien conocidas; una de ellas implica la conversión del ácido cisteinsulfínico en ácido cisteico por deshidrogenación, el cual, a su vez puede ser el sustrato de la descarboxilasa del ácido cisteico, dando lugar directamente a la taurina por deshidrogenación (Fromageot et al, 1948). Se ha observado que la reacción de deshidrogenación antes mencionada ocurre en el cerebro y que esta vía no requiere el paso de la oxidación de la hipotaurina para formar la taurina (Guion-Rain y Chatagner 1972),

Otra vía que ha sido descrita en el corazón de rata y ratón, es la que involucra a la cisteamina como intermediario entre la cisteína y la hipotaurina. Asimismo, se ha propuesto la incorporación directa de sulfato inorgánico para formar el ácido cisteico; sin embargo, los datos experimentales que apoyan la existencia de estas vías alternativas de síntesis son escasos y dispersos (Huxtable y Bressler 1976).

La degradación de la taurina en el sistema nervioso central y en general en todos los tejidos es extremadamente lenta, considerándose, incluso, que este aminoácido es metabólicamente inerte. Se ha descrito la conversión de taurina a ácido isetiónico mediante una reacción de transaminación en el cerebro (Perk y Awapara 1967; Huxtable y Bressler 1972), pero este proceso es demasiado lento para considerarse como una vía funcional de degradación catabólica,

El recambio de las pozas tisulares de taurina, en los animales carnívoros, depende de las velocidades relativas de los procesos de acumulación y eliminación del aminoácido. Así, por ejemplo, el recambio de taurina es rápido en tejidos tales como el hígado, el riñón y las glándulas suprarrenales, mientras que en el cerebro, el corazón y el músculo esquelético este aminoácido posee un recambio lento (Spaeth y Bressler, 1972).

Recientemente se han estudiado los mecanismos que intervienen en el mantenimiento de los niveles de taurina en los diferentes tejidos, Huxtable y colaboradores (Laird, et al, 1980), han demostrado que las principales fuentes para la regulación de los niveles del aminoácido la constituyen tanto incorporada a partir de la dieta (Laird, et al, 1980) como la formada por biosíntesis (Huxtable y Lippincott, 1982). Así, en los tejidos periféricos la aportación de la dieta se ha calculado que es de un 34%, mientras que la obtenida por biosíntesis constituye un 48%; en el cerebro la dieta contribuye con un 50% la biosíntesis con un 41% de los niveles totales de taurina. En estudios llevados a cabo en animales sometidos a una dieta carente de taurina, se ha observado que los niveles del aminoácido se mantienen constantes mediante una disminución en la cantidad de taurina excretada.

Posibles funciones de la taurina en el sistema nervioso.

1) La taurina como neurotransmisor.

En el sistema nervioso central, la taurina presenta efectos depresores generalizados sobre la actividad neuronal; la aplicación iontoforética del aminoácido produce una hiperpolarización en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso (Curtis y Watkins, 1960; Curtis, et al, 1968; Curtis y Tébecis, 1972; Pasantes-Morales, et al, 1973). Los estudios sobre este efecto de la taurina muestran que su acción parece estar relacionada con

modificaciones de la permeabilidad de la membrana del axón al cloro y al potasio (Gruener y Bryant, 1975).

A raíz de la observación de las acciones de la taurina en el sistema nervioso, el aminoácido fue postulado como candidato a neurotransmisor inhibitorio considerando que cumple con algunos de los requisitos necesarios como son:

a) Su presencia, pues como ya se ha mencionado, la concentración de la taurina es alta en el sistema nervioso central y su concentración en vesículas sinápticas es mayor que la de otros aminoácidos (Lahdesmaki et al, 1977; Kontro, et al, 1980; De Belleruche y Bradford, 1973). Además, se han identificado las enzimas necesarias para su síntesis en las terminales nerviosas (Bergeret, et al, 1956).

b) La existencia de un sistema de transporte de alta afinidad, saturable, en diferentes regiones del cerebro, siendo éste dependiente de temperatura, energía y sodio (Lahdesmaki y Oja, 1973; Hruska, et al, 1978).

Este proceso podría representar el mecanismo de inactivación del aminoácido en la sinapsis una vez cumplida su función como mediador químico.

Sin embargo, debido a algunas diferencias y desviaciones en el comportamiento esperado para un neurotransmisor, aunadas a su falta de especificidad en ciertas reacciones, así como a la ausencia de algunas evidencias importantes, se han suscitado serias objeciones acerca de la participación de la taurina como un neurotransmisor, entre las que se podrían citar:

a) El efecto inhibitorio de la actividad neuronal, además de ser muy generalizado, no ha podido considerarse como específico ya que, por ejemplo, en la médula espinal se ve antagonizado por estriquina (Snyder, 1975), y en la corteza cerebral su acción se ve bloqueada por bicuculina (Enna, et al, 1975), sustancias que son conocidas como antagonistas específicos de la acción del GABA y la glicina respectivamente.

- b) Los esfuerzos encaminados a identificar receptores específicos a la taurina han sido infructuosos hasta ahora, aún utilizando técnicas que han detectado los receptores a otros aminoácidos (Haas y Hosli, 1973).
- c) Se sabe que la taurina se libera de diversos tejidos del sistema nervioso bajo estimulación (Hammerstadt, et al, 1971; Kaczmarek y Davison, 1972; Collins y Topiwala, 1974), pero que a diferencia de otros neurotransmisores, la liberación del aminoácido no es claramente dependiente de la presencia de calcio extracelular (Sieghart y Heckl, 1976; Clark y Collins, 1975), y parece al contrario que la liberación de taurina aumenta más aún en ausencia de este ión (Sieghart y Heckl, 1976).

2) La taurina como neuromodulador.

Debido a las inconsistencias mencionadas en relación con una posible función de la taurina como neurotransmisor, se han planteado otras alternativas entre las cuales se ha considerado una acción del aminoácido como neuromodulador de la transmisión sináptica. Esta posibilidad se sugiere debido a su presencia en las terminales nerviosas, a las características de liberación de las mismas y a su acción sobre la membrana postsináptica. Esta acción moduladora podría llevarse a cabo ya sea directamente o bien a través de un efecto sobre la liberación de otros neurotransmisores. A este respecto se ha observado que la taurina disminuye la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina y noradrenalina de sinaptosomas y rebanadas de corteza cerebral (Kuriyama, et al, 1978). Se ha sugerido que esta acción de la taurina podría estar relacionada con su capacidad de modificar las concentraciones intraneuronales de calcio, regulados por la retención de este ión en la mitocondria (Kuriyama, et al, 1978).

3) La taurina como estabilizador de la excitabilidad membranal.

En el sistema nervioso el efecto farmacológico más conocido de la taurina es su acción anticonvulsiva (Tabla 1). Las primeras indicaciones del efec-

TABLA 1. Efecto de Taurina sobre diferentes tipos de epilepsias

TIPO DE EPILEPSIA	ESPECIE	VIA DE ADMINISTRACION DE TAURINA	REFERENCIA
ORIGEN GENETICO			
Espontánea	Gato	Subcutánea/oral	Van Gelder (1978)
	Gato	Subcutánea/oral	Van Gelder (1977)
Fótica	Papio papio	Intraperitoneal	Wada (1975)
	Papio papio	Intraperitoneal	Derouaux (1973)
Audiogénica	Rata	ICV	Laird y Huxtable (1976) (1978) (1978)
Electroshock-intra- cerebral	Rata	Intracolicular-inferior	Laird y Huxtable (1978)
Espásmica	Ratón	Intraperitoneal	Iwata (1979)
FOCOS EPILEPTOGENOS EXPERIMENTALES			
Cobalto	Rata	Superfusión cortical	Mutani (1978) Durelli (1976)
	Gato	Subcutánea	Van Gelder (1972) (1976)
	Gato	Superfusión intraarterial	Durelli (1977) Adembri (1974)
	Ratón	Intraperitoneal	Van Gelder (1972)

(CONTINUACION TABLA 1)

TIPO DE EPILEPSIA	ESPECIE	VIA DE ADMINISTRACION DE TAURINA	REFERENCIA
Penicilina	Rata	Superfusión cortical	Mutani (1978), Durelli (1976)
	Gato	Superfusión cortical	Fariello (1975), Mutani (1977)
	Gato	Intravenosa	Mutani (1974)
Electroshock	Ratón	Intraperitoneal	Thursby y Nevis (1974)
	Rata		Thursby y Nevis (1974)
Bajo calcio	Gato	Superfusión	Kaczmarek y Adey (1974)
Hipoxia	Rata	Intraperitoneal	Sandburg y Willo (1980)
Glutamato monosódico	Rata	Intraperitoneal	Bradford y Dodd (1977)
Estricnina	Gato	Intravenosa	Mutani (1974)
	Conejo	Intravenosa	Roches (1978) (1979)
Pentilentetrazol	Ratón	ICV	Izumi (1975)
Ouabaina	Rata	ICV	Izumi (1973)
			Tsukada (1974)
Estrógenos	Gato	Intravenosa	Mutani (1974) Sbarbaro (1974)

(CONTINUACION TABLA 1)

TIPO DE EPILEPSIA	ESPECIE	VIA DE ADMINISTRACION DE TAURINA	REFERENCIA
Penicilina	Rata	Superfusión cortical	Mutani (1978), Durelli (1976)
	Gato	Superfusión cortical	Fariello (1975), Mutani (1977)
	Gato	Intravenosa	Mutani (1974)
Electroshock	Ratón	Intraperitoneal	Thursby y Nevis (1974)
	Rata		Thursby y Nevis (1974)
Bajo calcio	Gato Superfusión		Kaczmarek y Adey (1974)
Hipoxia	Rata	Intraperitoneal	Sandburg y Willo (1980)
Glutamato monosódico	Rata	Intraperitoneal	Bradford y Dodd (1977)
Estricnina	Gato	Intravenosa	Mutani (1974)
	Conejo	Intravenosa	Roches (1978) (1979)
Pentilentetrazol	Ratón	ICV	Izumi (1975)
Ouabaina	Rata	ICV	Izumi (1973)
			Tsukada (1974)
Estrógenos	Gato	Intravenosa	Mutani (1974) Sbarbaro (1974)

to anticonvulsivo de la taurina provinieron del estudio de Van Gelder, quien observó que los niveles de taurina en focos epileptógenos de cerebro humano eran significativamente menores que en el tejido perifocal (Van Gelder, et al, 1975). Se encontró también una disminución generalizada en los niveles de GABA, ácido aspártico y glicina, medidos en la corteza cerebral de pacientes con epilepsia.

Subsecuentes investigaciones en este sentido han mostrado que las alteraciones en los niveles de aminoácido en los focos epileptógenos producidos por diversos agentes, presentan variación que dependen del modelo experimental estudiado (Emson, 1978). Así, los niveles de glicina se muestran elevados en la corteza de animales tratados con cobalto, mientras que no se encuentran cambios en los niveles de este aminoácido cuando el foco epileptógeno es inducido por penicilina (Perry et al, 1975). Se ha observado en forma consistente que los niveles de ácido glutámico, disminuyen en la mayoría de los casos (Perry, et al, 1975). Los estudios sobre los niveles de taurina son contradictorios, pues se ha reportado que en ratas y ratones tratados con cobalto, los niveles del aminoácido disminuyen, sin embargo, en gatos con el mismo tratamiento los niveles de taurina no cambian o por el contrario, se ven elevados (Fregyensi y Lombardini, 1978). A diferencia de las inconsistencias observadas en este sentido, se han acumulado diversas evidencias a favor de la eficacia de la taurina como agente anticonvulsivo.

La Tabla 1 resume la mayoría de los casos descritos en que se ha probado la acción anticonvulsiva de la taurina con resultados favorables. También se han llevado a cabo estudios con epilepsias en humanos en los que se ha demostrado que la taurina es capaz de disminuir en forma importante las crisis convulsivas en los pacientes tratados con el aminoácido (Sbarbaro, 1974; Striano, et al, 1974; Pasantes-Morales, H. et al, 1981). Existe sin embargo,

un tipo de epilepsia inducida conocida como "kindling" ante la cual la taurina es ineficaz (Wada, et al, 1975; Burnham, et al, 1978; Gaito, 1976). El hecho de que el efecto protector de la taurina se muestre en una gran variedad de estados convulsivos de muy distinta etiología, sugiere que su mecanismo de acción se ejerce mediante una modificación generalizada de la excitabilidad de la membrana neuronal. Esta acción podría efectuarse a través de una serie de efectos ya reportados del aminoácido sobre el transporte de iones como potasio, cloro y calcio (Gruener y Bryant, 1975; Pasantes-Morales, y Gamboa, 1980; Welty, et al, 1982), y probablemente a través de estas acciones, la taurina podría modificar en forma inespecífica la excitabilidad membranal.

Posibles Mecanismos de la Acción Fisiológica y Farmacológica de la Taurina

Existen pruebas en relación con el papel crítico que juega el calcio en la estabilización de las membranas, contribuyendo de manera determinante en el caso de la membrana neuronal, a definir los umbrales de excitabilidad. Los efectos de la taurina sobre el transporte de calcio se han descrito en diversas preparaciones obtenidas de tejidos excitables: en terminaciones nerviosas aisladas (Pasantes-Morales y Gamboa, 1980) fotorreceptores (Pasantes-Morales, et al, 1979), en sarcolema (Huxtable y Bressler, 1973) y en mitocondria de hígado y de corazón (Dolara, et al, 1973; Dolara, et al, 1973a; Welty, et al, 1982) la taurina tiene efectos complejos sobre los flujos de calcio, disminuyendo su acumulación en el primer caso, cuando la concentración extracelular de este ión es semejante a la fisiológica y aumentándola en el segundo, cuando la concentración de calcio externo es muy baja, del orden de la que se encuentra en el citoplasma.

Las propiedades de los mecanismos de transporte de calcio modificados por la taurina sugieren que se trata de un intercambio sodio-calcio en el primer caso, y de un transporte activo en el segundo caso.

Los antecedentes mencionados muestran que la taurina es capaz de modificar los flujos de calcio, por lo que es posible sugerir que el mecanismo de su acción anticonvulsiva se localice a nivel de una modificación con los flujos de calcio, en el sentido de mantener el umbral de excitabilidad de las membranas excitables.

Por otro lado, se sabe que la taurina aumenta la permeabilidad de la membrana a iones como el potasio y el cloro (Gruener y Bryant, 1975), por ello se ha sugerido que su acción anticonvulsiva podría estar dada por una hiperpolarización y consecuentemente una inhibición. Sin embargo, si este fuera el mecanismo de la acción anticonvulsiva de la taurina, otros aminoácidos como el GABA y la glicina, deberían mostrar este mismo efecto, lo cual no ocurre (Izumi, et al, 1975; Izumi, et al, 1973), por esta razón se ha descartado la idea de que el efecto anticonvulsivo de la taurina se deba a una acción inhibidora del aminoácido.

Se ha descrito otra forma a través de la cual la taurina podría interactuar con las membranas excitables, ésta se basa en el conocimiento sobre la capacidad del aminoácido para modificar las propiedades del potencial de acción. Las investigaciones en este sentido indican que la taurina acelera tanto la velocidad de la fase de despolarización como la velocidad de la fase de repolarización, lo que resulta en una marcada aceleración del potencial de acción (Gruener, et al, 1975). Se sugiere que esta acción de la taurina, podría estar mediada a través de incrementar la cinética de la corriente de potasio, actuando directamente sobre los mecanismos de conducción activada (Gruener, et al, 1975).

Tomando en cuenta que el mecanismo de la acción anticonvulsiva de la taurina puede situarse a diferentes niveles, los cuales se encuentran relacionados con procesos básicos de excitabilidad, este trabajo tiene como propósito principal, tratar de encontrar el mecanismo de esta acción an-

convulsivante, buscando su origen en los efectos conocidos del aminoácido sobre los mecanismos de transporte iónico en los tejidos excitables.

En el presente trabajo se eligieron como modelo experimental las convulsiones inducidas por la 4-aminopiridina (4-AP, ya que se ha descrito que esta droga presenta efectos sobre los flujos de potasio y que su mecanismo de acción podría estar mediado a través de las modificaciones de este fármaco sobre los flujos de calcio (Khan y Edman y Edman 1979; Molgo 1978; Lundh 1978; Dolezal y Tucek, 1983; Galvan et al, 1982). Si consideramos como posibles mecanismos de la acción anticonvulsiva de la taurina sus efectos conocidos sobre los flujos de potasio y de calcio (Pasantes-Morales y Gamboa, 1980; Pasantes-Morales et al, 1979; Huxtable y Bressler 1973; Dolara et al, 1973; Dolara et al, 1973b; Welty et al, 1982), el modelo de la 4-AP puede ser adecuado, puesto que presenta acciones antagónicas a las de la taurina precisamente a nivel de flujos iónicos.

4-Aminopiridina. Efectos Generales

Uno de los primeros efectos descritos de la 4-AP es que incrementa la liberación de neurotransmisores en diferentes preparaciones biológicas. Este fármaco, aumenta la liberación de acetilcolina en nervios colinérgicos autónomos (Vizi et al, 1977), incrementa la liberación de nortadrenalina en preparaciones de bazo de gato (Kirperkar, et al, 1979) en vaso deferente de conejo (Johns, et al, 1976), en preparaciones vasculares aisladas (Lander et al, 1977) en sinaptosomas de cerebro (Tapia y Sitges 1982).

En estudios de microscopía electrónica en placa neuromuscular, realizados en el momento de la liberación inducida por un impulso, se muestra un marcado incremento en el número de vesículas sinápticas unidas a sitios de liberación en la terminal presináptica en presencia de la droga (Heuser, 1977).

En el sistema nervioso central de vertebrados, la 4-AP incrementa los reflejos mono y polisinápticos facilitando marcadamente la transmisión tanto

en vías inhibitorias como en vías excitadoras de la médula espinal (Lemeignan, 1972; Lemeignan, 1973; Galindo y Rudomin, 1978). Se ha sugerido que estos efectos se deben a un aumento en la liberación de neurotransmisores inducido por la 4-AP, tal como se ha observado en preparaciones periféricas (Tapia y Sitges, 1982).

En el músculo, la 4-AP aumenta la contractura de fibras musculares esqueléticas de rana y rata, además la velocidad de decaimiento y por lo tanto la duración del potencial de acción del músculo, se ve marcadamente prolongada (Khan y Edman, 1979). Este efecto de la 4-AP tiene las mismas propiedades en músculos cardíaco (Wollmer, et al, 1979; Yanagisawa y Taira, 1979), liso (Leander, et al, 1977) y esquelético (Molgo, 1978).

Por lo que respecta al mecanismo de acción de la 4-AP se ha sugerido, conociendo el requerimiento de calcio extracelular para el proceso de estimulación-liberación en las terminales nerviosas, que esta droga podría aumentar la entrada de calcio a la terminal nerviosa; este efecto podría ser directo sobre los mecanismos de transporte de calcio o subsecuente a sus acciones conocidas sobre el transporte de potasio. Se ha descrito que la 4-AP bloquea los canales de potasio durante la fase de repolarización del potencial de acción (Khan y Edman, 1979; Wollmer et al, 1979; Yanagisawa y Taira, 1979; Molgo, 1978); este efecto del fármaco trae como consecuencia una prolongación de la duración del potencial de acción manteniendo durante más tiempo despolarizada la membrana de la célula nerviosa. Se ha sugerido que a través de estas acciones, la 4-AP podría propiciar una entrada de calcio a la terminal nerviosa, ya que los canales de calcio sensibles a voltaje se ven afectados durante la repolarización. En apoyo a esta suposición, se ha observado que la 4-AP es capaz de antagonizar el bloqueo neuromuscular causado por bloqueadores de la permeabilidad al calcio, como son altas concentraciones de magnesio y por rojo de rutenio, así como el bloqueo neuromus-

cular causado por toxinas botulínicas (Galindo y Rudomin, 1978; Tapid, 1982; Lundh et al, 1977; Illés y Thesleff 1978; Durant, et al, 1982). En este sentido, se ha demostrado que el efecto de la 4-AP tanto sobre la liberación de neurotransmisores así como su efecto sobre la contractura muscular es dependiente de calcio extracelular (Molgó et al, 1977; Lundh et al, -- 1977; Tapia y Sitges 1982; Lamarca y Collier, 1983).

En relación con el mecanismo de la acción convulsiva de la 4-AP, se ha descrito por Galván y colaboradores (1982), que las acciones convulsivas de la 4-AP observadas en rebanas de corteza olfatoria de cobayo, están relacionadas con modificaciones paralelas inducidas por la droga sobre los flujos de calcio y potasio medidos extracelularmente. En la preparación antes mencionada así como en axón calamar (Llinás et al, 1976) y en fibras cardíacas (Van Bogaert y Snyders, 1982) se ha observado que la 4-AP induce actividad espontánea y el fenómeno se acompaña por una fuerte despolarización. Los efectos descritos para la 4-AP, sugieren que la droga induce una modificación directa sobre la excitabilidad de las células nerviosas.

Con los antecedentes mostrados tanto de la taurina como de la 4-AP, se planteó el objetivo principal de este trabajo, el cual es conocer los mecanismos iónicos de la acción anticonvulsivante de la taurina.

El tema se abordó con diferentes enfoques experimentales. El primero incluyó experimentos in vivo, en donde se probó el efecto anticonvulsivante de la taurina contra las convulsiones producidas por la 4-AP. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios in vitro, de carácter bioquímico con el propósito de conocer las interacciones de la taurina y de la 4-AP sobre los flujos de calcio en las membranas excitables. Por último, se hicieron estudios sobre el efecto de ambos compuestos sobre la liberación de neurotransmisores.

MATERIALES Y METODOS

Administración de Drogas

Se utilizaron ratones de 15 a 17 días con un peso entre 5 y 6 g. Los ratones se inyectaron intraperitonealmente, en grupos de seis animales, con taurina, 4-AP, ácido etilendiamino-tetracético (EDTA), GABA y glicina, a los tiempos indicados en cada experimento. Las dosis utilizadas fueron las siguientes: taurina, 2.5 y 1.33 g/kg; GABA y glicina 2.66 g/kg 4-AP 5 mg/kg y EDTA 6 mg/kg.

Separación de terminaciones nerviosas aisladas (sinaptosomas).

Los sinaptosomas de cerebro de rata o ratón fueron obtenidos por el método de Hájos (1975), según el siguiente procedimiento; los animales se sacrificaron por decapitación y el cerebro se homogenizó en sacarosa 0.32 M (10% peso/volumen). El homogeneizado se centrifugó a 900 x g, durante 10 minutos y el sedimento, correspondiente a la fracción nuclear cruda (P_1), se lavó en el mismo volumen de sacarosa y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se mezclaron y centrifugaron durante 20 minutos a 9 000 x g; el sobrenadante 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 con un volumen aproximado de 5 ml, corresponde a la fracción de mielina; la media, con un volumen aproximado de 12 a 16 ml, corresponde a la fracción sinaptosomal, y la última, el sedimento, 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 desechó. Inmediatamente después, se separó la capa que contenía la fracción sinaptosomal y se diluyó lentamente con agua bidestilada (1:1) con el objeto de restaurar la osmolaridad. Este proceso se llevó a cabo en frío y con agitación constante con el 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 correspondiente a la fracción sinaptosomal purificada. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C.

Captación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en fracción sinaptosomal

La fracción sinaptosomal purificada se resuspendió en diferentes volúmenes de glucosa 0.32 M dependiendo de las condiciones experimentales. Se tomaron alícuotas de 100 μl , conteniendo entre 0.7 y 1.0 mg de proteína y se resuspendieron en 1 ml de medio Krebs-bicarbonato (NaCl 118 mM; KCl 4.7 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; MgSO_4 1.17 mM; CaCl_2 2.5 mM; NaHCO_3 25 mM; y glucosa 5.6 mM). La suspensión se incubó durante 5 minutos en un baño con agitación continua mantenido a 37°C. Al inicio de la incubación se añadió $^{45}\text{CaCl}_2$ (2 $\mu\text{Ci/ml}$) al medio, así como taurina y/o 4-AP a diferentes concentraciones las cuales se indican en cada experimento. Inmediatamente después de la incubación se tomaron alícuotas de 0.3 ml y se centrifugaron durante un minuto en una microfuga Beckman. El sedimento se lavó superficialmente con agua destilada y se solubilizó con 0.3 ml de NCS (solubilizador de tejidos, Amersham) y la radioactividad incorporada se midió añadiendo 5 ml de tritosol (PPO 3 g; tritón X 100 257 ml; etilenglicol 37 ml; etanol 106 ml y xilol 600 ml, para un volumen final de un litro).

Con el propósito de excluir el pegado inespecífico de $^{45}\text{CaCl}_2$ se hicieron blancos en paralelo para cada experimento. En éstos, la fracción sinaptosomal se incubó con MgSO_4 (20 mM) ó rojo de rutenio (20 μM); los valores de radioactividad obtenidos bajo estas condiciones se restaron a los de los tubos experimentales en todos los casos. Así, la captación inespecífica es igual a la captación total menos la captación con rojo de rutenio. En todos los ensayos, antes de iniciar cada experimento, los medios se gasearon durante 20 minutos con una mezcla de O_2/CO_2 al 95% hasta llevarlos a un pH de 7.4.

Captación de ^{34}S -taurina en corteza cerebral de ratón (Experimentos *in vivo*)

Se estudiaron 4 grupos de ratones de 12 a 15 días de edad. Cada grupo estaba formado por 4 animales. Los ratones se inyectaron intraperitonealmente con taurina en una dosis de 2.55 g/kg conteniendo 2.5 μCi de ^{35}S -taurina. El primer grupo se sacrificó a los 15 minutos de la inyección, tomándose inmediatamente después una muestra de sangre y de corteza cerebral por duplicado; los siguientes grupos se sacrificaron a los 30, 60 y 90 minutos después de la administración de taurina. Las muestras de sangre se colectaron en tubos conteniendo heparina (400 unidades/ml), y se centrifugaron inmediatamente a 500 x g por 20 minutos para obtener el plasma; se tomaron volúmenes de 0.5 ml de plasma y se les agregaron 0.5 ml de NCS, la mezcla se calentó durante 30 a 40 minutos para solubilizar el tejido. Las muestras de corteza cerebral se pesaron y se solubilizaron con NCS (0.5 ml) y se midió la radioactividad acumulada expresándose los resultados en cpm/mg de tejido.

Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas de las muestras experimentales se determinó

siguiendo el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando una curva patrón de albúmina desarrollada paralelamente a los datos experimentales.

Fijación de calcio a la membrana sinaptosomal monitoreada por cambios en la fluorescencia de la Clorotetraciclina (CTC)

Para los ensayos de unión de calcio a la membrana, se tomaron alícuotas (100 μ l), de la fracción sinaptosomal correspondiente a una concentración de 0.4 a 0.5 mg de proteína /ml. Esta suspensión se diluyó en un medio constituido por sacarosa 310 mM y TRIS-HCl 20 mM a un pH de 7.4. Tanto la CTC como el CaCl_2 se añadieron al medio hasta obtener una concentración final de 25 μ M y 1 mM respectivamente. Los cambios en la fluorescencia inducidos por el calcio, se midieron en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de excitación de 400 nm y de emisión de 520 nm. Con este enfoque experimental, se midieron los efectos inducidos por la taurina (25 mM) y la 4-AP (1 mM) sobre la unión de calcio a la membrana sinaptosomal. La especificidad de esta técnica para el calcio, se comprobó utilizando otros iones como potasio, sodio y magnesio en el mismo medio. Con fines comparativos se llevaron a cabo ensayos en medio Krebs-Bicarbonato.

Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia, considerando que un aumento en fluorescencia es indicativo de una mayor unión de calcio a la membrana y viceversa (Carvalho, 1978).

Captación de ^3H -GABA y ^{14}C -glutamato en fracción sinaptosomal

La fracción sinaptosomal a una concentración de 1.5 mg de proteína/ml se resuspendió y se preincubó durante 10 minutos a 37°C en medio Krebs-bicarbonato, inmediatamente después, se agregó una solución que contenía ^3H -

GABA (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$) y GABA (0.22 μM); la suspensión se incubó por 5 minutos en las mismas condiciones; tanto el medio de incubación como el de superfusión fue suplementado con ácido amino-oxiacético (AAOA) 0.1 mM con el fin de evitar la degradación del GABA.

La captación de ^{14}C -glutamato se llevó a cabo en medio Krebs-bicarbonato en las condiciones de preincubación e incubación descritas anteriormente. El medio de incubación contenía 0.84 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -glutamato y 0.1 mM de ácido glutámico;

Liberación de ^3H -GABA y ^{14}C -glutamato en fracción sinaptosomal

La fracción sinaptosomal incubada previamente con el aminoácido radioactivo correspondiente, se dividió en porciones que contenían aproximadamente 0.145 mg de proteína y se separaron en filtros millipore (0.45 μm) mediante la aplicación de una presión positiva. Los filtros se colocaron en camaritas de superfusión con capacidad de 0.25 ml, a través de los cuales se hizo pasar medio Krebs-bicarbonato durante 10 minutos, utilizando para ello una bomba peristáltica (Buchler) calibrada para dar una velocidad de flujo de 0.6 ml/min. El lavado inicial se hizo con el propósito de eliminar el exceso de radioactividad. Inmediatamente después del lavado, el medio Krebs-bicarbonato se suplementó con 4-AP 200 μM o con 4-AP 200 μM y taurina 25 mM en ensayos paralelos. Asimismo, en algunos ensayos se omitió el CaCl_2 del medio Krebs-bicarbonato y se añadió EGTA 100 μM . Durante la superfusión, se colectaron fracciones cada minuto durante 15 minutos; la radioactividad de éstos, así como la de los filtros, se determinó después de la adición de Tritosol en un contador de centelleo para muestras líquidas Beckman.

Los resultados se expresan como porcentaje de radioactividad liberada, considerándose como el 100% a la radioactividad total acumulada por la fracción sinaptosomal antes de la superfusión.

RESULTADOS

Efecto de la 4-aminopiridina

La 4-aminopiridina (4-AP) induce un cuadro convulsivo característico, con un patrón constante y una secuencia definida en la aparición y en la sintomatología de las convulsiones. Cuando esta droga se administró por vía intraperitoneal, en una dosis de 5 mg/kg, a ratones de 12 a 15 días de edad, se observaron tres diferentes etapas de actividad convulsiva. Inicialmente los animales presentaron temblores generalizados del cuerpo y una rigidez muy característica de la cola. Después de un período de 4 a 7 minutos se observaron los síntomas considerados como convulsiones clónicas, los que se caracterizaron por movimientos bruscos y espasmódicos de las extremidades del animal. La mayoría de los ratones que presentaron este tipo de convulsiones, al cabo de 10 minutos, sufrieron una típica convulsión tónica caracterizada por una rigidez generalizada del cuerpo, con duración aproximada de un minuto. Este tipo de convulsión generalmente precedió a la muerte del animal. Este patrón de desarrollo de la alteración en la excitabilidad de los animales fue notablemente constante, tanto en la manifestación, como en el tiempo de aparición de los diferentes síntomas convulsivos.

Efecto de la Taurina contra las convulsiones producidas por la 4-AP

La dosis inicial de taurina administrada a los animales fue de 1.3 g/kg, la cual se decidió con ayuda de la literatura (Van Gelder N. M 1972); - así, posteriormente, la cantidad administrada de taurina se fue incrementando hasta encontrar la dosis óptima de protección en el modelo de la

4-AP que fue de 2.6 g/kg. La inyección intraperitoneal de taurina administrada 30 minutos antes de la inyección de 4-AP en la dosis mencionada, protegió contra la actividad convulsiva inducida por la droga. El índice de mortalidad provocado por la 4-AP fue de un 80% a 90% de los animales - inyectados; este valor se redujo a un 30% cuando la taurina fue inyectada en una dosis de 2.6 g/kg, mientras que la administración de una dosis menor (1.3 g/kg), no redujo la mortalidad (FIG. 1), ni la frecuencia de convulsiones tónicas ni el tiempo de aparición de convulsiones clónicas.

Otro parámetro estudiado en los grupos de animales fue el tiempo de aparición de convulsiones clónicas. En los animales control, estas alteraciones motoras se presentaron regularmente entre los 4 y los 7 minutos después de la inyección de la droga (FIG. 2). Cuando se administró la taurina en la dosis óptima, 30 minutos antes de la inyección de la 4-AP, se pudo observar un retardo significativo en el inicio de las convulsiones clónicas, presentándose éstas alrededor de los 20 minutos después de la inyección de la 4-AP (FIG 2A). La taurina también fue administrada 15 y 60 minutos antes de la inyección de la 4-AP, observándose en ambos casos que el retraso en la aparición de las convulsiones clónicas fue menor (FIG 2B,C).

Se midió también el efecto de la taurina sobre el número de convulsiones tónicas, las cuales generalmente precedían a la muerte del animal. En este caso, nuevamente se observó que la inyección de taurina administrada 30 minutos antes de la inyección de 4-AP, en las dosis indicadas, redujo por centualmente el número de este tipo de convulsiones de un 90% a un 30%, como se muestra en la figura 3A. Tal como se había observado para los - otros parámetros estudiados, cuando la inyección de taurina fue 15 o 60 - minutos antes de la administración de la 4-AP, su efecto protector contra el número de convulsiones tónicas fue menor (FIG 3B, C).

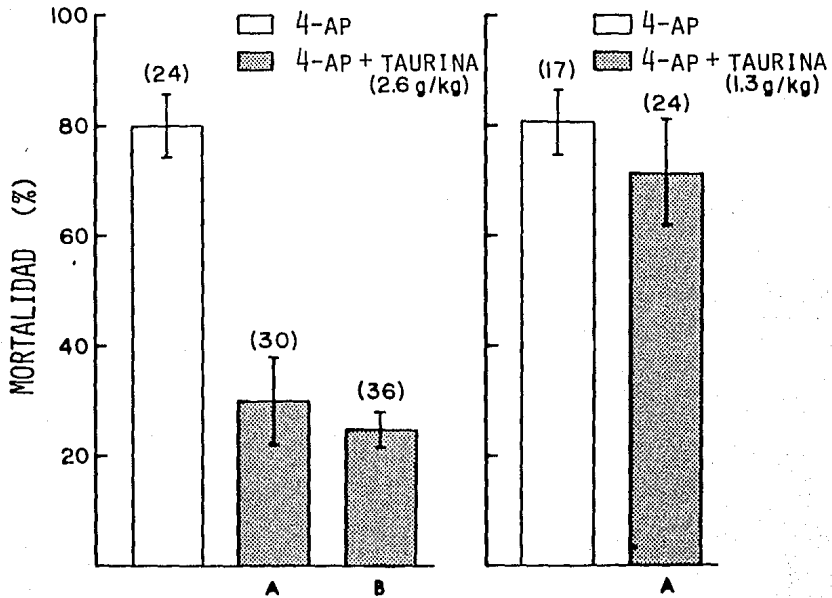


FIGURA 1 Efecto de taurina sobre la mortalidad de los animales inducida por 4-aminopiridina (4-AP). La taurina se administró en forma intraperitoneal a ratones de 12 a 15 días de edad en una dosis de 1.3 y 2.6 g/kg a los siguientes tiempos (A) 30 minutos y (B) 15 minutos antes de la inyección de 4-AP (5 mg/kg). Las barras indican el promedio y error estandar de 6 experimentos y el número total de animales se indica entre paréntesis.

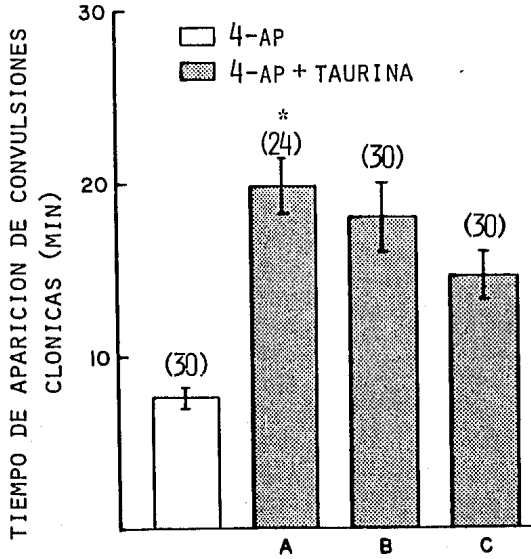


FIGURA 2 Efecto de taurina sobre el tiempo de aparición de convulsiones clónicas inducidas por la 4-AP. La taurina se administró en una dosis de 2.6 g/kg a los siguientes tiempos: (A) 30 minutos (B) 15 minutos (C) una hora antes de la inyección intraperitoneal de 4-AP (5 mg/kg). Las barras indican el promedio \pm error estandar de 6 experimentos y el número total de animales se indican entre paréntesis (*P < .001).

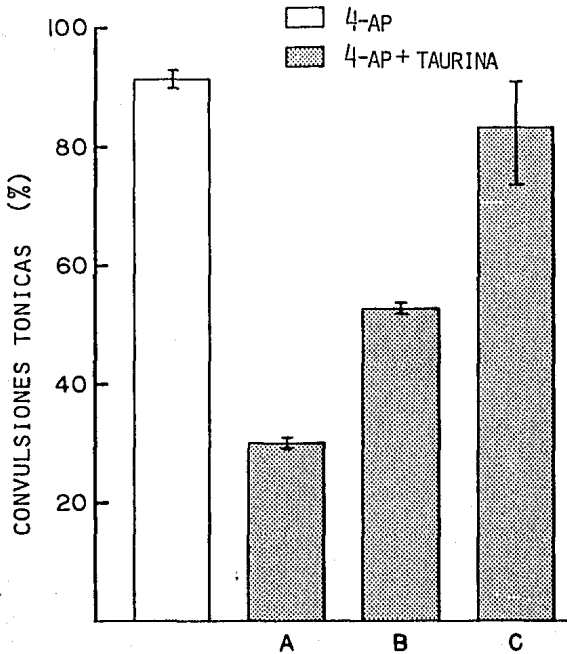


FIGURA 3 Efecto de taurina sobre las convulsiones tónicas inducidas por la 4-AP. La taurina se administró en una dosis de 2.6 g/kg a los siguientes tiempos: (A) 30 minutos (B) 15 minutos y (C) una hora antes de la inyección de 4-AP.

Las barras expresan el porciento de animales que presentaron convulsiones tónicas considerando como el 100% el número total de animales tratados. Promedio \pm error estandar de 6 experimentos y el número total de animales se expresa entre paréntesis en la figura 2.

Transporte de ³⁵S-aurina

Con el propósito de conocer si la taurina inyectada intraperitonealmente se acumulaba en el cerebro y si esta acumulación mostraba alguna relación con el tiempo óptimo de su efecto anticonvulsivante, se inyectó intraperitonealmente taurina radioactiva (2.5 μ Ci) en 2.5 g/kg, a ratones de 15 a 17 días de edad; los animales se sacrificaron a diferentes tiempos entre los 15 y los 90 minutos, y se tomaron muestras simultáneas de corteza cerebral y de la sangre cada 15 minutos, con el objeto de seguir el trayecto de la marca. En la figura 4 se observa que en la corteza cerebral la acumulación de radioactividad se incrementó de los 15 a los 60 minutos tiempo en que se alcanzó la máxima acumulación; paralelamente a estos tiempos, se observó un descenso de radioactividad en la sangre.

Estos resultados demuestran que la taurina en animales de esta edad, atraviesa la barrera hematoencefálica, y que el tiempo en el cual se observa un máximo de acumulación en la corteza cerebral corresponde a los 60 minutos, sin embargo, no hay una diferencia importante entre los valores de radioactividad encontrados entre los 30, 60 y 90 minutos.

Efecto de GABA y Glicina

Con la finalidad de probar la especificidad y eficiencia de la acción anticonvulsivante de la taurina, se comparó su efecto en experimentos en paralelo con el del GABA y la glicina que son dos aminoácidos neuroactivos con una clara acción inhibitoria en el sistema nervioso central. La taurina, el GABA y la glicina se inyectaron intraperitonealmente en una dosis de 2.6 g/kg a ratones de 12 a 15 días de edad, administrándose cada una de ellas 30 minutos antes de la inyección de la 4-AP por la misma vía. La taurina

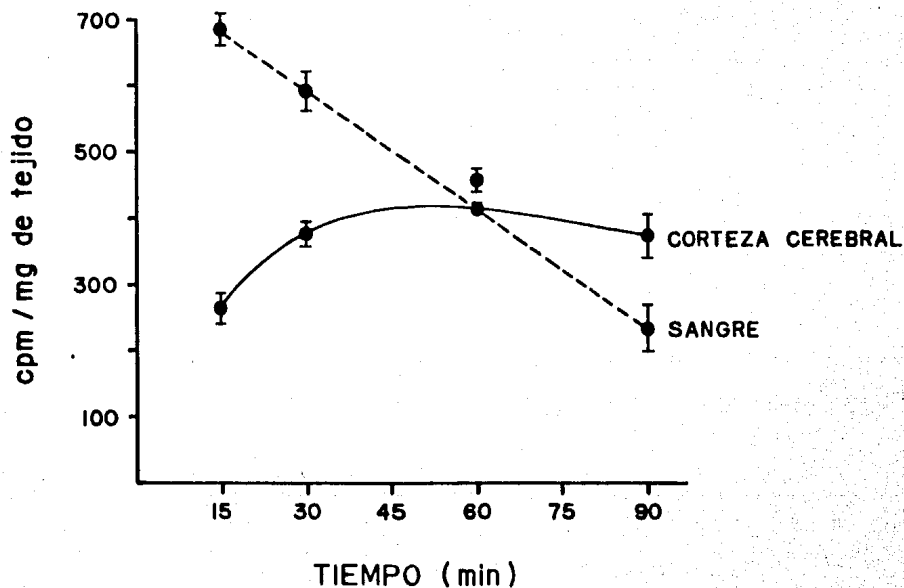


FIGURA 4 Captación de ^{35}S -taurina en corteza cerebral de ratón in vivo. La taurina se administró intraperitonealmente a ratones de 12 días de edad, en una dosis de 2.6 g/kg conteniendo 2.5 uCi de ^{35}S -taurina. Cada dato es promedio y error estandar de 3 experimentos utilizando 4 animales en cada uno.

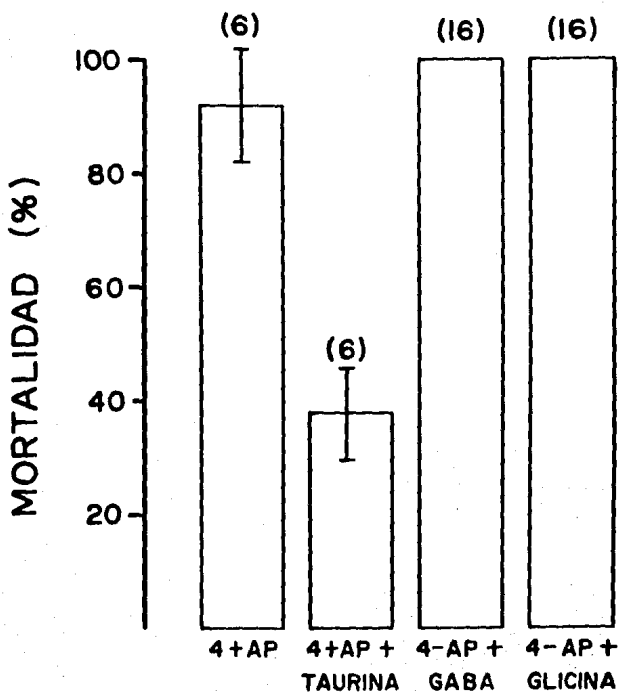


FIGURA 5 Efecto de taurina, GABA y glicina sobre la mortalidad inducida por 4-AP. El GABA, la glicina y la taurina se administraron intraperitonealmente en una dosis de 2.6 g/kg media hora antes de la administración de 4-AP (5 mg/kg). Las barras indican el promedio \pm error estandar de 3 experimentos y el número total de animales se indica entre paréntesis.

como se describió anteriormente, redujo la mortalidad de los animales en forma importante. La inyección intraperitoneal de GABA y glicina 30 minutos antes de la inyección de 4-AP (5 mg/kg), no redujo la mortalidad de los animales observándose por el contrario, que el valor de este parámetro fue del 100% (FIG 5) y ninguno de los parámetros observados, tales como el tiempo de aparición de convulsiones clónicas ni el número de convulsiones tónicas se modificó favorablemente por dichos aminoácidos.

Efectos de Taurina y EDTA

Izumi y colaboradores (1975), demostraron que la administración de EDTA previa a la administración de taurina, reduce la capacidad anticonvulsivante del aminoácido contra las convulsiones producidas por el metrazol. Con el fin de reproducir estos estudios en el modelo de la 4-AP, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se observó el efecto del EDTA sobre la protección de la taurina. El EDTA se inyectó intraperitonealmente en una dosis de 6 mg/kg, la taurina se administró media hora antes de la 4-AP y 15 minutos antes del EDTA.

La figura 6 muestra que la inyección de la 4-AP produjo una mortalidad del 80% de los animales, mientras que en presencia de EDTA y 4-AP, la mortalidad fue de un 100%. La inyección de taurina 30 minutos antes de la administración de 4-AP redujo la mortalidad de los animales tal como se había observado en ocasiones anteriores. Sin embargo, la inyección de taurina previa a la administración de EDTA y 4-AP, no modificó el porcentaje de mortalidad de los animales obtenido en presencia de EDTA y 4-AP (FIG 6).

La inyección intraperitoneal de EDTA (6 mg/kg) indujo temblores ligeros en los animales y la mortalidad de los mismos no se vio afectada.

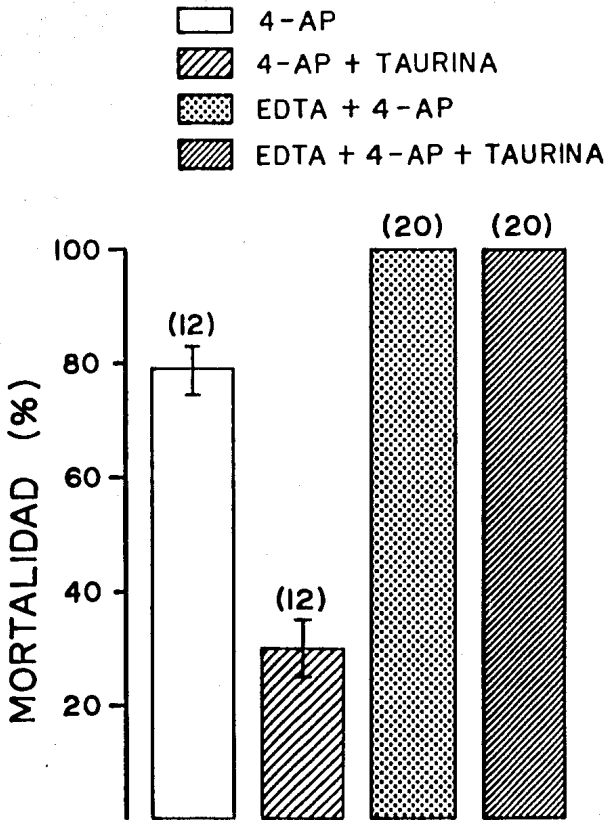


FIGURA 6 Efecto de EDTA y taurina sobre la mortalidad en ratones tratados con 4-AP. Los compuestos se inyectaron en forma intraperitoneal a ratones de 12 a 15 días de edad. El EDTA se administró en una dosis de 6 mg/kg 15 minutos antes de la inyección de 4-AP (5 mg/kg). Los animales tratados con taurina -- 2.6 g/kg, se les inyectó el aminoácido 15 minutos antes de la inyección de EDTA y 30 minutos después se administró la 4-AP. Las barras indican el promedio \pm el error estándar de 5 experimentos y el número total de animales se indica entre paréntesis.

Efecto de Taurina y 4-AP sobre la Acumulación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en fracción sinaptosomal.

Con el objeto de probar la posibilidad de que los efectos antagónicos de la 4-AP y la taurina a nivel de las alteraciones de la excitabilidad in vivo se relacionen con una acción de ambos compuestos sobre los flujos de calcio en los tejidos excitables, se llevaron a cabo estudios in vitro midiendo el efecto de la taurina y la 4-AP sobre la unión y la acumulación de calcio por terminaciones sinápticas aisladas de cerebro de ratón. Inicialmente, se midió la acumulación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en terminaciones nerviosas aisladas de cerebro de ratón en presencia de taurina 25 mM y 4-AP a diferentes concentraciones en un medio Krebs-bicarbonato a pH 7.4.

La figura 7 muestra los resultados de estos experimentos, observándose que la 4-AP incrementó en forma dependiente de dosis la acumulación de calcio, desde 37% hasta 350% sobre la basal. La presencia de taurina a una concentración de 25 mM en el medio de incubación disminuyó significativamente la acumulación de calcio a valores cercanos al nivel basal para las concentraciones de 1 y 2 mM de 4-AP.

Ensayos de Unión de Calcio a la Membrana Sinaptosomal Monitoreado por Cambios en la Fluorescencia de la Cloretetraciclina.

Los experimentos de acumulación de $^{45}\text{CaCl}_2$ por sinaptosomas llevados a cabo en este estudio, no permiten distinguir si el aumento en radioactividad observado en presencia de la 4-AP se debe a una entrada neta de calcio al sinaptosoma o bien a una unión de este catión a la membrana del mismo. En el mismo sentido y con el propósito de observar si las modificaciones de la taurina y la 4-AP sobre el calcio podrían llevarse a cabo a nivel de la

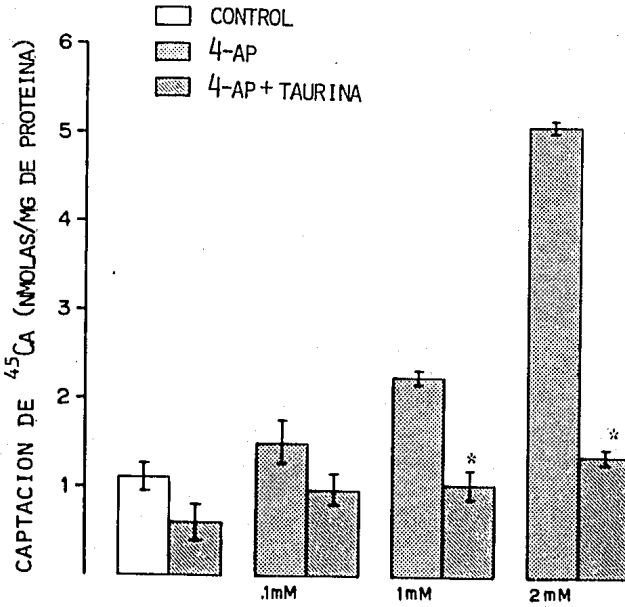


FIGURA 7 Efecto de 4-AP y taurina sobre la acumulación de $^{45}\text{CaCl}_2$ en sinaptosomas de cerebro de ratón. Los sinaptosomas se incubaron en un medio Krebs-bicarbonato pH 7.4 por 5 minutos. La 4-AP fue añadida al medio de incubación en las concentraciones indicadas en cada barra. La concentración de taurina fue 25 mM en todos los casos. Las barras indican el promedio \pm el error estandar de 12 experimentos realizados por separado. (*P <,001),

superficie de la membrana sinaptosomal, se cuantificó la unión de calcio a la membrana mediante la fluorescencia emitida por la clorotetraciclina (CTC), un compuesto que fluoresce al formar un complejo específico con el calcio y la membrana (Carvalho, 1978).

Los resultados mostrados en la figura 8 indican que el orden de adición de los diferentes compuestos es importante. Así, cuando se añadió calcio en una concentración de 1 mM al medio de incubación que consistió en sacarosa 310 mM y TRIS-HCl 20 mM a un pH de 7.4, se alcanzó un incremento en fluorescencia con un máximo a los 5 minutos, la adición de 4-AP 1 mM aumentó la unión de calcio a la membrana y la presencia de taurina 25 mM regresó el valor de fluorescencia a los niveles previos a la adición de la droga (FIG 8A).

El trazo C de la figura 8 consistió en la adición de taurina después de alcanzar la máxima unión en presencia de calcio a la membrana sinaptosomal, en estas condiciones, la taurina redujo la fluorescencia inducida por la unión de calcio, aunque cuantitativamente la reducción fue menor a la observada cuando la taurina se agregó antes de la adición de calcio; así, cuando se añadió la 4-AP, el aumento en fluorescencia fue menor que el observado en ausencia del aminoácido (FIG 8C).

Cuando se modificó la secuencia anterior añadiendo primero la taurina, se observó que este aminoácido per se, no modificó la fluorescencia de la CTC, cuando se agregó calcio 1 mM a los 5 minutos, la unión máxima obtenida fue 30% menor que la observada en las condiciones iniciales (comparar figuras 8A y 8B).

En los ensayos de unión de calcio a la membrana con CTC se utilizó medio sacarosa-TRIS por dos razones principales; primero, por ser el medio reportado en la literatura para este tipo de estudios (Shaffer y Olson, 1976, Carvalho, 1978), y segundo porque los cambios observados en este medio se

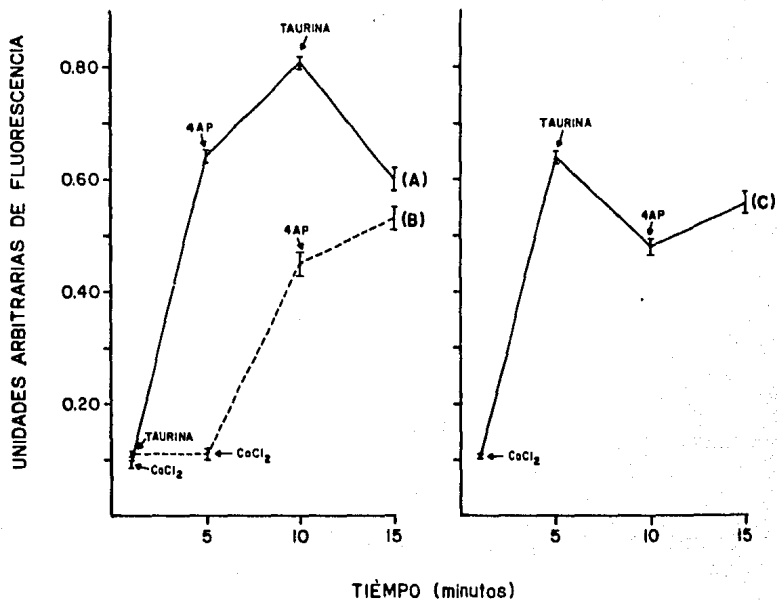


FIGURA 8 Efecto de taurina y 4-AP sobre la unión de calcio a la membrana medido por fluorescencia con clorotetraciclina (CTC). El medio de incubación contenía sacarosa 310 mM, TRIS-HCl 20 mM a pH 7.4m CTC 25 μ M y 0.4 mg de proteína por mililitro. En el trazo A la reacción se inició con la adición de CaCl₂ (1 mM) a los cinco minutos, se agregó la 4-AP (1 mM) y cinco minutos después la taurina 25 mM. En el trazo B el orden de adición de los compuestos fue el siguiente: taurina 25 mM, CaCl₂ 1 mM y 4-AP 1 mM. En el trazo C después de alcanzar la máxima unión de calcio, se añadió taurina 25 mM y cinco minutos después 4-AP (1 mM). Los resultados son el promedio \pm el error estandar de 15 experimentos realizados por separado.

mostraban con gran claridad. Sin embargo, este medio carece de iones por lo cual no se puede decir que los resultados observados sean fisiológicos. Con el propósito de comparar si las modificaciones en la unión de calcio a la membrana inducidas por taurina y 4-AP se reproducían en un medio fisiológico, se llevaron a cabo experimentos en medio Krebs-bicarbonato.

La figura 9 muestra la unión de calcio a la membrana medida por la fluorescencia emitida por la CTC en un medio Krebs-bicarbonato a pH 7,4.

Como puede observarse, al igual que en el medio sacarosa-TRIS, cuando se agregó el calcio en una concentración de 1 mM, se presentó un aumento en fluorescencia que fue máximo a los 5 minutos, la adición de 4-AP incrementó el calcio unido a la membrana sinaptosomal, y al igual que en el medio sacarosa-TRIS, cuando se agregó taurina 25 mM se observó una reducción del valor de fluorescencia.

El trazo B, muestra que la taurina no modificó la fluorescencia de la CTC y que la adición posterior de calcio 1 mM al medio, indujo un aumento en fluorescencia menor que el observado en ausencia del aminoácido, en estas condiciones, la presencia de 4-AP indujo un aumento cuantitativamente menor de la fluorescencia que el inducido por la droga en ausencia de taurina.

Efecto de Taurina y 4-AP sobre la Liberación de Neurotransmisores.

Se estudió el efecto de taurina y 4-AP sobre la liberación de GABA y ácido glutámico, por ser el GABA representativo de un neurotransmisor inhibitorio y el segundo un conocido neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central. Estos experimentos se llevaron a cabo en un sistema de superfusión continua, en el cual es mínima la recaptura de los trans

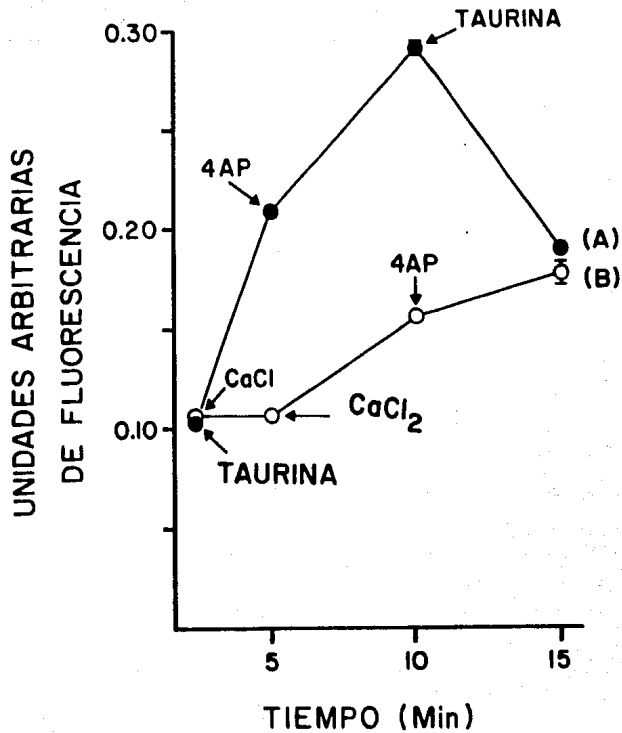


FIGURA 9 Efecto de taurina y 4-AP sobre la unión de calcio a la membrana medido por fluorescencia con CTC en medio Krebs-bicarbonato. Las lecturas se llevaron a cabo en medio Krebs-bicarbonato sin calcio a pH 7.4 conteniendo $25 \mu\text{M}$ de CTC y 0.4 mg de proteína por ml. En el trazo A la reacción se inició con la adición de CaCl_2 (1 mM), a los cinco minutos se añadió 4-AP (1 mM) y cinco minutos después la taurina 25 mM. En el trazo B la reacción se inició añadiendo taurina 25 mM, después de cinco minutos se agregó CaCl_2 (1 mM) y cinco minutos después la 4-AP a la misma concentración. Los resultados son el promedio \pm el error estandar de 4 experimentos realizados por separado.

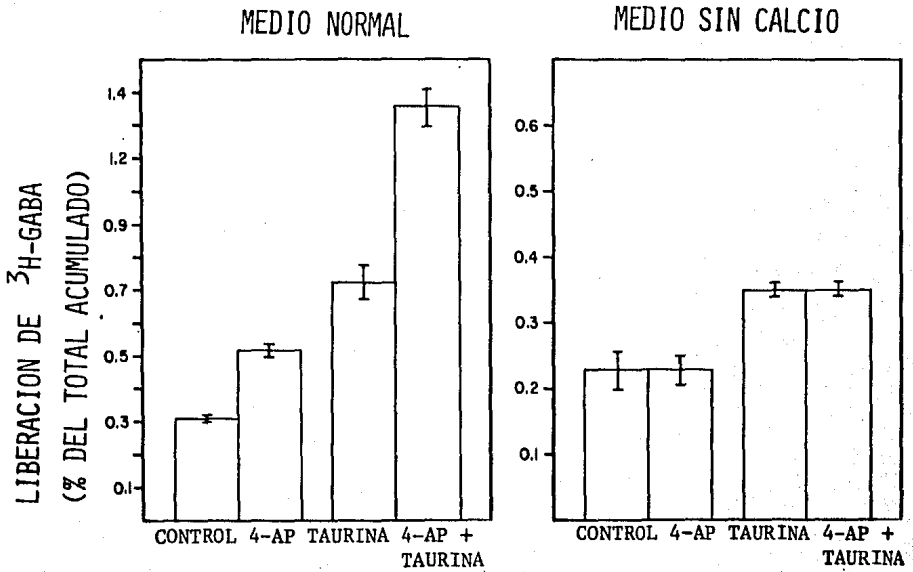


FIGURA 10 Efecto de taurina sobre la liberación basal de ³H-GABA y la estimulada por 4-aminopiridina. Tanto la incubación como la superfusión se llevaron a cabo en un medio Krebs-Bicarbonato en presencia o ausencia de CaCl₂ + EGTA (100 μM), dependiendo del requerimiento experimental. La estimulación se llevó a cabo con 4-AP (200 μM). La taurina estuvo presente desde el principio de la superfusión en una concentración de 25 mM cuando se indica en la figura. Los resultados corresponden al promedio + el error estandar de 6 experimentos realizados por separado.

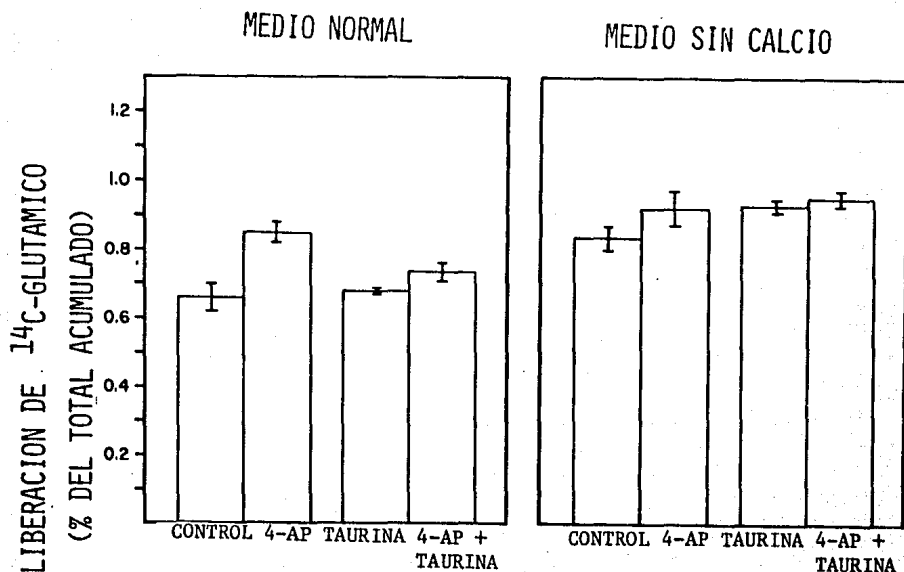


FIGURA 11 Efecto de taurina sobre la liberación basal de ^{14}C -glutámico y la estimulada por 4-aminopiridina. La preincubación y superfusión se llevaron a cabo en medio Krebs-Bicarbonato en presencia o ausencia de CaCl_2 con EGTA ($100\ \mu\text{M}$) dependiendo del requerimiento experimental. La estimulación se llevó a cabo con 4-AP ($200\ \mu\text{M}$). La taurina $25\ \text{mM}$ estuvo presente desde el principio de la superfusión cuando lo indica la figura. Los resultados corresponden al promedio \pm el error estandar de seis experimentos por separado.

misores liberados. La liberación se midió en una fracción sinaptosomal purificada (Hajós, 1975), utilizando medio Krebs-bicarbonato a pH 7.4. La figura 10 muestra que la 4-AP, en una concentración de 200 μ M amentó la liberación basal de 3 H-GABA de los sinaptosomas; cuando la taurina estuvo presente en el medio de superfusión a una concentración de 25 mM, se observó un incremento en la liberación basal de GABA. El aumento en la liberación de ácido glutámico estimulada por la 4-AP fue menos importante que el observado para el GABA (FIG 11) y la presencia de taurina no aumentó la liberación basal de ácido glutámico - sino al contrario la redujo en un 20%. En ambos casos se observó que en un medio libre de calcio y con EGTA (100 μ M), los efectos de la 4-AP no se manifiestan (FIG 10 y 11).

Los resultados obtenidos muestran que:

- 1) La 4-AP induce un aumento en la liberación basal de 3 H-GABA de un 66% y en la liberación basal de 14 C-ácido glutámico de un 30%.
- 2) La taurina aumenta la liberación basal de 3 H-GABA en un 128%, mientras que la liberación basal de 14 C-ácido glutámico no se ve afectada en presencia del aminoácido.
- 3) La liberación de 3 H-GABA inducida por la 4-AP aumentó en presencia de taurina en un 90%, mientras que este aminoácido no aumentó la liberación de 14 C-ácido glutámico inducida por la 4-AP.
- 4) Los efectos de la 4-AP son absolutamente dependientes de calcio extracelular.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la taurina es un anticonvulsivante efectivo ante la actividad convulsiva producida por la 4-AP. La acción anticonvulsivante de la taurina ha sido descrita para una gran variedad de modelos de epilepsias (Ver tabla 1). A pesar de la gran diferencia que existe entre los modelos epileptógenos estudiados, la taurina controla en forma eficiente las convulsiones inducidas en diversos modelos experimentales de epilepsias incluyendo aquellas que se presentan en forma natural, como las de la especie genéticamente fotosensible Papio papio (Wada et al, -- 1975), las epilepsias crónicas espontáneas en gatos (Van Gelder et al, 1977) y las del hombre (Bergamini et al, 1974; Pasantes-Morales et al, 1981).

En el presente trabajo se encontró que la inyección intraperitoneal de taurina en una dosis de 2.6 g/kg redujo entre un 35% y un 40% la mortalidad producida por la administración intraperitoneal de 4-AP en ratones de 12 a 15 días de edad (Fig 1). Asimismo, este aminoácido redujo en la misma proporción el número de convulsiones tónicas y retardó la aparición de convulsiones clónicas (Fig 2 y 3). Bajo estas condiciones experimentales, la máxima protección de la taurina se presentó cuando el aminoácido se administró media hora antes de la inyección intraperitoneal de 4-AP.

Se ha reportado que la taurina atraviesa muy lentamente la barrera hematoencefálica (Wheler et al, 1977; Sturman 1973; Urquart et al, 1974). Por esta razón se llevaron a cabo experimentos tendientes a relacionar los niveles del aminoácido administrado y el tiempo de protección contra las convulsiones inducidas por la 4-AP. Así, se observó que en -

los animales inyectados intraperitonealmente con ^{35}S -taurina, la marca se incrementó a partir de los 15 minutos en las muestras tomadas de la corteza cerebral, mientras que en forma paralela se observó una disminución de la radioactividad en las muestras de sangre (Fig 4). Este resultado indica que existe una relación temporal entre los niveles más altos de taurina captada en corteza cerebral y el período de máxima protección del aminoácido contra las convulsiones producidas por la 4-AP. Sin embargo, los niveles de radioactividad encontrados a los 30 minutos después de la administración de taurina son muy similares a los encontrados a los 60 y 90 minutos, tiempo en el cual el efecto protector de la taurina se reduce considerablemente; el hecho de que la taurina no muestre protección a tiempos mayores a pesar de estar presente en el tejido, podría sugerir que a dichos tiempos los niveles extracelulares del aminoácido disminuyen ya que el aporte exógeno se reduce. La disminución de los niveles extracelulares de taurina se debe básicamente a los eficientes sistemas de transporte del aminoácido descritos en diferentes regiones del sistema nervioso (Davison y Kaczmarek, 1971; Lahdesmaki y Oja, 1973; Lombardini 1976; Bradford et al, 1976). Por estas razones es posible sugerir que el efecto anticonvulsivante de la taurina se lleva a cabo mientras el aminoácido se encuentra más concentrado en el exterior de la célula.

En lo que se refiere al mecanismo de la acción anticonvulsiva de la taurina, se ha sugerido que dicho efecto del aminoácido podría estar relacionado con una acción inespecífica y generalizada (Izumi et al, 1974), dado que la taurina es eficiente ante convulsiones de muy distinta etiología.

Inicialmente se postuló que el efecto depresor de la taurina sobre la excitabilidad neuronal podría explicar su acción anticonvulsiva genera-

lizada. Existe la posibilidad de que los efectos fisiológicos de la taurina se lleven a cabo a través de una acción del aminoácido como neurotransmisor inhibitor, dado que la aplicación iontoforética de este aminoácido produce una inhibición en las neuronas postsinápticas (Curtis y Watkins, 1960; Curtis et al, 1968; Curtis y Têbecis, 1972; Pasantes-Morales et al, 1973) sin embargo, dicho efecto depresor probablemente está mediado por receptores sinápticos de GABA y glicina dado que la inhibición producida por taurina en médula espinal se ve antagonizada por estriknina (Curtis et al, 1978) y en corteza cerebral por bicuculina (Curtis et al, 1960; Hass y Hosli 1973), sustancias que son bloqueadores específicos de los efectos sinápticos de la glicina y el GABA respectivamente.

Por lo tanto, si este fuera el caso, los aminoácidos inhibidores GABA y glicina deberían mostrar un efecto anticonvulsivante similar al de la taurina; los resultados de los experimentos realizados en éste trabajo muestran que mientras la taurina presenta un importante efecto protector contra la mortalidad inducida por la 4-AP, el GABA y la glicina no lo hacen. Es importante hacer notar, que la mortalidad de los animales tratados con 4-AP en presencia de GABA y glicina fue mayor que la observada en los controles; para tal resultado hasta ahora no se tiene explicación (Fig 5). Cabe mencionar que las dosis administradas de los aminoácidos en estos estudios no fueron equimolares, ya que en todos los casos se inyectaron 2.6 g/kg. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el efecto anticonvulsivante de la taurina no se explica a través de una acción sobre los receptores sinápticos de GABA y glicina. Además, estos resultados coinciden con los obtenidos en otros modelos epileptógenos como las convulsiones inducidas por ouabaina (Izumi et al, 1973), las producidas por metrazol (Izumi et al, 1975) y aquellas de origen genético (Huxtable y Laird, 1978) en las cuales se ha demos-

trado que la taurina es el aminoácido natural con la acción anticonvulsivante más eficaz a pesar de que la potencia y extensión del GABA y la glicina como neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso central son mucho mayores que las de la taurina.

Otra posible explicación para entender el efecto anticonvulsivante de la taurina podría relacionarse con sus acciones moduladoras sobre el calcio extracelular. Conociendo la importancia del calcio en los tejidos excitables, el papel de la taurina en los mismos se hace relevante si consideramos los efectos descritos para el aminoácido en relación con el calcio. Los primeros estudios fueron llevados a cabo por Dolara y colaboradores (1973), quienes demostraron que durante la perfusión del corazón en un medio libre de calcio, la presencia de taurina impide la pérdida de la fuerza contráctil y aumenta la retención de calcio; en estos experimentos los autores sugirieron que la taurina presenta un marcado efecto modulador sobre los flujos de calcio ya que el aminoácido aumenta la disponibilidad de este ión para la contracción. Otro tipo de experimentos que relacionan las acciones de la taurina sobre los flujos de calcio, fueron llevados a cabo en mitocondria de hígado (Dolara, Marino y Buffoni 1973); en ellos demostraron que la taurina aumenta la acumulación de calcio dependiente de ATP por la mitocondria. Huxtable y Bressler (1973) sugieren que la taurina puede tener un importante papel como estabilizador de membranas, basándose en experimentos realizados en retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de rata en los cuales se indujo destrucción de la membrana con fosfolipasa C; bajo estas condiciones, se redujo tanto el transporte de calcio como la actividad de la ATPasa Ca-Mg y la presencia de taurina durante el aislamiento del tejido disminuyó la velocidad de pérdida del transporte de calcio y mantuvo la actividad de la ATPasa alteradas por la fosfolipasa C. Por

otra parte, Izumi (1975) sugirió la necesidad de calcio extracelular para la manifestación del efecto anticonvulsivante de la taurina al demostrar que dicho efecto se reduce significativamente en presencia de EDTA administrado por vía intraventricular. Al mismo tiempo demostró que el efecto anticonvulsivante del GABA en el mismo modelo, es muy débil comparado con el de la taurina y que la presencia de EDTA, no modifica la acción del GABA; lo cual sugiere que el mecanismo de protección de ambos aminoácidos es diferente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la inyección intraperitoneal de EDTA, reduce la acción anticonvulsiva de la taurina contra las convulsiones inducidas por 4-AP (Fig 6). Estos resultados coinciden totalmente con los obtenidos por Izumi; sin embargo la interpretación de tales resultados debe ser analizada con precaución, ya que el EDTA que es un quelante de cationes divalentes, posee una mayor afinidad por el magnesio que por el calcio; aunque se ha descrito que el calcio es el catión divalente más accesible al EDTA al administrarse in vivo (Levine 1970). Además, la excitabilidad neuronal esta mantenida basicamente por el calcio como se ha demostrado electrofisiologicamente (Frankenhauser y Hodgkin, 1957; Gilbert y Ehrenstein 1969); por estas razones es posible sugerir que si el efecto anticonvulsivante de la taurina se reduce en presencia de -- EDTA, es debido a una disminució**n** basicamente de los niveles extracelulares de calcio necesarios para que se manifieste dicho efecto.

Por otra parte y en apoyo a lo mencionado anteriormente, se ha demostrado que la taurina es capaz de modular los flujos de calcio en el sistema nervioso, donde se ha descrito que dicho aminoácido reduce la acumulaci**o**n de calcio en terminaciones nerviosas (Pasantes-Morales y Gamboa, 1980), en fotorreceptores (Pasantes-Morales et al, 1979), en microsomas de corteza cerebral (Izumi et al, 1977) y en sinaptosomas de cerebelo (Namina et al, 1983). El mecanismo básico de la asociaci**o**n de la tauri

na con el calcio en los diferentes tejidos estudiados no se conoce; sin embargo, los antecedentes mostrados indican que la fisiología y/o farmacología de la taurina en los tejidos excitables parece estar íntimamente relacionada con el calcio extracelular.

Considerando estos antecedentes fue necesario investigar si el efecto protector de la taurina contra las convulsiones producidas por la 4-AP, podría estar dado mediante efectos opuestos de ambos compuestos sobre los flujos de calcio. Así, se llevaron a cabo experimentos en los que se midió la acumulación de ^{45}Ca en terminaciones nerviosas en presencia de taurina y 4-AP; los resultados mostraron que la 4-AP induce una acumulación importante de calcio a los sinaptosomas en una forma dependiente de dosis (Fig 7); la taurina a su vez, revierte de una manera significativa la acumulación de este ión inducida por la 4-AP (Fig 7).

La correlación directa de estos resultados con los experimentos sobre las alteraciones en la excitabilidad de los animales observada in vivo resulta difícil debido principalmente a que la concentración utilizada de 4-AP in vivo (5 mg/kg), es muy baja en comparación con la utilizada in vitro (1 mM). Para explicar este hecho, se podrían considerar los resultados encontrados por Vizi y colaboradores (1977), quienes demostraron que la 4-AP aumenta la liberación de acetilcolina en un medio con bajo calcio, pero no cuando el medio carece totalmente de dicho ión; esto sugiere que la 4-AP disminuye la demanda de calcio de las terminaciones nerviosas, es decir que la droga aumenta la sensibilidad a este catión. El aumento en la acumulación de calcio inducida por la 4-AP a terminaciones nerviosas, podría relacionarse con el efecto convulsivo de la droga, ya que Galvan y colaboradores (1982), han demostrado en rebanadas de corteza olfatoria, que la presencia de 4-AP en el medio de

incubación induce actividad epileptógena en el tejido, simultaneo a una disminución en los niveles de calcio extracelular. Asimismo, se ha demostrado que se presenta una reducción importante en la concentración de calcio extracelular en la corteza sensoriomotora de gatos durante las crisis epilépticas (Heinemann et al, 1982). Nuestros resultados podrían sugerir con base en las evidencias mostrada anteriormente, que la acción moduladora de la taurina sobre los flujos de calcio, aunada a su posible papel como estabilizador de membranas, podría ayudar a explicar el efecto anticonvulsivante de este aminoácido. Considerando que se ha sugerido que la taurina puede estar actuando como un estabilizador de membranas en los tejidos excitables (Kramer et al, 1982; Huxtable et al, 1975; Pasantes-Morales et al, 1981; Welty et al, 1982), se llevaron a cabo experimentos para investigar si los efectos de la taurina y la 4-AP sobre la acumulación de ^{45}Ca podrían llevarse a cabo a nivel de modificaciones en la unión de calcio a la membrana. Los resultados de tales experimentos mostraron que el comportamiento de la taurina y la 4-AP sobre el calcio unido a la membrana presenta un patrón similar al observado en los experimentos de acumulación de ^{45}Ca ; la unión de calcio a la membrana se incrementó en presencia de 4-AP por encima del nivel máximo observado con calcio, mientras que la adición de taurina al medio revirtió el efecto de la 4-AP y la presencia previa de taurina disminuyó la unión inicial de calcio a la membrana (Fig 8 y 9). Estos resultados analizados en relación con las acciones conocidas del calcio ionizado a nivel de neutralización de cargas en la membrana y sus efectos sobre la excitabilidad, no pueden explicar las acciones in vivo de la 4-AP ni de la taurina, ya que el efecto de la 4-AP sobre la unión de calcio a la membrana, debería producir un aumento en el umbral de excitabilidad y en ningún caso una actividad convulsiva, y lo mismo puede decirse para la taurina.

Los estudios de la CTC, mostraron que la taurina y la 4-AP modifican la unión de calcio a la membrana, sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que estos fármacos no solo estén afectando la unión de calcio a la membrana sino que también estén modificando su entrada a la terminal nerviosa. Si tal posibilidad ocurre, es posible entonces que la liberación de neurotransmisores se afecte, ya que todos los estudios se llevaron a cabo en terminaciones nerviosas y que dicho fenómeno depende de las pozas intrasínaptosomales de calcio. Además, como se ha mencionado anteriormente la 4-AP aumenta la liberación de neurotransmisores en forma inespecífica y generalizada (Vizi et al, 1977; Moritoki et al, 1978; Kirpekar et al, 1977; Leander et al, 1977; Lundh 1978; Tapia y Sitges, 1982; Buckle y Haas, 1982; Corthay et al, 1982; Lamarca y Collier, 1983; Gundersen y Jenden, 1981; Weide y Loffelholz, 1980; Dolezal y Tucek, 1983). Se sabe que esta acción de la droga es dependiente de calcio extracelular, ya que en presencia de antagonistas de la acción del calcio o quelantes de éste ión, el efecto de la 4-AP no se manifiesta (Molgo et al, 1977; Lundh et al, 1977; Lundh, 1978; Illés y Thesleff, 1978; Vizi et al, 1977; Tapia y Sitges 1982; Lamarka y Collier, 1983) Se ha sugerido que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores y sus efectos de potenciación de la actividad contráctil en preparaciones periféricas (Khan y Edman, 1979; Wollmer et al, 1979; Yanagisawa y Taira, 1979), se deben a modificaciones de la droga sobre los flujos de calcio (Khan y Edman 1979; Molgo 1978; Lund 1978; Dolezal y Tucek, 1983)

En lo que respecta a la taurina, se ha reportado que este aminoácido reduce la liberación estimulada de algunos neurotransmisores como son acetilcolina y noradrenalina (Kuriyama et al, 1978); los autores de este trabajo sugieren que dicha acción de la taurina se debe probablemente a los efectos inhibidores del aminoácido en la entrada de calcio.

Estos antecedentes aunados a los resultados obtenidos en el presente trabajo sugirieron la posibilidad de encontrar efectos opuestos entre la taurina y la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores. Los resultados de estos experimentos mostraron que la 4-AP induce un aumento en la liberación basal de GABA y de ácido glutámico. La presencia de taurina en el medio de superfusión, produjo una potenciación de la liberación de GABA y una pequeña reducción en la liberación de ácido glutámico (20%) (Fig 10 y 11). El mecanismo a través del cual la 4-AP aumenta la liberación de neurotransmisores, no se conoce, se ha sugerido que esta droga pueda actuar como despolarizante (Yeh et al, 1976; Yeh Oxfor, Wu y Narahashi 1976; Van Boagert y Snyders, 1982; Illés et al, 1976) aunque con experimentos de fijación de voltaje en el axón de langosta se demostró que los flujos de sodio no se modifican en presencia de 4-AP mientras que los de potasio si se ven afectados (Yeh et al, 1976; Yeh, Oxfor, Wu y Narahashi 1976). Asimismo, se ha demostrado que la droga no es capaz de revertir el bloqueo sobre la liberación de acetilcolina inducido por tetrodotoxina en ileo de cobayo, (Vizi et al, 1977) pero si lo hace en rebanadas de cuerpo estriado -- (Dolezal y Tucek 1983) y que su efecto sobre la liberación de neurotransmisores no se modifica con veratrina (Tapia et al, eviado a publicación). Otra alternativa sugerida para explicar el mecanismo de acción de la 4-AP es que aumente la entrada de calcio a la terminal nerviosa como consecuencia del bloqueo de los canales de potasio (Lundh y Thesleff 1977; Molgo 1978; Dolezal y Tucek 1983). Esto se manifestaría como un aumento en la liberación de neurotransmisores (Khan y Edman, 1979; Molgo 1978; Lundh 1978). En apoyo a esta posibilidad diferentes autores han demostrado que la 4-AP aumenta la entrada de calcio a la terminal presináptica (Lamarca y Collier, 1983; Agoston et al, 1983). También se ha sugerido que la 4-AP actue sustituyendo al cal-

cio durante la liberación de neurotransmisores; sin embargo se ha demostrado que la droga requiere de calcio externo para llevar a cabo sus efectos (Molgo et al, 1977; Lundh 1978; Illés y Thesleff, 1978; Lamarca y Collier 1983; Tapia y Sitges, 1982), lo cual dificulta tal posibilidad. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, están de acuerdo con los obtenidos por Molgo et al, 1977; Lundh 1978; Illés y Thesleff, 1978; Lamarca y Collier 1983 y Tapia y Sitges 1982, ya que en un medio libre de calcio la 4-AP no aumenta la liberación basal de GABA ni la de ácido glutámico. Esto junto con lo observado para la acumulación de ^{45}Ca apoya la posibilidad de que el mecanismo a través del cual la 4-AP aumenta la liberación de neurotransmisores se lleva a cabo mediante un mecanismo que requiere calcio externo, sin embargo, con nuestro diseño experimental no es posible dilucidar si este efecto de la droga es directo o indirecto.

La reducción producida por la taurina en la liberación de ácido glutámico inducida por la 4-AP, coincide con las observaciones de Kuriyama (1978) quien demostró que la taurina reduce la liberación estimulada de acetilcolina y noradrenalina y sugiere que el mecanismo de acción de la taurina se lleva a cabo a través de la modificación en los flujos de calcio necesarios para la liberación de neurotransmisores.

Por otro lado el mecanismo a través del cual la taurina aumenta la liberación basal de GABA, es difícil de interpretar. Es posible que este efecto esté dado por un mecanismo de heterointercambio, es decir, que el acarreador de GABA transporte taurina al interior de la célula debido a la analogía estructural de ambos aminoácidos. Esta posibilidad se apoya también en el hecho de que la taurina no aumentó la liberación basal de ácido glutámico (Fig 11),

Considerando los resultados presentados en el presente trabajo y tomando en cuenta las evidencias mencionadas que tratan de explicar la participación de la taurina en los tejidos excitables, se sugieren dos posibles mecanismos a través de los cuales la taurina podría llevar a cabo su efecto anticonvulsivante generalizado.

La primera es que la taurina esté actuando como un modulador de la excitabilidad neuronal con base en sus efectos sobre la liberación de neurotransmisores. Esta posibilidad se sugiere ya que la taurina presenta efectos diferenciales sobre la liberación de neurotransmisores, pues reduce la liberación estimulada por despolarización de acetilcolina y noradrenalina en sinaptosomas de cerebro y en rebanadas de corteza cerebral (Kuriyama 1978). En lo que se refiere a la liberación de GABA, Pasantes-Morales y Morán (1981) mostraron que la taurina aumenta la liberación basal de dicho neurotransmisor, este resultado, coincide con el obtenido en el presente trabajo. Leach (1979), demostró que la liberación estimulada de GABA en rebanadas de corteza cerebral se incrementa significativamente en presencia de taurina; por ello, sugirió que la taurina puede estar actuando como un modulador de la transmisión nerviosa y que su efecto sobre la liberación de GABA es consistente con su efecto anticonvulsivante.

Se puede decir en terminos generales, que esta posibilidad es de tomarse en cuenta si consideramos que la taurina reduce la liberación estimulada de diferentes neurotransmisores y aumenta la liberación basal y estimulada de el neurotransmisor inhibitor más generalizado en el sistema nervioso central. Además, se sabe que los tratamientos clínicos utilizados en la actualidad para controlar la epilepsia en humanos, consisten en aumentar los niveles de GABA en el sistema nervioso o su eficiencia sináptica (Olsen 1981; Supavilai et al, 1982;

McDonald y McLean 1982; Groner 1976; Medrum y Murughalh 1983; Buwyer y Albertson 1982).

Una posibilidad alternativa que se sugiere en el presente trabajo para tratar de explicar los efectos anticonvulsivantes de la taurina es que el aminoácido actúe como un estabilizador de membranas. Huxtable (1976), define a un estabilizador de membranas como un compuesto que debe cumplir con los siguientes requisitos:

- 1.- Mantenimiento de las funciones de la membrana.
- 2.- Protección de las funciones electrofisiológicas de la membrana.
- 3.- Mantenimiento de la integridad de la membrana.
- 4.- Resistencia a procesos líticos.

En lo que se refiere al primer punto, los primeros experimentos que demostraron que la taurina contribuye al mantenimiento de las funciones de la membrana fueron los descritos por Huxtable (1973) quien demostró que la taurina protege el daño inducido por la fosfolipasa C en membranas de retículo sarcoplásmico y que el aislamiento del tejido en presencia de taurina mantiene las funciones de la membrana por evitar su destrucción. Asimismo, se encontró (Kramer et al, 1981) que la taurina protege contra el fenómeno descrito como la "paradoja del calcio", el cual se presenta cuando el tejido cardíaco se expone a un medio sin calcio y después de unos minutos el medio se reemplaza por un medio con bajo calcio; bajo estas condiciones se observan alteraciones tanto en la permeabilidad de la membrana como en su estructura y función; cuando el procedimiento experimental se llevó a cabo en presencia de taurina, el daño inducido por la falta de calcio en el medio fue mucho menor que el observado en ausencia del aminoácido. En otra serie de experimentos se demostró que la taurina administrada en el agua de be-

ber a hamsters cardiomiopáticos, protege contra la necrosis inducida por los crecientes niveles de calcio en el corazón de los animales - (Welty et al, 1982). Otros estudios que sugieren la participación de la taurina como estabilizador de membranas han demostrado que una disminución en los niveles del aminoácido inducida por la privación de - taurina en la dieta producía cambios importantes en la estructura y función de la retina; en este tratamiento los fotorreceptores presentaban serias alteraciones como vesiculación, desorientación y desintegración de las membranas de los discos; esta lesión se veía acompañada por una depresión o carencia total de la señal del electroretinograma (Hayes et al, 1975; Schmidt y Berson, 1978). Posteriormente se llevaron a cabo estudios en ratas a las que se les provocó una disminución de los - niveles de taurina en la retina, al impedir el transporte de este aminoácido con análogos estructurales que bloquean el acarreador membranal de la taurina; en este caso se produjeron las mismas alteraciones que las observadas con los gatos deficientes en taurina (Pasantes- Morales et al, 1983). En experimentos in vitro, se observó también que la taurina protege los segmentos externos de los fotorreceptores de las alteraciones membranales inducidas por exposición a la luz (Pasantes-Morales et al, 1981).

Las funciones electrofisiológicas de la membrana también se mantienen en presencia de taurina como lo demostró Gruener (1975), quién propo ne que la taurina puede tener la capacidad de estabilizar membranas posiblemente a través de interferir presinápticamente con la liberación de neurotransmisor o postsinápticamente causando cambios en la permeabilidad de la membrana, pues sus acciones producen una reducción en la eficiencia sináptica. En el mismo sentido Mutani et al (1974) ha mos- trado que la taurina inhibe la actividad encefalografica inducida por

focos epileptógenos. Asimismo, Van Gelder et al (1977) demostraron que la taurina reduce la hiperexcitabilidad electroencefalográfica presente durante la epilepsia crónica espontánea en gatos.

En lo referente a la participación de la taurina en el mantenimiento de la integridad de la membrana y resistencia a procesos líticos, se puede considerar que ambos requisitos se cumplen si se analizan los efectos descritos tanto en corazón como en retina anteriormente mencionados.

Las evidencias anteriormente mencionadas muestran claramente que la taurina puede estar actuando como un estabilizador de membranas en los tejidos en los que se encuentra presente, además de que esta función parece estar cercanamente relacionada con las modificaciones de la taurina sobre los flujos de calcio. En el sistema nervioso es ampliamente conocida la relación que existe entre el umbral de excitabilidad y el calcio asociado a membranas. Se sabe también que la taurina es capaz de disminuir la hiperexcitabilidad inducida por diferentes agentes y, dado que la taurina modifica los movimientos de calcio, es posible por lo tanto sugerir que la taurina es capaz de mantener el umbral de excitabilidad de las células nerviosas a través de una modulación sobre los flujos de calcio, ayudando así al mantenimiento de la integridad y función de los tejidos excitables. El mecanismo a través del cual la taurina lleva a cabo su función como estabilizadora de membranas no se conoce; sin embargo dadas las fuertes evidencias en favor de una participación del calcio en todos aquellos fenómenos en los cuales la taurina actúa como un estabilizador de membranas, como ocurre en corazón y en retina, hacen pensar que al menos su efecto anticonvulsivante, que involucra otras áreas del sistema nervioso, está relacionado también con este ión.

REFERENCIAS

- Adebri G, Bartolilli A, Bartolini R, Giotti A, Zilletti L (1974);
Anticonvulsive action of homotaurine and taurine. Br J. Pharmacol-
52:439-440.
- Agoston D, Hargittai P, Nagy A (1983); Effects of 4-A.P. in calcium movements
and changes of membrane potential in pinched-off terminals from rat
cerebral cortex J. Neurochem 41 (3):745-751.
- Bergamini L, Mutani R, Delseduner M, Durelli L (1974): First chemical
experience on the antiepileptic action of taurine. Eurpo. Neurol.,
11:261-269.
- Bergeret B, Chatgner F, Fromageot C (1956): Etude des decarboxilations de
l'acide L-cysteinesulfonique de l'acide L-cysteique et de l'acide
L-glutamique par divers organs du lapin. Influence du phosphate de
piridoxal et des groupements thiols. Biochem Biophys Acta 250:558-567.
- Bradford H F, Davison A N, Wheler G H T (1976): Taurine and synaptic
transmission. In: Taurine (ed) Huxtable R, Barbeaur A. pp. 303-311
Raven Press. New York.
- Bradford HF, Dodd PR (1977): Convulsions and activation of epileptic foci
induced by monosodium glutamate and related compounds. Biochem
Pharmacol 26:253-254.
- Bowger JF, Albertson TE (1982): The effects of pentylenetetrazol, biencullene
and strychnine on the development of kindled seizures. Neuropharmacol
21:985-990.
- Buckle P, Hass HL (1982) Enhancement of synaptic transmission of 4-amino
pyridine in hipocauptal slices of the rat. J. Physiol 326: 109-122.
- Burnham WM, Albright PH, Racine RJ (1978); The effect of taurine on kindled
seizures in the rat. Canad J Physiol Pharmacol 56: 497-500.

- Carruthers-Jones DI, Van Gelder NM (1978): Influence of taurine dosage on cobalt epilepsy in mice. *Neurochem Res* 3:115-123.
- Carvalho CAM (1978): Chlorotetracycline as an indicator of the interaction of calcium with brain membrane fractions. *J of Neurochemistry* 30:1149-1155.
- Chatagner F, Bergeret B (1952): Désulfination et decarboxylation enzymatiques de l'acide L-cystéine-sulfonique: sa transformation quantitative en alanine et en hypotaurine. *Biochem Biophys Acta* 9: 141-147.
- Clark RM, Collins GGS (1975): The release of endogenous amino acids from the mammalian visual cortex. *J. Physiol (Lond)* 246:16.
- Collins CCS (1974): The rates of synthesis, uptake and disappearance of ¹⁴C-*taurine* in eight areas of rat central nervous system. *Brain Res* 76:447-459.
- Collins GGS, Topiwala SH (1974): The release of ¹⁴C-*taurine* from slices of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium concentration. *Proc B. Pharmacol Soc* 451-452.
- Corthag J, Dunaut Y, Loctin F (1982): Acetylcholine changes underlying transmission of a single nerve impulse in the presence of 4-aminopyridine in torpedo. *J Physiol* 325: 461-479.
- Curtis DR, Hosli L, Johnston GAR (1968): A pharmacological study of spinal neurons by glycine and related amino acids. *Exp Brain Res* 6: 1-18.
- Curtis DR, Tébecis AK (1972): Bicuculine and thalamic inhibition *Exp Brain Res* 16:210-218.
- Curtis DR, Watkins JC (1960): The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6:117-141.
- DeBelleruche JJ, Bradford HF (1973): Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal. *J Neurochem* 21:441-451.

- Derouaux M, Puil E, Naquet R (1973): Antiepileptic effect of taurine in photosensitive epilepsy. *Electroencephalograph-Clin Neurophysiol* 35:770.
- Dolara P, Agrresti A, Giotti A, Pasquini G (1973): Effect of taurine on calcium kinetics of guinea pig heart. *Eur J Pharmacol* 24:352-358.
- Dolara P, Marino P, Buffoni F (1973): Effect of 2-aminoethane sulphonic acid (taurine) and 2-hidroxyethane sulphonic acid (isethionic acid) on calcium transport by rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol* 22:2085-2094.
- Dolezal V, Tucek S (1983): The Naunyn-Schmedeberg's Arch Pharmacol Effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat streatal slices. 323:90-95
- Durant NN, Nguyen N, Lee C, Katz RL (1982): A comparason of 3,4-diaminopyridine and 4-aminopyridine in the anaesthetized cat. *Eur J. of Pharmac* 84:215-219.
- Durelli L, Mutani R, Delsedime M, Quattrococo G, Buffa C Mazzariano M, Fumero S (1976): Electroencephalographic and biochemical study of the antiepileptic action of taurine administered by cortical superfusion. *Exp Neurol* 52:30-39.
- Durelli L, Mutani R, Quattrococo G, Delsedime M, Buffa C, Fassio F, Valentini C, Fumero F(1977): Relationships between electroencephalographic pattern and biochemical picture of the cobalt epileptogenic lesion after cortical superfusion with taurine. *Exp Neurol* 54:489:503.
- Emerson PC (1978): Biochemical and metabolic changes in epilepsy. In Barbean A, Huxtable R (eds): "Taurine and neurological disorders" New York Raven Press pp. 319-338.

- Enna SJ, Kuhar M, Snyder SH (1975): Regional distribution of postsynaptic receptor binding for gamma-aminobutyric acid (GABA) in monkey brain. *Brain Res* 93:168-175.
- Fariello RG, Lloyd KG, Hornykiewicz O (1975): Cortical and sub-cortical projected foci in cats: Inhibitory action of taurine. *Neurology* 25: 1077-1083.
- Frankenhaeuser B, Hodgkin AL (1957): The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol* 137:218-244.
- Fregyensi TL, Lombardini LB (1978): Lack of correlation between taurine levels in 16 brain regions and paroxymal discharges in the thalamo cortical circuit. *Neurosci Lett* 7:213-217.
- Fromageot C, Chatagner F, Bergeret B(1948): La formation d'alanine par désulfation enzymatique de l'acide L-cysteinsulfonique. *Biochem Biophys, Acta* 2:294-301.
- Gaito J (1976): The Effect of taurine on various stages of the kindlig process. A summary of results. *Bull Psychon Soc* 7:397-400.
- Galindo J, Rudomin P (1978): Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine. *Neuroscience Letters* 10:299-304.
- Galvan M, Grafe P. Bruggencate G (1982): Convulsive action of 4-aminopyridine on neurons and Extracellular K and Ca Activities in guinea pig olitaxy cortex slices: en *Physiol and Pharmacol of Epileptogenic Phenomena* (ed) Klee MR Raven Press, New York pp.354-360.
- Gilbert DL, Ehrenstein (1969): Effects of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determinations of surface charge. *Biophysical V.* 9:447-463.
- Groner B, Hynes H, Sippel A, Schutz 6 (1976) *Nature* 261:601-603.

- Gruener R, Bryant HJ (1975): Excitability modulation by taurine: Actions on axon membrane permeabilities. *J Pharmacol Exp Ther* 194:514-521.
- Gruener R, Markovitz D, Huxtable R, Bressler R (1975): Excitability modulation by taurine: Transmembrane measurements of neuromuscular transmission. *J of the Neurological Sciences* 24:351-360.
- Gundersen CB, Jenden DV (1981): Studies of the effects of agents which alter calcium metabolism on acetylcholine turnover in the rat diaphragm preparation. *Br. J. Pharmacol* 72: 461-470.
- Guidotti A, Badiani G, Pepeu G (1972): Taurine distribution in cat brain. *J. Neurochem* 19:431-435.
- Guion-Rain MC, Chatagner F (1972): Rat liver cysteine sulfenate decarboxylase: Some observations about substrate specificity. *Biochim Biophys Acta* 19:66-73.
- Haas HL, Hosli L (1973): The depression of brain stem neurons by taurine and its interactions with strychnine and bicuculline. *Brain Res* 52: 399-402.
- Hammerstadt JP, Murray KE, Cuttler RWP (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.
- Hajós F (1975): An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res* 93:485-489.
- Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY (1975): Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188:949-951.
- Heinemaun V, Konnerth A, Lourel H, Lux HD, Pumain R (1982): Changes in Extracellular free- Ca in normal and epileptic sensorimotor cortex of cats. *Physiology and Pharmacology of Epileptogenic phenomena.* ed Klee MR, Raven Press New York 29-31.

- Heuser JE (1977): Synaptic vesicle exocytosis revealed in quick-frozen frog neuromuscular junctions treated with 4-aminopyridine and given a single electric shock. "Approaches to the Cell Biology of Neurons".
- Conan WM, Firrendelli JA (eds) Soc of Neurosci Symp 2:215-239.
- Hruska RE, Huxtable R, Bressler R, Yamamura H (1976): Sodium dependent high affinity transport of taurine into rat brain synaptosomes. Proc West Pharmacol Soc. 19:152-156.
- Hruska RE, Huxtable R, Yamamura HI (1978): High-affinity, temperature-sensitive, and sodium-dependent transport of taurine in rat brain.
- Barbeau A, Huxtable R (eds): "Taurine and Neurological Disorders". New York, Raven Press, pp 109-117.
- Huxtable R (1976) Metabolism and function of taurine in the heart. in Taurine. Huxtable R, Barbeau A. Raven Press New York pp 99-119.
- Huxtable R, Bressler R (1972): Taurine a isetionic acid: distribution and interconversion in the rat. J Nutr 102:805-814.
- Huxtable R, Bressler R (1973): Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. Biochimica et Biophysica Acta 323:573-583.
- Huxtable R, Bressler K (1976): The metabolism of cysteamine to taurine. En: Taurine (ed) R Huxtable, A Barbeau pp. 48-58. Raven Press New York.
- Huxtable R, Laird H (1978): The prolonged anticonvulsant action on genetically determined seizure susceptibility. Canad J Neurol Sci 5:215-221.
- Huxtable R, Lippincott SE (1982): Relative contribution of diet and biosynthesis to the taurine content of the adult rat. Drug-Nutrient Interact 1:153-168.
- Iwata H, Yamagami S, Lee E, Matsuda T, Barba A (1979): Increase of brain taurine contents of El mice by physiological stimulation. Japan J Pharmacol 29:503-507.

- Izumi K, Donaldson J, Munnich J, Barbeau A (1973): Ouabain-induced seizures in rats: Suppressive effects of taurine and gamma-aminobutyric acid. *Canad J Pharmacol* 51:885-889.
- Izumi K, Igisu H, Fukenda T (1974): Suppression of Seizures by taurine-specific or nonspecific? *Brain Res* 76:171-173.
- Izumi K, Igisu H, Fukada K (1975): Effect of edetate on seizure suppressing actions of taurine and GABA. *Brain Res* 88:576-579.
- Izumi K, Rober F, Butterworth, Barbeau A (1977): Effects of taurine on calcium binding to microsomes isolated from rat cerebral cortex. *Life Sciences* 20:945-950.
- Jacobsen JG, Smith LLH (1972): Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev* 48:424-511.
- Johns A, Golko DS, Larzon PA, Paton DM (1976): The potentiating effects of 4-aminopyridine on adrenergic transmission in the rabbit vas deferens. *Eur J Pharmacol* 38:71-78.
- Kaczmarek LK, Adey LK, Adey WR (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.
- Kaczmarek LK, Davison AN (1972): Uptake and release of taurine from rat brain slices. *J Neurochem* 19:2355-2562.
- Khan AR, Edman KAP (1979): Effects of 4-aminopyridine on the excitation contraction coupling in frog and rat skeletal muscle. *Acta physiologica scandinavica* 105:443-452.
- Kirpekar M, Kirpekar SM, Prat JC (1977): Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation. *J Physiol Lond* 272:517-528.
- Kontro P, Marnela KM, Oja SS (1980): Free amino acids in the synaptosome and synaptic vesicle fractions of different bovine brain-areas. *Brain Res* 184:129-141.

Kramer JH, Chovan JP, Schaffer SW (1981): Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. Am J Physiol 240: (Heart Circ. Physiol 9) H238-H246.

Kuriyama K, Muramatsu M, Nakagawa K, Kakita K (1978): Modulating role of taurine on release of neurotransmitter and calcium transport in excitable tissues. Barbeau A, Huxtable R (eds): "Taurine and Neurological Disorders". New York, Raven Press, pp 201-216.

Lahdesmaki P, Karpainen A, Saarni HY, Winter R (1977): Amino acids in the synaptic vesicle fraction from calf brain: content, uptake and metabolism. Brain Res 184:295-308.

Lahdesmaki P, Oja SS (1973): On the mechanism of taurine transport at brain cell membranes. J Neurochem 20:1411-1417.

Laird H, Huxtable R (1976): Effect of electrical stimulation on audiogenic seizure response in rats. Huxtable R, Barbeau A (eds): "Taurine" New York: Raven Press, pp 267-274.

Laird H, Huxtable R (1978): Taurine and audiogenic epilepsy. Barbeau A, Huxtable R (eds): "Taurine and Neurological Disorders" New York: Raven Press, pp 339-357.

Laird H, Lippincott SE, Huxtable R (1980): Contribution of dietary taurine to total body taurine in rat. Fed Proc 39:1045.

Lamarka V, Collier B (1983): Effects of 4-aminopyridine on the Cat Superior Cervical ganglion. J of Pharmacol and Exp Ther 226(1):249-257.

Leach MJ (1979): Effect of taurine on release of ^3H -GABA by depolarizing stimuli from superfused slices of rat brain cerebral cortex in vitro. J Pharm Pharmacol 31:533-535.

Leander S, Arner A, Johansson B (1977): Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro. Eur J Pharmac 46:351-361.

- Lemeignan M (1972): Analysis of the action of 4-aminopyridine on the cat lumbar spinal cord-I. Modification of the afferent volley, the monosynaptic discharge amplitude and the polysynaptic evoked responses. *Neuropharmacology* 11:551-558.
- Lemeignan M (1973): Analysis of the effect of 4-aminopyridine on the lumbar spinal cord of the cat-II. Modifications of certain spinal inhibitory phenomena. post-tetanic potentiation and dorsal root potential. *Neuropharmacology* 12:641-651.
- Levine WG (1970): Heavy-metal antagonist. In: L-Goodman and A Gelman (Eds) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 4th ed., MacMillan London pp 944-957.
- Llinás P, Thesleff S (1978): 4-aminopyridine and evoked transmitter release from motor nerve endings. *Br J. Pharmac* 64: 623-629.
- Llinás R, Walton K, Bohr V (1976): Synaptic transmission in squid giant. Synapse after potassium conductance blockage with external 3 and 4 amino pyridine. *Biophys J* 16:83-86.
- Lombardini JB (1976) Regional and subcellular studies on taurine in the rat central nervous system. In *Taurine* ed. R Huxtable and Barbeau A. pp 311-326, Raven Press, New York.
- Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lundh H (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res* 153:307-318.
- Lundh H, Leander S, Thesleff S (1977): Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat. *J Neurobiol* 32:29-43.
- Lundh H, Thesleff S (1977): The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. *Eur J. Pharmac* 42: 411-412.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- MacDonald RL, Mclean MS (1982): Cellular Bases of Barbiturate and Phenytoin anticonvulsant Drug action *Epilepsia* 23(1): 517-518.
- Meldrum B, Murugaiah K (1983): Anticonvulsant action in mice with sound-induced seizures of the optical isomers of γ -level-GABA. *Eur J Pharmacol* 89:149-152.
- Molgó J (1978): Voltage-clamp analysis of the sodium and potassium current in skeletal muscle fibres treated with 4-aminopyridine. *Experientia* 34:1275-1276.
- Molgó J, Lemeignan M, Lechat P (1977): Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. *J Pharm exp Ther* 203:653-661.
- Moretoki H, Taki M, Nakamoto N, Ishida Y (1978): Actions of aminopyridines on guinea pig ileum. *Archs Int. Pharmacodyn Ther* 232:28-41
- Mutani R, Bergamini L, Delsedime L (1974): Effects of taurine in chronic experimental epilepsy. *Brain Res* 79:330-332.
- Mutani R, Bergamini L, Durelli L (1978): Taurine in experimental and human epilepsy. Barbeau A, Huxtable R (eds): "Taurine and Neurological Disorders" New York: Raven Press, pp 359-374.
- Mutani R, Bergamini L, Fariello R, Delsedime M (1974): Effects of taurine on cortical acute epileptic foci. *Brain Res* 70:170-173.
- Mutani R, Durelli L, Mazzarino M, Valentini C, Monaco F, Fumero S, Mondini A (1977): Longitudinal changes of brain amino acids content occurring before, during and after epileptic activity, *Brain Res* 122:513-521.
- Namina M, Okamoto K, Sakai Y (1983): Modulatory action of taurine on the release of GABA in cerebellar slices of the guinea pig. *J Neurochem* (40) 1:1-9.
- Olsen RW (1981) The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Mol. and Cell. Biochem.* 39:261-279.

- Pasantes-Morales H, Ademe RM, López-Colomé AM (1979): Taurine effects on $^{45}\text{Ca}^{++}$ transport in retinal subcellular fractions. *Brain Res* 172:131-138.
- Pasantes-Morales H, Ademe RM, Quesada O (1981): Protective effect of taurine on the light-induced disruption of isolated frog rod outer segments. *J Neurosci Res* 6:337-348.
- Pasantes-Morales H, Bonaventure N, Wioland N, Mandel P (1973): Effect of intravitreal injection of taurine and GABA on chicken ERG. *Int J Neurosci* 5:235-241.
- Pasantes-Morales H, Chaparro H, Otero E (1981): Estudio clínico sobre el efecto de la taurina en epilepticos incontrolables. *Rev. Inves Clin (Mex)* 33:373-378.
- Pasantes-Morales H, Gamboa A (1980): Effect of taurine on $^{45}\text{Ca}^{++}$ accumulation in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 34:244-246.
- Pasantes-Morales H, Morán J (1981): Taurine as a neuromodulator: its action on calcium fluxes on neurotransmitter release in Tapia⁵R y Catman C. *Regulatory mechanisms of synaptic transmission Plenum Publishing Corporation* pp 141-154.
- Pasantes-Morales H, Quesada O, Cárabez A, Huxtable R (1983): Effects of the taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate, and -alanine on the morphology of rat retina. *J Neuroscience Res* (9) 2:135-143.
- Peck EJ, Awapara J (1967): Formation of taurine and isethionic acid in rat brain. *Biochem Biophys Acta* 141:499-506.
- Perry TL, Berry K, Hansen S, Kiamond S, Mok C (1971)^a: Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. *J Neurochem* 18:531-535.
- Perry TL, Hansen S, Berry K, Mok C, Lesk K (1971)^b: Free amino acids and related compounds in biopsies of human brain. *J Neurochem* 18:521-528.
- Perry TL, Hansen S, Kennedy J, Wada J, Thompson GB (1975): Amino-acids in human epileptogenic foci. *Arch Neurol* 32:752-754.

Roches JC, Fassler A, Zumstein JR, Scollolog G, Hosli L (1978): Action of taurine and glycine on strychnine-induced convulsions in rabbit.

Experientia 34:902.

Roches JC, Zumstein HR, Fassler A, Scillo-Lavizzari G, Hosli L (1979): Effects of taurine, glycine and GABA on convulsions produced by strychnine in the rabbit. Eur Neurol 18:26-32.

Sandburg PR, Willow (1980): Dose-dependent affects of taurine on convulsions induced by hypoxia in the rat. Neurosci Lett 16:297-300.

Sbarbaro V (1974): Electroclinical effects of taurine in some epileptic patients. Preliminary results. Acta Neurol (Napoli) 29:33-37.

Schmidt SY, Berson EL (1978): Taurine in retinal degenerations. Barbeau A, Huxtable R (eds): "Taurine and Neurological Disorders" New York: Raven Press, pp 281-287.

Schmid R, Sieghart W, Karobath M (1975): Taurine uptake in synaptosomal fractions of the rat brain cortex. J Neurochem 25:5-9.

Shaffer WT, Olson MS (1976) Chlorotetracycline-associated fluorescence changes during calcium uptake and release by rat brain synaptosomes. J. Neurochem 27: 1319-1325.

Shank RP, Aprison MH (1970): The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas of the rat nervous system J. Neurochem 17:1461-1475.

Sieghart W, Heckl K (1976): Potassium evoked release of taurine from synaptosomes fractions of rat cerebral cortex. Brain Res 116:538-543.

Snyder SS (1975): The glycine synaptic receptor in the mammalian central nervous system. Br J Pharmacol 53:475-484.

Spaeth R, Bressler R (1972): Taurine Metabolism. Huxtable R, Barbeau A (eds): "Taurine" New York: Raven Press, pp 35-44.

Striano S, Grasso A, Buscaino GA, Perretti P (1974): Primi risultati sugli effetti della ipilesia umana. Acta Neurol (Napoli) 29:537-542.

- Stuirmau JA (1973): Taurine pool sizes in the rat: effects of vitamin B deficiency and high taurine diet. *J Nutr.* 103:1566-1580.
- Siepvilai PA, Mannoneu A, Latobath M (1982) Modulation of GABA binding sites by CNS depressants and CNS convulsants. *Neurochem Int.* 4(4) 259-268.
- Tapia R (1982): Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine, and lanthanum. *Neuroscience Letters* 30:73-77.
- Tapia R, Sitges M (1982): Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res* 250:291-299.
- Tapia R, Sitges M, Morales E (1983): Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes (enviado a publicación)
- Thursby MH, Nevis AH (1974): Anticonvulsant activity of taurine in electrically and osmotically induced seizures in mice and rats. *Fed Proc* 33:1494-1474.
- Tiedemann F, Gmelin L (1827): Einige neue Bestandtheile der Galle des Oschen. *Ann. Physik. Chem* 9:326-337.
- Tsukada Y, Inoue N, Donaldson J, Barbeau A (1974): Suppressive effects of various amino acids against ouabain-induced seizures in rats. *Canad J Neurol Sci* 1:214-221.
- Urquhart N, Perry TL, Hansen S, Kennedy J (1974) Passages of taurine into adult mammalian brain. *J Neurochem* 22:871-872.
- Van bogaert Snyders (1982): Effects of 4-aminopyridine on Inward Rectifying and Pacemaker currents of cardiac Purkinje Fibres. *Pflugers Arch* 394: 23-238.
- Van Gelder NM (1972) Antagonism by taurine of cobalt induced epilepsy in cat and mouse. *Brain Res* 46:157-165.

- Van Gelder NM (1976): Rectification of abnormal glutamate levels by taurine. Huxtable R, Barbeau A (eds); "Taurine" New York: Raven Press pp 293-302.
- Van Gelder NM (1978): Glutamic acid and epilepsy: The action of taurine. Barbeau A, Huxtable R (eds): "Taurine and Neurological Disorders" New York: Raven Press, pp 387-402.
- Van Gelder NM, Courtois A (1972)^a: Close correlation between changing content of specific amino acids in epileptogenic cortex of cats, and severity of epilepsy. Brain Res 43:477-484.
- Van Gelder NM, Koyama I, Jasper HH (1977): Taurine treatment of spontaneous chronic epilepsy in a cat. Epilepsia 18:45-54.
- Van Gelder NM, Sherwin AL, Sacks C, Anderman F (1975): Biochemical observations following administration of taurine in patients with epilepsy. Brain Res 94:297-306.
- Vizi ES, Van Kuk J, Foldes FF (1977): The effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release. J Neural Transm 41:265-274.
- Wada JA, Osawa T, Wake A, Corcoran ME (1975): Effects of taurine on kindled amigdaloid seizures in rats, cats and photosensitive baboons. Epilepsia 16:229-234.
- Wide W, Loffelholz K (1980): 4-aminopyridine antagonizes the inhibitory effect of pentobarbital on acetylcholine release in the heart. Naunyn-Schmiederberg's Arch Pharmacol 312:7-13.
- Wheler GHT, Osborne RH, Bradford HF, Davison AN (1977): Uptake studies of taurine in vivo and its effects on the course experimental focal epilepsy in rats. Brain Res 136:535-542.
- Welty MC, Welty JD, McBroom JM (1982): Effect of isoproterenol and taurine on heart calcium in normal and cardiomyopathic hamsters. J of Molecular and Cellular Cardiology 14:353-357.

Wollmer P, Wohlfart B, Khan R (1979): Effects of 4-aminopyridine on isolated papillary muscles of the rabbit. Acta physiol scand 30.

Yanagisawa T, Taira N (1979): Positive inotropic effect of 4-aminopyridine on dog ventricular muscle. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmac 307:207-212.

Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH, Narahashi T (1976): Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane J Gen Physiol 68:519.

Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH, Narahasi T (1976): Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. Biophys J 16:77-81.