

190
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"INTERACCION DE LA TAURINA CON LA MEMBRANA DEL
SEGMENTO EXTERNO DEL FOTORRECEPTOR"

Tesis

Que para obtener el título de Bióloga

Presenta

Magdalena Sotelo López



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.

I N D I C E

INTRODUCCION	8
1. El fotorreceptor	
2. La taurina	
3. Efectos farmacológicos de la taurina	
4. La taurina en la retina	
5. Transporte de taurina en la retina	
6. Efectos estabilizadores de la taurina en la retina	
MÉTODOS	25
RESULTADOS	27
DISCUSION Y CONCLUSION	42
BIBLIOGRAFIA	48

INTRODUCCIÓN

Las formas, los colores y el movimiento son parte de nuestra percepción del mundo externo debido a la presencia de un tejido neural especializado, la retina, que recibe el estímulo visual y lo transmite al cerebro en forma de señales nerviosas.

La retina está constituida por tres tipos de neuronas principales conectadas sucesivamente, del exterior al interior, estas son los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares. Además existen otros dos tipos neuronales, las células horizontales y células amácrimas con las cuales hacen conexiones las neuronas principales. A lo largo de toda la retina se encuentran células de neuroglia (células de Müller), que separan a unas neuronas de otras, otro tipo de células neuronales son las células interplexiformes que hacen conexiones entre la capa plexiforme interna y la externa. Estas neuronas no han sido descritas en las retinas de todas las especies. En función de la disposición de los núcleos celulares y las prolongaciones de estas células se distinguen los siguientes estratos mostrados en la figura 1 (Dowling y Boycott, 1966).

1. Epitelio pigmentario.- Tejido accesorio, íntimamente relacionado con la retina, está constituido por un epitelio cúbico simple no neural, cuya membrana interna presenta numerosas digitaciones que rodean a los pigmentos externos. El papel de estas células epiteliales es importante en la regulación del crecimiento y recambio del segmento externo del fotorreceptor.
2. Estrato de fotorreceptores.- Está constituido por el segmento externo e interno de estas células, los cuales se encuentran unidos por un cilio verdadero.
3. Membrana limitante externa.- Se integra por los pies terminales de las células de Müller, los cuales se aplanan y se conectan entre sí.
4. Capa nuclear externa.- Corresponde a los núcleos de los fotorreceptores.
5. Capa plexiforme externa.- Se encuentra integrada por las sinapsis que se establecen entre los fotorreceptores, las células bipolares y horizontales.
6. Capa nuclear interna.- Contiene los núcleos de células hori

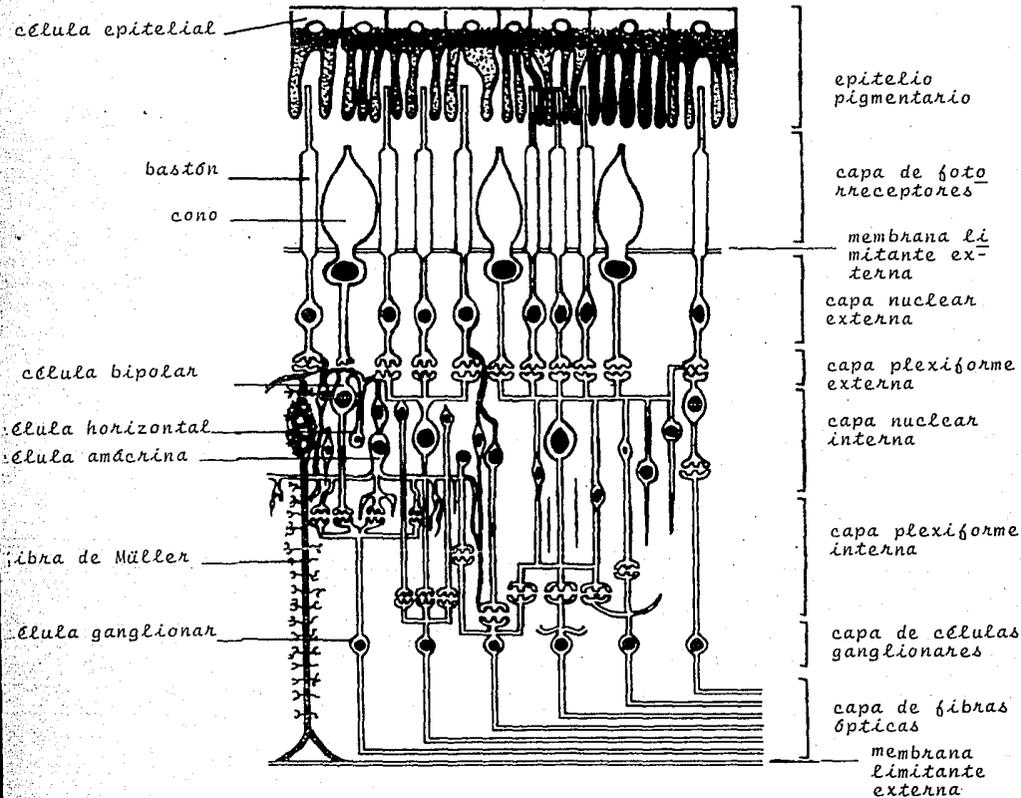


Figura 1.- Capas de la retina de los vertebrados.

zontales, bipolares, amácrimas y de las células de Müller.

7. Capa plexiforme interna.- Representada por los contactos sinápticos entre células bipolares con las células amácrimas y ganglionares.
8. Capa de células ganglionares.- Está integrada por los somas de varios estratos que corresponden a neuronas múltiples.
9. Capa de fibras ópticas.- Se forma por los axones de las células ganglionares que en su conjunto constituyen el nervio óptico.
10. Membrana limitante externa.- Está formada por prolongaciones citoplasmáticas aplanadas de células de Müller que se conectan entre sí apoyadas en una membrana basal. [Correa, 1979; Rodieck y Col., 1973; Romer, 1973; Welch y Col., 1973 y Wolken, 1975].

EL FOTORRECEPTOR

El fotorreceptor es la célula nerviosa encargada de la transducción del estímulo luminoso en el lenguaje iónico y eléctrico que reconocen las neuronas, lo que permite el análisis de la información visual en el cerebro. La especialización funcional de esta célula depende de una compleja estructura (Fig. 2). En los vertebrados existen dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones. Los bastones responden a estímulos tenues, mientras que los conos operan a niveles luminosos elevados, además de responder a diferentes longitudes de onda. Ambos tipos de fotorreceptores tienen organelos especializados para el mecanismo de la transducción. En un extremo de la célula se localiza el segmento externo el cual es cilíndrico en los bastones y cónico en los conos, esta estructura está formada por una gran superficie membranal, en ambos casos se forma por el plegamiento de la membrana plasmática, sin embargo, en los bastones se separa formando internamente un apilamiento de discos cuya membrana está separada físicamente de la membrana plasmática (Fig. 3). (Choen, 1969; Miller, 1960 y Young, 1969). Los pigmentos visuales de los fotorreceptores constituyen la mayor parte del segmento externo (Wolken, 1975). La estimulación de estos pigmentos por la luz ocasiona cambios químicos en dichos pigmentos, iniciando así el proceso de fototransducción. Todos los pigmentos visuales conocidos de los vertebrados están constituidos sobre el mismo patrón general consistiendo en una proteína, opsina, combinada por un isómero del aldehído de la vitamina A. En

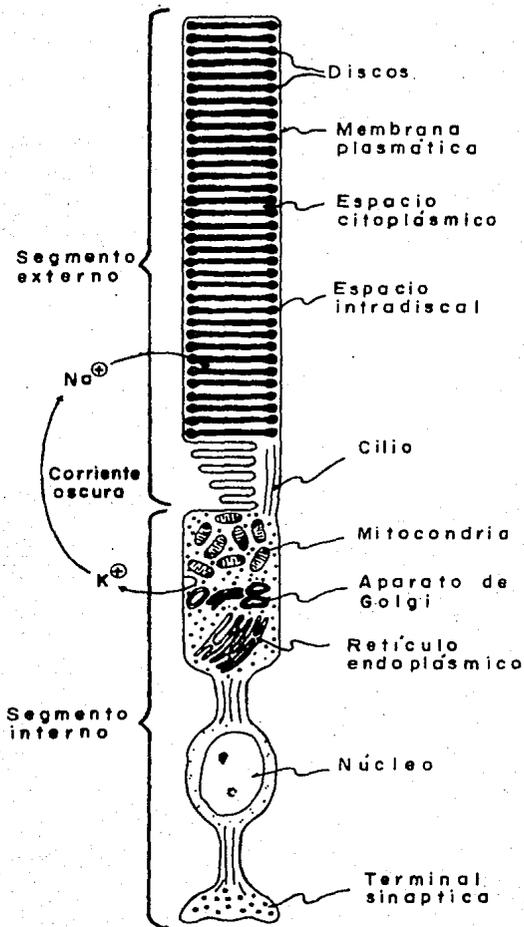


Figura 2.- Estructura de una célula fotorreceptora, bastón.

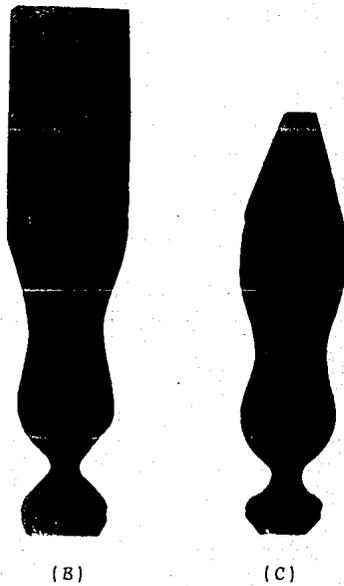


Figura 3.- Células fotorreceptoras presentes en la retina:
B) Bastón; C) Cono.

Los conos, las distintas propiedades de absorción se deben a las apoproteínas idopsina y sianoxina (Wolken, 1975) las cuales modulan la longitud de onda de absorción del retinal permitiendo la visión de color.

El proceso de la fototransducción comienza con la absorción de luz por el 11 *cis*-retinal, que es el grupo prostético de la rodopsina, contenida en los bastones, el cual se isomeriza dando lugar al *trans*-retinal, cuya estructura induce un cambio conformacional en la rodopsina. La rodopsina fotoactivada es capaz de activar a una proteína membranaral, llamada transducina, constituida por tres subunidades α , β y γ . Al unirse la rodopsina a la transducina se recambia el GDP, unido a la subunidad α , a GTP dando lugar a un complejo α -GTP separado de las subunidades β y γ . Existe también otra proteína membranaral, la fosfodiesterasa (PDE) formada por las subunidades α , β y γ , el complejo α -GTP de la transducina se une a la subunidad de dicha proteína formándose el complejo α -GTP- γ -PDE liberando la actividad de la PDE, la que degrada el GMP cíclico (GMPC) al disminuir la concentración de GMPC se cierran los canales de sodio disminuyendo la entrada de sodio a través de una conductancia sensible a la luz (corriente oscura de sodio) lo que provoca una hiperpolarización, que constituye la señal que inhibe la liberación del neurotransmisor en la sinapsis con las células horizontales y bipolares, iniciando el proceso de transmisión de información visual en la retina (Fig. 4). (Schnapf y Col., 1987).

Mediante técnicas electrofisiológicas de registro en áreas de membrana (path-clamp) se ha demostrado que el GMPC regula la entrada de sodio al segmento externo durante la oscuridad. El estímulo luminoso disminuye directamente la cantidad de GMPC lo que impide la entrada de sodio dando lugar a la hiperpolarización que, al extenderse hacia el segmento interno, constituye la señal iónica que permite la transmisión de información.

Aparentemente se requieren tres o más moléculas de GMPC para mantener abierto el canal. (Schnapf y Col., 1987).

La visión en color opera bajo el mismo mecanismo general, pero la selección del color se lleva a cabo en los conos y se debe a la presencia de tres apoproteínas distintas, las cuales, unidas al *cis*-retinal regulan las propiedades de absorción de este compuesto en diferentes longitudes de onda.

El mecanismo de fototransducción depende de la adecuada estructura membranaral del fotorreceptor. Característicamente esta membrana tiene un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados. (Daemen, 1973).

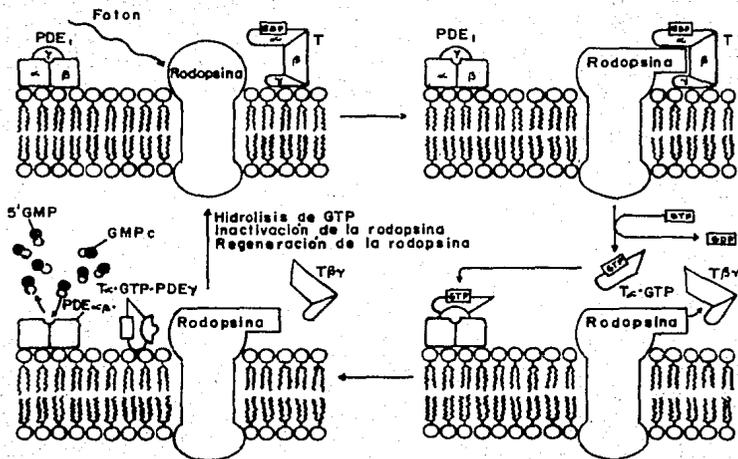


Figura 4.- Secuencia de eventos durante el proceso de fototransducción.

Los cuales proveen a la membrana de la alta fluidez y el micro ambiente específico para el proceso de fototransducción. (Wheeler y Col., 1975).

Sin embargo, esta característica da vulnerabilidad particular a la estructura del fotorreceptor a procesos peroxidativos, - que aunada al elevado metabolismo oxidativo de la retina, así como a la formación de radicales libres activos, debido a la reactividad de la rodopsina a la luz, puede dar por resultado la propagación de la peroxidación lipídica, lo que causa la -- desintegración de la estructura membranar y con esto la pérdida de las funciones de fototransducción y el procesamiento de la información visual (Pasantes-Morales y Cruz, 1984).

El mantenimiento de la estructura del fotorreceptor parece depender de un aminoácido libre, la taurina, la cual se encuentra en grandes concentraciones en la mayoría de los tejidos excita bles, particularmente la retina.

Modelos experimentales de deficiencia en taurina en el gato -- (Hayes y Col., 1975) y la rata (Quesada y Col., 1984) demuestran claramente que la disminución de taurina en la retina genera alteraciones en la estructura de los fotorreceptores que, posteriormente, se extienden causando la ceguera (Fig. 5).

LA TAURINA

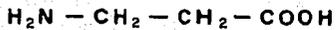
La taurina es un aminoácido azufrado (ácido- α -aminoetano sulfónico, Fig. 6) que no forma parte de las proteínas y parece ser un componente universal de los tejidos animales. Las concentraciones más elevadas de taurina se encuentran en tejidos excitables y en glándulas de secreción (Jacobsen, 1968). La taurina, para algunas especies, es un aminoácido esencial, en otras, como la rata, su biosíntesis se lleva a cabo a partir de la cisteína (Fig. 7) mediante diversas reacciones que involucran distintas enzimas como la cisteína-dioxigenasa, la cual oxida a la cisteína, dando lugar al ácido cisteína sulfónico, el cual es descarboxilado por la cisteína sulfinato descarboxilasa (CSD), formando así la hipotaurina. La oxidación de la hipotaurina es el paso final de las reacciones de síntesis. En diferentes especies como el gato, el mono y el hombre, la taurina se sintetiza durante el desarrollo pero en el estado adulto dicho aminoácido se sintetiza en menor grado ya que la actividad de la CSD es muy baja, por lo tanto estos organismos dependen de manera importante de la dieta para el suministro de taurina a los tejidos. (Hayes y Col., 1981)



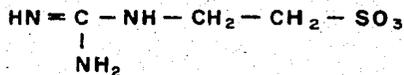
Figura 5.- Corte transversal de la retina a nivel del estrato de fotorreceptores. Efecto de la deficiencia en Taurina: a) Ratas tratadas con guanidino etano sulfonato (GES); b) Gatos con una dieta deficiente en Taurina.



Taurina



β -Alanina



GES

Figura 6.- Estructura de la Taurina y de sus análogos estructu
rales del grupo amino y grupo sulfonato.

El recambio de taurina en los tejidos es acelerado debido principalmente a una rápida tasa de excreción, ya que las pequeñas cantidades de ácido isetiónico y de sulfato inorgánico producidos indican que la degradación es lenta. El alto contenido de taurina en los tejidos y su elevada velocidad de excreción supone la presencia de mecanismos eficaces de captura del aminoácido en los tejidos, los cuales han sido descritos en los distintos tipos celulares. (Lombardini, 1978).

EFFECTOS FARMACOLOGICOS DE LA TAURINA

La taurina se encuentra distribuida heterogéneamente en el sistema nervioso central (SNC), así en corteza cerebral, hipocampo, bulbo raquídeo y cerebelo, se encuentra en concentraciones elevadas (Collins, 1974; Guidotti, 1972; Shank, 1970).

Se ha probado que la taurina tiene un efecto anticonvulsivante (Van Gelder y Col., 1972-1975) en modelos experimentales de epilepsia así como en pacientes epilépticos (Izumi y Col., 1974-1976; Joseph, 1976; Van Gelder, 1972; Sbarbaro, 1974; Striano, 1974). La acción que se ha propuesto para el efecto anticonvulsivante de la taurina es un efecto de disminución o inhibición de la excitabilidad nerviosa debido probablemente a que la taurina actúa en la membrana provocando un incremento en la conductancia al cloro dando lugar a una hiperpolarización actuando como un neurotransmisor inhibidor. El GABA y la glicina, que son transmisores inhibidores, antagonizan este efecto hiperpolarizante (Hass, 1973). No se ha encontrado un antagonista específico de la taurina. La acción depresora descrita es generalizada y no específica, por lo que se ha sugerido que la taurina tiene una acción de neuromodulador en la excitabilidad neuronal y no es un neurotransmisor.

Otras de las funciones de la taurina es que produce una acción antiarrítmica (Welty y Col., 1964) y modifica el metabolismo de la glucosa (Van Gelder, 1978).

LA TAURINA EN LA RETINA

En la retina se han encontrado niveles altos de taurina (Lombardini, 1976) dentro del rango de 10 a 50 mM en las diferentes especies de vertebrados. Dentro de este tejido las concentraciones más elevadas corresponden a la capa plexiforme externa, el epitelio pigmentario y los fotorreceptores. Los fotorreceptores, en particular los bastones, son las células que contie-

la mayor concentración de taurina en la retina. Se ha observado que del 60 al 70% del contenido total de taurina en la retina está localizada en los fotorreceptores (Orr y Col., 1976). Dentro de estas células fotosensibles, en el segmento interno es donde hay más cantidad de taurina, sin embargo, es en el segmento externo en donde probablemente se encuentra más concentrada ya que esta porción del fotorreceptor es una estructura primordialmente membranal siendo mínimo el volumen acuoso.

TRANSPORTE DE TAURINA EN LA RETINA

Se ha identificado en la mayoría de las especies un transporte activo de taurina el cual es saturable, sensible a la temperatura y dependiente de gradientes de sodio (Starr, 1973, Dawson y Neal, 1984). El análisis cinético de la captura de taurina en la retina ha revelado un componente de alta afinidad cuya K_m en las distintas especies fluctúa entre 16 y 111 μM y un componente de baja afinidad con valores aparentes de K_m de 281 a 1600 μM .

Por medio del uso de análogos estructurales de la taurina, se ha demostrado que la elevada concentración de este aminoácido en la retina se alcanza mediante sus mecanismos de transporte, que acumulan taurina en contra de un gradiente de concentración 400 veces mayor en el interior celular con respecto al medio circundante (Schmid, 1978) mientras que en la síntesis *in situ* aporta una fracción menor.

EFFECTOS ESTABILIZADORES DE LA TAURINA EN LA RETINA

Se ha planteado la posibilidad de que la taurina tenga una acción como estabilizador membranal, para lo cual tendría que cumplir uno o más de algunos criterios que la definen como tal (Huxtable, 1976), como son: mantenimiento de las funciones de la membrana, protección de las funciones electrofisiológicas y de la integridad de su estructura así como su resistencia a procesos líticos.

La taurina tiene un efecto en la translocación de cationes en diferentes sistemas ya estudiados (Huxtable, 1976) y tiene una acción directa sobre la permeabilidad de la célula en donde probablemente reside su función como estabilizador (Huxtable, 1976).

Aún no se sabe cuál es el papel que desempeña la taurina en los fotorreceptores, sin embargo, la importancia fisiológica de es-

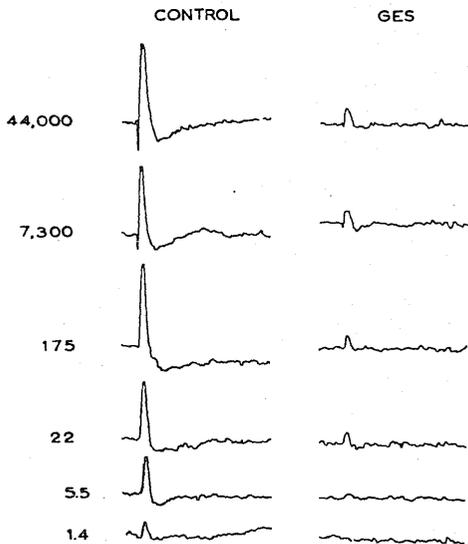
te aminoácido se ha demostrado en estudios realizados in vivo en distintas especies. En un estudio hecho en gatos, los cuales poseen una capacidad limitada de biosíntesis de taurina, y que han sido alimentados con una dieta libre del aminoácido utilizando caseína como una fuente proteica, se observa entre las 15 y 23 semanas un decremento en las concentraciones de taurina en la retina, paralelamente a una desestabilización de los fotorreceptores (Schmid y Col., 1976). Ultraestructuralmente, se ha observado vesiculación, desorientación y desintegración de los segmentos externos en las primeras etapas del tratamiento, hasta terminar con la degeneración y pérdida de todo el estrato de fotorreceptores. En el electroretinograma, medida electrofisiológica de la actividad de la retina, se observa una disminución en las amplitudes de las ondas correspondientes a conos y bastones. Asimismo, al medir las concentraciones de otros aminoácidos en plasma y retina se encontró que éstos se mantienen en sus concentraciones normales mientras que las de taurina disminuyen progresivamente.

En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio con ratas, animales que sí pueden sintetizar taurina, se administró en el agua de beber un inhibidor del transporte de taurina, el análogo guanidino etano sulfonato (GES) el cual disminuye los niveles del aminoácido en distintos tejidos, incluida la retina (Fig. 8). Los resultados de este estudio mostraron una degeneración en la retina y un marcado desorden en la estructura de los fotorreceptores así como la pérdida de la señal del electroretinograma, de manera análoga al observado en el modelo de los gatos (Pasantes-Morales, 1983).

No se sabe aún cuál es el mecanismo molecular del efecto protector que ejerce la taurina sobre las células fotorreceptoras. Sin embargo, el efecto protector descrito in vivo se ha observado en distintos modelos de degeneración in vitro. La exposición de los segmentos externos aislados de fotorreceptores a la luz continua durante una hora produce un daño celular caracterizado por el hinchamiento de la membrana plasmática y los discos dando por resultado una degeneración total (Pasantes-Morales y Col., 1981). Al medir los niveles de peroxidación en este sistema mediante la liberación de malondialdehído se detectó un aumento en la peroxidación en las muestras mantenidas en la luz, que en presencia de taurina se contrarresta (Pasantes-Morales y Col., 1981). Los resultados anteriores llevaron a plantear la hipótesis de que el daño producido se debía a este aumento en la peroxidación y que la taurina funciona como un antioxidante. Sin embargo, en un sistema de peroxidación lipídica inducido in vitro mediante incubación de segmentos externos con sulfato ferroso, se observó que la taurina protege la estructura de los segmentos externos sin modificar los niveles



(A)



(B)

Figura 8.- a) Efecto degenerativo observado en los fotorreceptores de ratas deficientes en Taurina, mediante tratamiento con GES; b) Trazas electroretinográficas de ratas tratadas con GES y de ratas de control sometidas a las intensidades luminosas que se indican en luxes en los números a la izquierda.

de peroxidación inducidos (Pasantes-Morales y Col., 1984). Lo anterior ha llevado a proponer que la función protectora de la taurina no reside en sus propiedades antioxidantes sino probablemente en el control de flujos iónicos que posiblemente se alteran al ser modificado el grado de peroxidación de las membranas.

Se sabe que la taurina participa en la regulación de la permeabilidad iónica de las membranas celulares. En membranas de retina, la taurina modifica la unión de calcio e incrementa la captura de Ca^{2+} dependiente de energía, en tanto que bloquea la permeabilidad pasiva a este catión (Pasantes-Morales, 1979-1982) asimismo modifica la salida de potasio del axón nervioso (Gruener y Bryant, 1975) y evita la entrada de agua y bicarbonato inducido por la luz en preparaciones de segmentos externos aislados (Pasantes-Morales, 1981).

En el presente trabajo se estudió el efecto protector de la taurina en un modelo de degeneración inducido mediante incubación de segmentos externos en un medio libre de calcio y magnesio, esta condición induce una alteración en la estructura del segmento externo similar a la observada al iluminar preparaciones de segmentos externos o a las que se han descrito en animales deficientes en taurina.

Este modelo de degeneración puede ser ventajoso para elucidar el mecanismo de la acción estabilizadora de la taurina ya que está enfocado principalmente a su función en el control de los flujos iónicos indirectamente modula el comportamiento osmótico del agua. Se estudió además la interacción de la taurina con la membrana del fotorreceptor, segmentos externos intactos, discos membranales y membranas aisladas con la finalidad de determinar si existen interacciones diferentes del aminoácido con las membranas, que indirectamente indiquen el sitio probable de su acción protectora.

M E T O D O S

OBTENCIÓN DE SEGMENTOS EXTERNOS

La preparación de segmentos externos se obtuvo de retinas de rana. Brevemente: Las ranas adaptadas a la oscuridad durante dos horas se sacrificaron por decapitación y los ojos se enuclearon inmediatamente. Las retinas se disectaron en medio Krebs-bicarbonato (en mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.17; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 2.5; NaHCO₃, 25 y glucosa 5.6) *in vitro* y los segmentos externos se desprendieron mediante agitación suave, se recuperaron centrifugando a 900g 10 min, todo el procedimiento se llevó a cabo bajo luz roja tenue.

OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS

Los segmentos externos se resuspendieron en los medios indicados para cada experimento y se incubaron en la oscuridad a 25°C durante tres horas. Al final de la incubación, el porcentaje de segmentos externos con la estructura alterada se determinó contando al menos 300 segmentos externos en un microscopio de contraste de fase (NIKON).

TRANSPORTE DE TAURINA EN SEGMENTOS EXTERNOS

El transporte de taurina en los segmentos externos se estudió isotópicamente, los segmentos externos se incubaron en medio Krebs-bicarbonato durante 60 min. en presencia de 2.5 uCi de 3H-*taurina*, al término de la incubación, se centrifugaron a 900 g 10 min. y se lavaron con medio Krebs-bicarbonato, se determinó la radioactividad incorporada en un contador de centelleo para muestras líquidas después de digerir las células con solución (Packard) y en presencia de 5 ml. de tritosol (Fricke, U., 1975).

INTERACCIÓN DE LA TAURINA CON MEMBRANAS Y DISCOS DE FOTORECEPTORES

Obtención de discos.- La preparación de segmentos externos se incubó *in vitro* durante 15 min. en medio hipotónico (10 veces me

nos concentrado que el medio normal, exceptuando los cationes divalentes) y se agitó vigorosamente durante dos min. Los discos se separaron centrifugando a 12000 rpm por 10 min. y se resuspendieron en el medio indicado para cada caso.

Obtención de membranas.- La preparación de discos se sonicó durante 5 minutos en medio hipotónico. Las membranas se recuperaron centrifugando a 30000 rpm durante 10 min. Se resuspendieron en el medio indicado para cada experimento.

La incubación, tanto de membranas como de discos, se llevó a cabo a 25 °C durante una hora en presencia de ^3H -taurina (2.5 uCi/ml) al término de la incubación la preparación se lavó con medio normal y se determinó la radioactividad incorporada en la muestra digerida con solueno 350.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los discos y membranas se prepararon para microscopía electrónica mediante fijación en glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y se posfixaron en tetróxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador. Las muestras incluyeron en Epon 812 y se obtuvieron cortes en un ultramicrotomo (Reichert) Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico Veal 100 B.

INTERACCION DE LA TAURINA EN LA RETINA

Se utilizaron retinas completas de diferentes vertebrados, los cuales se adaptaron a la oscuridad durante dos horas. Estos en sayos se realizaron con una concentración de ^3H -taurina de 2.5 uCi/ml. y un tiempo de incubación de veinte minutos. Concluido el tiempo de incubación, las retinas se lavaron con un medio - Krebs-bicarbonato se pesaron y se disolvieron en 0.2 ml. de NCS. La radioactividad acumulada se midió en un contador de centelleo para muestras líquidas (Packard).

TERMINACION DE PROTEINA

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry (Lowry y Col., 1951), utilizando paralelamente una curva patrón, constituida por concentraciones crecientes de albúmina bovina.

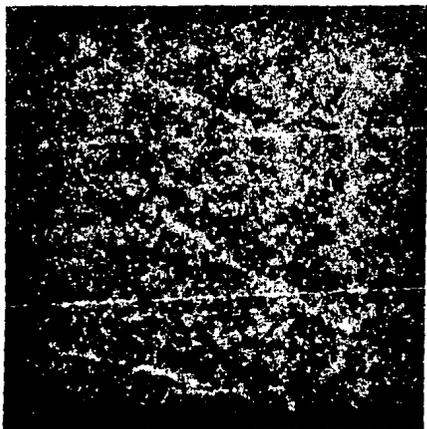
RESULTADOS

En los ensayos realizados con segmentos externos aislados de fotorreceptores de rana se observó que la incubación en ausencia de cationes divalentes (Ca y Mg) en el medio provoca un daño estructural muy marcado, caracterizado por la vesiculación de los discos y una desorientación generalizada de las membranas que se inicia como un hinchamiento en la parte apical de los segmentos externos (Fig. 9). Este fenómeno se vio después de tres horas de incubación a 25°C. El experimento realizado a una temperatura de 37°C muestra el mismo patrón degenerativo a los 20 min. de incubación, mientras que a una temperatura de 4°C no se detecta ningún daño después de tres horas de incubación en dicho medio. Los datos anteriores sugieren que el proceso degenerativo es dependiente de la temperatura. Por la razón anterior todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C excepto donde se indica.

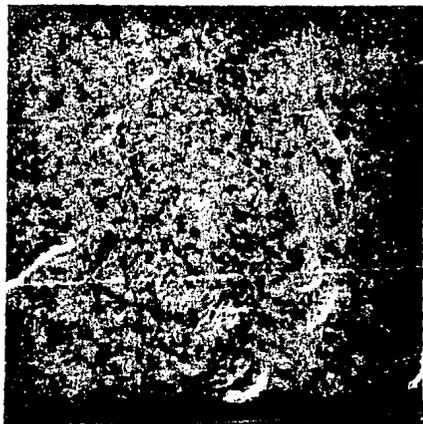
El daño estructural en los segmentos externos no se observa cuando el cloro y el sodio se sustituyen por iones impermeables, esto es, al incubar en un medio libre de sodio sustituido por colina así como en un medio libre de cloro reemplazándolo con gluconato. Los segmentos externos se muestran intactos en ausencia de ambos iones como se puede ver en la figura 10. La apariencia de los segmentos externos en ausencia de cloro o de sodio es igual al control. Las células se encontraron alargadas y los discos no se hicieron evidentes indicando que la estructura de los segmentos externos está intacta. El porcentaje de segmentos externos intactos en el control no es de 100% debido al rompimiento que se produce durante la obtención de la preparación, siendo alrededor del 70% el número de segmentos externos intactos.

Dada la protección proporcionada por la taurina en los modelos de degeneración de segmentos externos inducida por la luz, se probó el efecto de este aminoácido en este sistema.

La presencia de taurina (1-25 mM) en el medio de incubación, proporcionó un efecto protector contra la degeneración producida por el medio libre de cationes divalentes. La estructura de los segmentos externos incubados en presencia de taurina es indistinguible del control. Como puede verse en la figura 11, el efecto protector es dependiente de la concentración de taurina añadida al medio. El máximo efecto se observa a 25 mM en donde el número de segmentos externos con estructura intacta es igual al presente en el control.



(A)



(B)

Figura 9.- Efecto del medio libre de calcio y magnesio sobre la estructura de los segmentos externos. A) Segmentos externos incubados en medio Krebs-bicarbonato durante tres horas a 25° C; B) Incubación de los segmentos externos en un medio sin calcio ni magnesio y en presencia de EGTA 200 μ M.

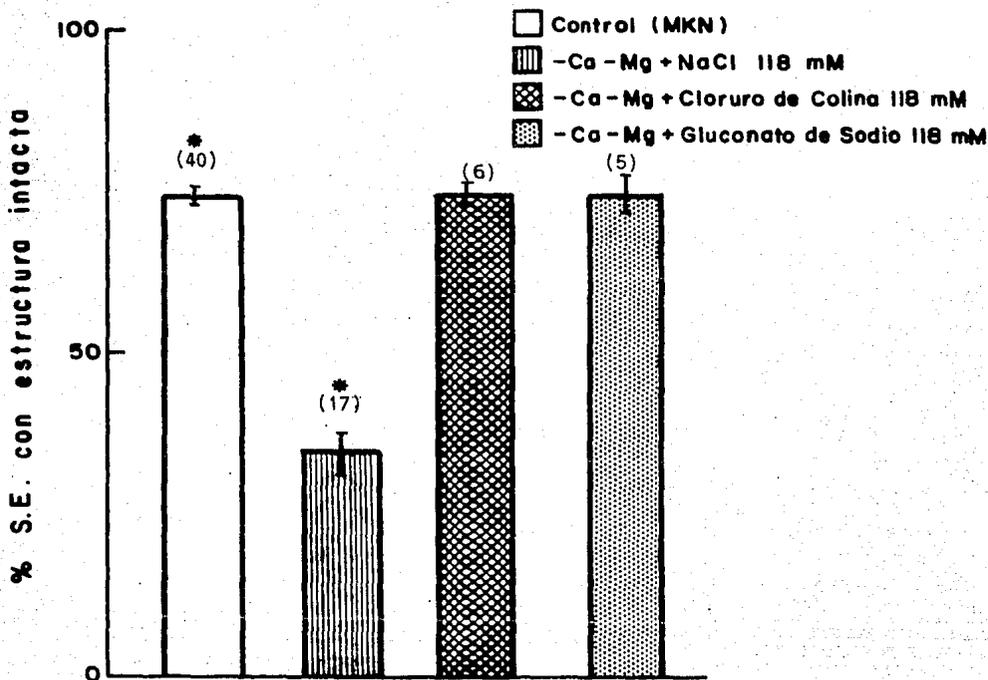


Figura 10.- Efecto del medio sin sodio y sin cloro sobre el daño producido a los segmentos externos en medio sin calcio y magnesio. La incubación se llevó a cabo durante tres horas a 25°C.

* P 0.001

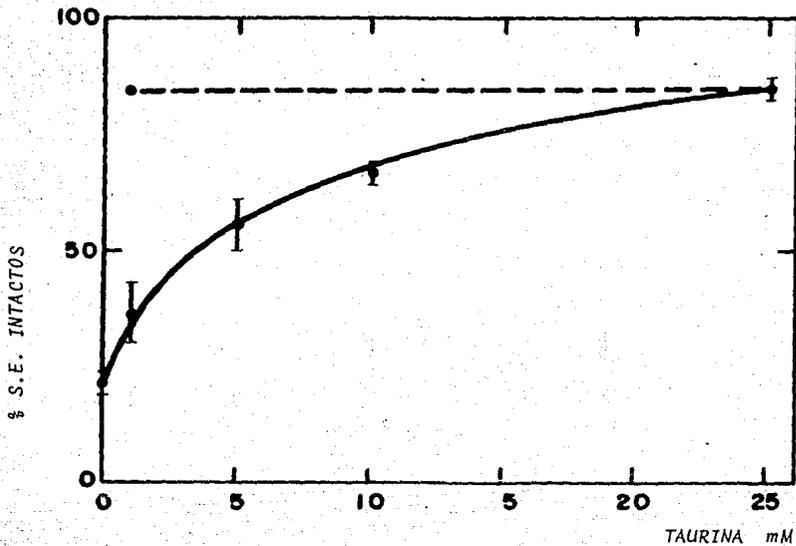


Figura .- Efecto de la Taurina (1-25mM) sobre la desestabilización estructural de los segmentos externos producida por un medio sin calcio y sin magnesio. La incubación se llevó a cabo durante tres horas a 25° C en presencia de las concentraciones indicadas de Taurina. El porcentaje de segmentos externos intactos se determinó por conteo directo de al menos 300 segmentos externos.

En función de las observaciones en relación al efecto protector de la taurina se determinó la interacción de ésta con la membrana del fotorreceptor.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos al incubar una preparación de segmentos externos en presencia de 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$. ^3H -taurina a una concentración final de 100 μM durante 60 minutos. Con base en observaciones previas que indican que la taurina se moviliza bajo condiciones de iluminación y que su captura en preparaciones de retina completa es dependiente de sodio, se estudió el efecto de diferentes condiciones como la luz y oscuridad y el efecto del sodio y la temperatura de incubación. Ninguno de estos factores influye sobre la interacción de baja afinidad de la taurina en el segmento externo. Utilizando la misma preparación de segmentos externos aislados, se estudió la interacción de la taurina a una concentración de 1 μM (Fig. 12). En contraste con los resultados anteriores, en este caso la interacción es dependiente de sodio ya que se dio una disminución del 80% al eliminar este componente del medio. Esta interacción mostró una dependencia considerable de la temperatura de incubación ya que cuando la incubación se realiza a 4°C hay una inhibición total de la captura. Los datos anteriores probablemente indican la presencia de un mecanismo de captura de alta afinidad cuyas funciones dependen de sodio y de energía metabólica.

Tratando de conocer cuál es el sitio en donde la taurina ejerce su efecto protector ante la degeneración de los segmentos externos producida por la incubación en medio sin calcio y sin magnesio, se hicieron experimentos de unión de ^3H -taurina en una preparación de discos de segmentos externos, que representa la superficie interna de la membrana de segmento externo dada la formación de estas estructuras y en vesículas de membranas que representan, tanto la superficie interna como externa, de la membrana del segmento externo. (Fig. 13, tabla 2). Lo anterior indica que la interacción de baja afinidad de la taurina es generalizada en la membrana del segmento externo del fotorreceptor.

TRANSPORTE DE TAURINA EN RETINA

En los estudios con animales deficientes en taurina se ha reportado una degeneración de todo el estrato de fotorreceptores en la retina, además en estudios autoradiográficos de la captura de ^3H -taurina en retina de rana se encontró que las células amácrimas y estratos específicos de los contactos sinápticos internos acumulan grandes cantidades de ^3H -taurina, se estudió

CONDICION		nM ³ H-taurina/mg PROTEINA		
Luz	25°C	27.80 ±	4.57	(4)
Oscuridad	25°C	27.36 ±	3.14	(11)
Luz*	25°C	22.89 ±	3.525	(4)
Oscuridad*	25°C	21.66 ±	1.77	(4)
Luz	4°C	25.22 ±	1.98	(4)
Oscuridad	4°C	23.84 ±	3.27	(4)
Oscuridad	-Na	26.47 ±	4.32	(4)

Tabla 1.- Sistema de transporte de ³H-taurina de baja afinidad. Los segmentos externos se incubaron en presencia de ³H-taurina 2.5 uCi/ml y una concentración final de 100 uM, en un medio normal o en un medio sin sodio, en las condiciones que se indican en la tabla durante 60 min. (excepto en * donde el tiempo fue de 120 min.). Los resultados representan el promedio ± error estándar del número de experimentos indicado entre paréntesis.

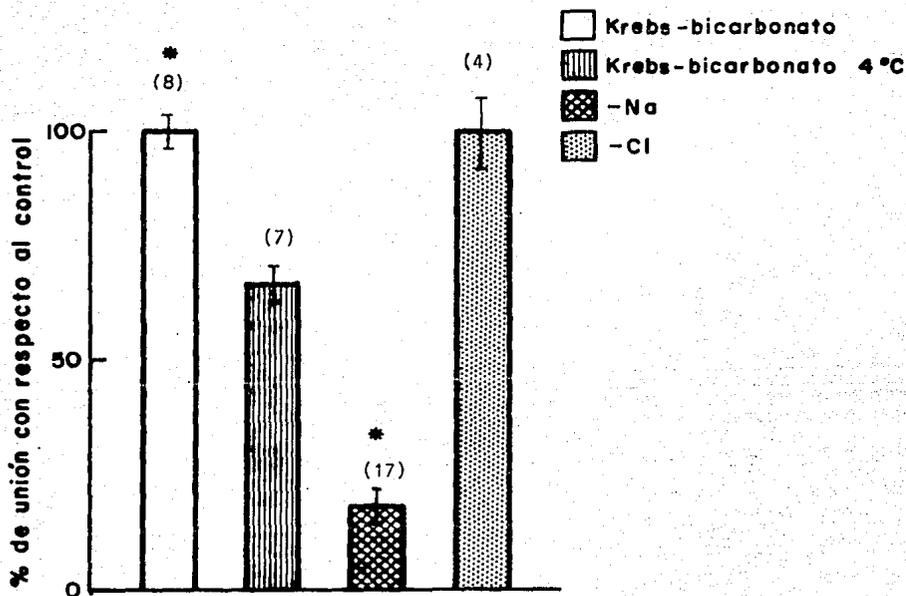
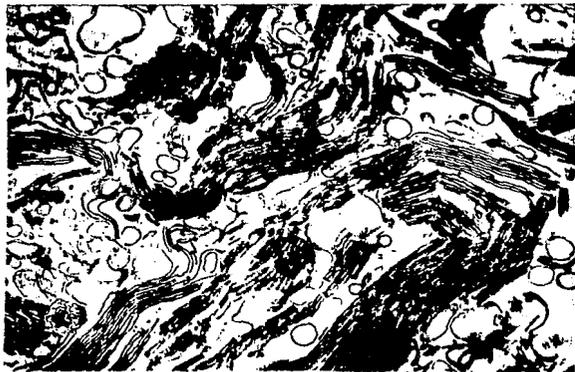
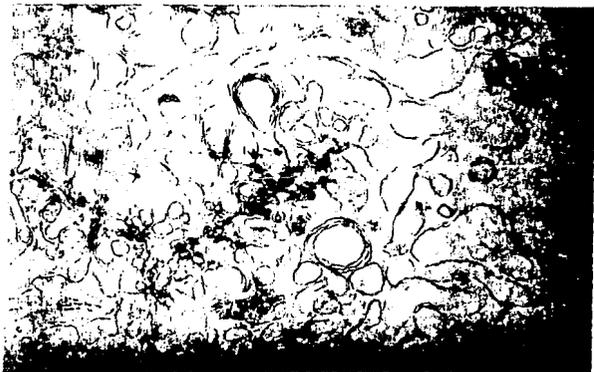


Figura 12.- Efecto de la omisión de sodio y cloro sobre el sistema de transporte de ^3H -taurina de alta afinidad (2.5 uCi/ml, 1 uM). Los segmentos externos se incubaron en medio sin calcio y sin magnesio en presencia y ausencia de los iones sodio y cloro. Se muestra el porcentaje de transporte de ^3H -taurina en relación con la taurina acumulada por la preparación, control en medio Krebs-bicarbonato.

* $P < 0.001$



(A)



(B)

Figura 13.- Micrografías electrónicas de las preparaciones de discos de fotorreceptores (A) y membranas de discos de segmentos externos (B) (a y b 25.000x).

PREPARACION	DPM/ug PROTEINA		
Segmentos externos*	31.75 ±	2.82	(8)
Discos	48.47 ±	2.74	(7)
Membranas*	59.76 ±	14.80	(6)

Tabla 2.- Unión de taurina en segmentos externos, discos y membranas. Se midió la unión de la ³H-taurina 2.5uCi/ml y concentración final de 100 uM, incubándolas durante 60 min. a 25°C. Los resultados se presentan en promedio ± el error estándar del número de experimentos indicado entre paréntesis. * No se encontró diferencia significativa.

la captura de taurina utilizando todo este tejido en las condiciones descritas con el objeto de determinar si los mecanismos mencionados para los fotorreceptores son característica general que comparten todas las células de la retina.

Al explorar la captura en retina de rana se pudo observar que a los 20 min. de incubación a 25°C y taurina 1 μ M la dependencia de sodio fue de un 50.2%, lo cual coincide con la dependencia de sodio encontrada para el caso de los fotorreceptores, sin embargo, estos últimos mostraron una dependencia mayor (Tabla 3) se exploró la posible participación del cloro en la captura de este aminoácido. Al realizar el mismo experimento en un medio de incubación en ausencia de cloro, sustituyéndolo por gluconato, no hubo modificación en el transporte de taurina. El estudio se extendió a diferentes especies y se encontró que en el caso de la rata, la ausencia de sodio inhibe un 77.6% el transporte de 3 H-taurina, mientras que la omisión del cloro redujo un 37% dicho sistema, dadas las características homeotérmicas de este organismo, el experimento se realizó a 37°C durante 20 min. (Tabla 4). En el pollo también se observó que el transporte de 3 H-taurina tiene una dependencia total al sodio y, al igual que en la rana, el sistema de acumulación es independiente de la presencia de cloro en la retina. (Tabla 5)

En la retina de rana se estudió además el mecanismo de baja afinidad, empleando 100 μ M de taurina fría y 2.5 uCi/ml. de 3 H-taurina. Se pudo constatar en la rana que el transporte no es afectado al eliminar el cloro del medio, mientras que lo disminuye un 46% la ausencia de sodio, lo que indica la dependencia al sodio en este sistema (Fig. 14). Lo anterior contrasta con lo encontrado en los segmentos externos en donde se observó que la interacción de baja afinidad es totalmente independiente de sodio.

MEDIO DE INCUBACION	DPM/mg PROTEINA		
MKN*	438.9 ±	59.39	(8)
-Cl*	511 ±	85	(8)
-Na	218 ±	28	(5)

Tabla 3.- Sistema de transporte de ^3H -taurina de alta afinidad en retina de rana. Las retinas fueron incubadas durante 20 min. a 25°C con ^3H -taurina 2.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 1 μM . Los resultados representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicado entre paréntesis. * La diferencia entre el MKN y el medio sin cloro no es significativa.

MEDIO DE INCUBACION

DPM/mg PROTEINA

MKN*	1630 ± 160	(6)
-Cl*	1021 ± 370	(12)
-Na	364 ± 107	(5)

Tabla 4. Transporte de ^3H -taurina en retina de rata. Las retinas fueron incubadas durante 20 min. a 25°C con ^3H -taurina 2.5 $\mu\text{Ci/ml.}$, 1 μM . Los resultados representan el promedio + error estándar del número de experimentos indicado entre paréntesis.

* $P < 0.01$

MEDIO DE INCUBACION	DPM/mg PROTEINA	
MKN*	1234 ± 332	(4)
-Cl*	1624 ± 92	(5)
-Na	88.25 ± 1.75	(4)

Tabla 5.- Transporte de alta afinidad de ^3H -taurina en retina de pollo. Las retinas se incubaron durante 20 min. con ^3H -taurina 2.5 $\mu\text{Ci/ml.}$, 1 μM , a 37°C. Los resultados representan el promedio + error estándar del número de experimentos indicado entre paréntesis. *No hay diferencia significativa.

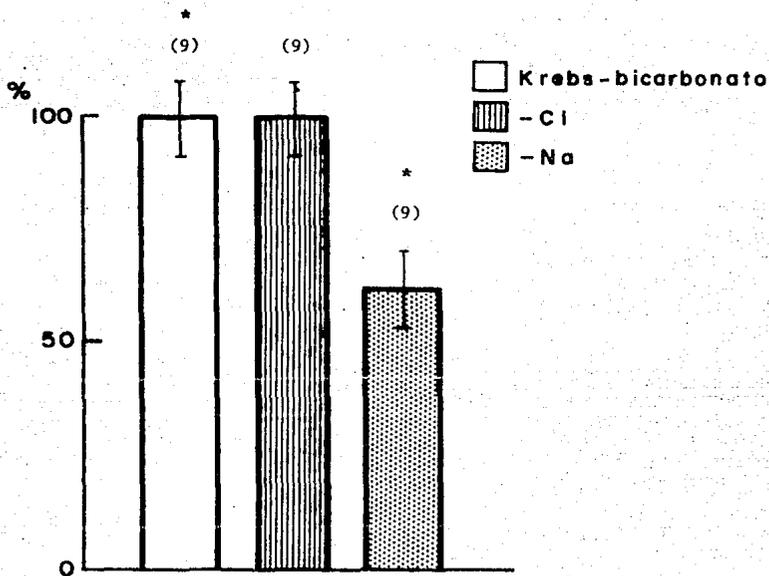


Figura 14.- Sistema de transporte de ^3H -taurina de baja afinidad en retina completa de rana. Las retinas se incubaron con ^3H -taurina 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$. y una concentración final de 100 μM durante 20 min. a 25°C. Los resultados expresan el porcentaje de radioactividad incorporada por las retinas.

* $P < 0,001$

DISCUSION Y CONCLUSION

Las alteraciones observadas en la estructura de los segmentos externos incubados en un medio isotónico libre de cationes divalentes son características de un desorden osmótico. El hinchamiento de la membrana plasmática y el desarreglo que muestran los discos del segmento externo indica probablemente la entrada de agua al interior celular producida como consecuencia de la alteración de los flujos iónicos bajo estas condiciones.

Los experimentos de sustituciones iónicas fueron llevados a cabo para estudiar el papel que desempeñan distintos componentes iónicos del medio en el proceso degenerativo. Se demostró que la presencia, tanto de sodio como de cloro, es necesaria para que ocurra el proceso degenerativo y la sustitución de alguno de estos iones, por compuestos impermeables, evita la degeneración.

En estudios previos (Pasantes-Morales y Col., 1981) realizados con preparaciones de segmentos externos expuestos a la luz continua (5000 lux) durante dos horas, se ha demostrado que la presencia de sodio es necesaria para observar la degeneración, que es total, cuando se alcanzan las concentraciones fisiológicas extracelulares de este catión.

En otro estudio se demostró que la presencia de cloro es también necesaria para generar las alteraciones de los segmentos externos. El papel de este catión también es importante en la degeneración producida por la luz (Pasantes-Morales y López-Escalera, 1987, resultados no publicados).

Con base en las observaciones anteriores y conociendo que en el modelo degenerativo de la luz se ha detectado isotópicamente un incremento en la entrada de agua, se ha planteado la siguiente hipótesis para explicar los efectos degenerativos producidos por incubación en medio sin calcio y magnesio. Inicialmente existe una entrada masiva de sodio al interior del segmento externo. Esta estructura celular carece de un sistema de transporte activo para expeler el exceso de sodio acumulado, ya que la $ATPase Na^+$ y K^+ se localiza en el segmento interno. De esta manera se genera un aumento de cargas positivas en el interior celular. La entrada de sodio en sistemas celulares incubados en medios libres de cationes divalentes se ha descrito en el axón gigante de calamar (Frankenhauser B. y Hodgking A.L. 1975) y en segmentos externos aislados de retina de bovino (Schnetzka, P.P.M., 1986).

La alteración estructural observada en segmentos externos está entonces asociada a un aumento en la permeabilidad al sodio; -subsecuentemente, el cloro, que es un anión que se distribuye a ambos lados de la membrana de acuerdo a su potencial eléctrico químico, se introduce a la célula para mantener la electroneutralidad. El aumento en la concentración intracelular de NaCl así producido, genera una entrada masiva de agua para corregir el desbalance osmótico, lo que probablemente causa el aumento marcado de volumen así como el desorden generalizado observado en la estructura de los segmentos externos. Hasta el momento -se desconoce si estos cambios en la permeabilidad se deben a -un fenómeno generalizado de permeabilidad pasiva o bien, si se trata de un aumento en la permeabilidad de canales o transportadores.

El efecto protector de la taurina descrito en otros sistemas -de degeneración *in vitro* se evaluó en el modelo descrito en este trabajo. Se observó que la presencia de taurina en el medio de incubación protege de manera dependiente de la concentración. El máximo efecto se detectó a una concentración de taurina aún dentro del rango fisiológico (25 mM). Del mismo modo que en -otros sistemas de degeneración de los segmentos externos, el mecanismo molecular del efecto protector de la taurina se desconoce.

Hemos mencionado con anterioridad que el proceso degenerativo observado cuando los segmentos externos se exponen a la luz, -agentes oxidantes o a medios libres de cationes divalentes, es -tá asociado a un aumento en la permeabilidad iónica. La taurina entonces podría estar actuando como un regulador de la permeabilidad. Dado que se desconoce la naturaleza de los cambios de permeabilidad observados en esos fenómenos, es decir, si se -dan a nivel de una difusión generalizada o a nivel de canales o transportadores específicos, la protección proporcionada por la taurina, podría depender de una interacción generalizada o bien, de una función reguladora localizada en sitios específicos involucrados en la traslocación de iones.

Al estudiar la interacción de la taurina con la membrana del -segmento externo del fotorreceptor en relación a la primera posibilidad, se sitúan los resultados obtenidos en este trabajo.

Se encontraron dos componentes en la interacción taurina-membranas: Un componente de alta afinidad detectado en presencia de sodio únicamente, el cual depende de temperaturas y un componente de baja afinidad que no se modifica con la luz y no muestra dependencia de sodio ni de temperatura de incubación. Los sistemas anteriores probablemente representan, por una parte, la presencia de un mecanismo de transporte de taurina, que acumula el

aminoácido al interior celular de manera dependiente de sodio y que tiene gran afinidad; por otra parte, la interacción generalizada de baja afinidad independiente de sodio y energía metabólica que representa la unión de taurina a la superficie externa de la membrana del fotorreceptor.

En algunos estudios, (Kennedy y Voaden, 1974) se ha demostrado que el fotorreceptor captura taurina del medio con gran afinidad. En este estudio se observa que el segmento externo, una vez retirado de la célula fotorreceptora no pierde la capacidad de transportar taurina al interior. La taurina agregada al medio de incubación puede entonces ejercer sus efectos protectores desde el interior o desde el exterior celular.

La acción protectora de la taurina podría residir entonces en una interacción generalizada con las membranas de que depende la estabilidad de la estructura del segmento externo. Sin embargo, el estudio de los efectos de la taurina sobre las membranas de segmentos externos (Morán y Col., 1987) ha revelado que este aminoácido no modifica per se sus cambios en la fluidez de membrana observados a diferentes temperaturas, sin embargo, su acción podría ser la de alterar la unión de diferentes iones, que a su vez, pudieran modificar la estructura membranal o la fluidez.

Recientemente se ha descrito en membranas de sarcolema una unión de baja afinidad de la taurina a estas estructuras, la cual es desplazable por calcio y puede representar un mecanismo de estabilización proporcionado por la taurina, el cual es específico para este aminoácido y para la hipotaurina, ya que la β -alanina y el guanidinoetano sulfonato, los cuales son análogos estructurales de la taurina, no afectan la unión. En estos estudios se postula una interacción iónica de la taurina con los fosfolípidos de las membranas que tiende a neutralizar las cargas de los grupos amino, este efecto incrementa la carga neta negativa de la región del fosfato de los fosfolípidos, aumentando la afinidad de cationes como el calcio, el cual se conoce que tiene un papel determinante en la estabilidad de la membrana.

En este trabajo hemos estudiado también la interacción de baja afinidad en un medio sin sodio, en presencia de membranas de fotorreceptores aislados y en discos aislados de fotorreceptores, estas dos preparaciones representan la superficie interna de la membrana plasmática (discos) y la superficie externa e interna de la membrana (membranas totales). La ausencia de sodio en el medio de incubación elimina el componente debido a mecanismos de transporte dependientes de sodio y en estas condiciones, lo que se observa es unión de taurina a membranas.

Los resultados obtenidos indican que la unión de la taurina parece ser indistinta en ambas superficies de la membrana del segmento externo, lo cual sugiere que la taurina, agregada por fuera a los sistemas in vitro, podría tener los sistemas in vivo el mismo efecto, pero en el interior celular. Aunque también se ha descrito la liberación de la taurina por la retina estimulada mediante iluminación, lo cual indica que la taurina en ciertas situaciones fisiológicas puede liberarse y ejercer sus efectos extracelularmente.

Al extender los estudios de captura a preparaciones de retina completa, se encontró que existen diferencias en el comportamiento de ambas preparaciones. En los fotorreceptores el sistema de alta afinidad presenta una dependencia total de la presencia de sodio en el medio de incubación, mientras que en las preparaciones de retina completa la dependencia de este catión fue menor, lo que indica que los mecanismos de captura de taurina presentes en los distintos tipos celulares de la retina son diferentes y múltiples. Por otro lado, se encontró que la interacción de baja afinidad de la taurina con las membranas del fotorreceptor, fue independiente del sodio, mientras que esta interacción es parcialmente dependiente de sodio en las preparaciones de retina completa, lo cual indica que existe un sistema de captura de baja afinidad que depende de sodio en células correspondientes a estratos internos de la retina. Los resultados anteriores señalan que la interacción de la taurina en la taurina es variable dependiendo del tipo de preparación o célula. Sin embargo, la función de estabilización membranar parece ser un fenómeno generalizado en las distintas células estudiadas.

El control de la permeabilidad iónica también depende de la acción de sitios específicos en donde la taurina puede tener una acción estabilizante, tal es el caso de los fotorreceptores incubados en medio sin calcio, que son protegidos de la degradación mediante incubación en presencia de antagonistas de canales regulados por calcio, nifedipina y la nitrendipina. Sin embargo, en estos estudios aún se desconoce si la taurina accede en los mismos sitios que estos compuestos (Pasantes-Morales y López Escalera, 1987).

Al extender los estudios de la interacción de taurina en la retina de diferentes especies, se detectó en todas estas la presencia de un sistema de alta afinidad, el cual había sido descrito en la retina de pollo (Pasantes-Morales y López Colomé, 1980) y en la rata (Lombardini, 1978); se encontró que este sistema se presenta también en la rana. En la rata y el pollo, esta interacción es desplazable mediante los análogos estructurales de la taurina, Guanidino etano sulfonato y β -alanina. (López Colomé y Pasantes-Morales, 1980) en la rana no se probó

el efecto de estos compuestos. Se encontró que la unión es dependiente de sodio en las tres especies, lo que puede representar la interacción específica con sitios involucrados en el transporte. Al estudiar la dependencia de cloro de estas interacciones se encontró que sólo en el caso de la rata, hay una inhibición en la captura de taurina en ausencia de este anión, lo que puede representar diferencias interespecíficas de los mecanismos de acumulación del aminoácido presentes en la retina.

Con base en diferentes datos descritos en este trabajo así como en los experimentos realizados, podemos concluir que la taurina puede ser transportada al interior de los segmentos externos -- del fotorreceptor o a otros tipos celulares de la retina mediante mecanismos heterogéneos. Dentro de las células, o bien, fuera de ellas, al liberarse ante algún estímulo, el aminoácido ejerce un efecto protector membranar que parece ser general en los distintos tejidos en los que la taurina se encuentra. La protección membranar parece estar relacionada con el flujo de iones como el sodio y el cloro, que a su vez modulan el comportamiento osmótico del agua.

La regulación de la permeabilidad iónica puede depender de transportadores o canales específicos o bien de una resistencia general de la membrana celular a cambios de permeabilidad, por tanto la acción protectora de la taurina, puede situarse en alguno de estos dos fenómenos o en ambos.

La conclusión principal de este trabajo es que, probablemente, la interacción de baja afinidad sea el mecanismo mediante el cual este aminoácido interactúa con las membranas de fotorreceptor regulando posiblemente de esta manera la permeabilidad a distintos iones.

B I B L I O G R A F I A

1. COHEN, A.I. (1969). Rods and cones and the problem of visual excitation. In: *The retina. Morphology, Function and clinical characteristics.* UCLA Forum in Medical Sciences, number 8. University of California Press, - Berkeley and Los Angeles, pp 31-62.
2. COLLINS, G.G.S. (1974). The rate of synthesis, uptake and disappearance of ^{14}C - Taurine in eight areas of the rat central nervous system. *Brain. Res.* pp 447-459
3. CORREA, G.L.R. (1979). Tesis profesional: Estudio histológico de la retina fetal de ratones blancos tratados con diazepam (valium). UNAM, México. pp 15-29.
4. DAEMEN, F.J.M. (1973). Vertebrate rod outer segment - membranes. *Biochim, Biophys. Acta* 300, pp 255-263.
5. DAWSON, C. and Neal, N.J. (1984). Taurine uptake --- processes in the isolated rabbit retina and the effects of light. *Expl. Eye. Res.* 38, pp 533-546.
6. DOWLING, J.E. and Boycott, B.B. (1966). Organization of the primate retina electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 166: 80-111.
7. FEDERICK, J.M., LAM, D.K.M. AND HOLLYFIELD, J.G. (1982) Retinal Taurine: Spatial and temporal patterns of uptake localization and release during development of xenopus In: *The structure of the eye* (Hollyfield, Ed.) pp 229-236. Elsevier Biomedical, New York.
8. GUIDOTTI, A., BADIANI, G. AND PEPEU, G. (1972). Taurine distribution in cat brain. *J. Neurochem.* 9. pp 431-435.
9. HASS, H.L. AND HOSLI, L. (1973). The depression of -- braine system neurons by taurine and its interaction -- with strychnine and bicuculline. *Brain. Res.* 52. pp 399 - 402.
10. HAVES, K.C. AND STURMAN, J.A. (1981). Taurine in metabolism. *A. Rev. Nutr.* 1. pp 401-425.
11. HUXTABLE, R. (1976). Metabolism and function of taurine in the heart. In: *Taurine.* Barbeau, A. and Huxtable, R. J., eds., Raven Press. New York. pp 99-119.

12. IZUMI, D., DONALSON, J., MINNICH, J.L. AND BARBEAU, A. (1976). *Oabain induced seizures in rats: Suppressive effects of taurine and aminobutyric acid.* *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 51, pp 885-889.
13. IZUMI, K., IGISU, H. AND FUKUDA, T. (1974). *Suppression of seizures by taurine specific or nonspecific.* *Brain. Res.* 76, pp 171-173.
14. JACOBSEN, J.G. AND SMITH, L.L.H. (1968). *Biochemistry and Physiology of taurine derivatives,* *Physiol. Rev.*, 48: pp -- 424-517.
15. JOSEPH, M.H., EMESON, P.C. (1976). *Taurine and cobalt induced epilepsy in the rat: A biochemical and electrographic study.* *J. Neurochem.*, 27, pp 1595-1501.
16. KENNEDY, A.J. AND VOADEN, M.J. (1974). *Distribution of free amino acids in the frog retina.* *Biochem. Soc. Trans.* 2, pp 1256-1258.
17. KULAKOSKI, E.C. AND MATURO, J. (1984). *Hypoglycemic properties of taurine: Not mediated through enhanced insulin release.* *Biochem. Pharmac.* 33, pp 2835-2838.
18. LOMBARDINI, J.B. (1976). *Regional and subcellular studies on taurine in the rat central nervous system.* In: *Taurine* Huxtable, R.J. and Barbeau, R. Eds. Raven Press New York, pp 311-326.
19. MILLER, W.H. (1960). *Visual photoreceptor structures. In: The cell biochemistry, Physiology, Morphology. Vol. IV. Specialized cells: Part. I.* Academic Press, New York and London, pp 325-364.
20. MORAN, J. SALAZAR, P. AND PASANTES-MORALES, H. (1987). *Effects of tocopherol and taurine on membrane fluidity of retinal rod outer segments.* *Exp. Eye. Res.* 45 (in press).
21. ORR, H.T., COHEN, A.L. AND LOWRY, O.H. (1976). *The distribution of taurine in the vertebrate retina.* *J. Neurochem.* 26, pp 609-611.
22. VAN GELDER, N.M. (1978). *Glutamic and epilepsy: The action of taurine.* In: *Taurine neurological disorders.* Barbeau, A. and Huxtable, R.J. Eds. Raven. Press, New York pp 387-402.
23. VAN GELDER, N.M., SHERWIN, A.L., SACK, C. AND RASMUSSEN, T. (1972). *Amino acid content of epileptogenic human brain:*

focal versus surrounding. regions. *Brain Res.* 40 pp 385-393

24. VAN GELDER, N.M., SHERWIN, A.L., SACK, C. AND ANDERMAN, R. (1975). Biochemical observations following administration of taurine to patients with epilepsy. *Brain. Res.* 94, pp - 297-306.
25. PASANTES-MORALES, H., ADEME, R.M. AND LOPEZ COLOME (1979). Taurine effects on Ca-transport in retinal subcellular fractions. *Brain. Res.* 172. pp 131-138.
26. PASANTES-MORALES, H., ADEME, R.M. AND QUESADA, O. (1981). Protective effect of taurine on the light-induced disruption of osilated frog rod outer segments. *Neurosci. Res.* 6 pp 337-345.
27. PASANTES-MORALES, H., ARZATE, M.E. AND CRUZ, C. (1982) The role of taurine in nervous tissue: Its effects on ionic fluxes. *Adv. Exp. Mec. Biol.* 139. pp 273-292.
28. PASANTES-MORALES, H. AND CRUZ, C. (1984). Protective effect of taurine and zinc on peroxidation induced damage in photoreceptor outer segments. *J. Neurochem. Res.* 11. pp 303-311.
29. PASANTES-MORALES, H., AND LOPEZ ESCALERA, R. (1987). Taurine and nifedipine protect ROS structure altered by removal of divalent cations (enviado a publicación).
30. PASANTES-MORALES, H., QUESADA, O., CARABES, A. AND HUXTABLE R.J., (1983). Effects of the taurine transport antagonist. Guanidinoethane sulfonate and alanine of the morphology of rat retina. *J. Neurosci. Res.* 9. pp 135-143.
31. PASANTES-MORALES, H., QUESADA, O., CARABES, H. (1981) Light stimulated release of taurine from retinas of kainic acid treated chick. *J. Neurochem.* 36 pp 1583-1586.
32. QUESADA, O., HUXTABLE, R.J. AND PASANTES-MORALES, H. (1984) Effect of Guanidinoethane sulfonate of taurine uptake by rat retina. *J. Neurosci. Res.* 11. pp 179-186.
33. ROPICK, R.W., FREEMAN AND CO. (1973). The vertebrate retina. In: *The vertebrate retina*. San Francisco. pp 775-904.
34. ROMER, S.A. (1973). Anatomía comparada (vertebrados). Nueva Editorial Interamericana, S.A. México, pp 325-333.
35. SBARBARO, V. (1975) Electroclinical effects of taurine in

some epileptic patients. Preliminary results, *Acta Neurol (Napoli)* 20. pp 33-37.

36. SCHMIDT, S.V. (1981). Taurine in retinas of taurine-deficient cats and rats. In: *The effects of taurine of excitable tissues*. Baskin, S. AND SCHAEFFER, S. Eds. pp 117-185. Spectrum Press, New York.
37. SCHMIDT, S.V. AND BERSON, E.L. [1978] Taurine in retinal de generations. In: *Taurine and neurological disorders*. Huxtable, R.J. and Barbeau, A. Eds. Raven Press. pp 281-287.
38. SCHNAPF, J.L. AND BAYLOR, D.H. [1987]. How photoreceptor cells respond to light. *Scientific American*. pp 32-39.
39. SHANK, R.P. AND APRISON, M.H. (1970). The metabolism *in vivo* of glycine and serine in eight areas of nervous system *J. Neurochem.* 17. pp 1461-1475.
40. STARR, M.S. (1978). Uptake of taurine by retina in different species. *Brain Res.* 151 pp 604-608.
41. STARR, M.S. AND VOADEN, M.S. (1972). The uptake metabolism and release of ¹⁴C-taurine by rat retina *in vitro*. *Vision Res.* 12. pp 1261-1269.
42. STRIANO, S., GRASSO, H., BUSCAINO, G.A. AND REHRITTI, P. (1974) Primi risultati sugli effetti de lla taurina nella epilessia umana. *Acta Neurol. (Napoli)*. 29 pp 537-542.
43. WETTY, J.D. AND READ, W.O. (1964). Studies of some cardiac effects of taurine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 144 pp 110-115.
44. WHEELER, T.G., BENOLKEN, M.R. AND ANDERSON R.E. (1975) Visual membrane: Specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science* 118. pp 131-134.
45. WELSH, U. V STORCH, U. [1973]. Estudio comparado de la citologia e histologia animal. Urmo, S.A. de Ediciones Bilbao. 172. pp 193-203.
46. WOLKEN, J.J. (1975). Photoprocesses. Photoreceptors and evolution. Academic Press. Ing. (London) LTD and New York. pp 181-247.
47. YOUNG, R.W. [1969]. The organization of vertebrate photoreceptor cells. In: *The retina. Morphology. Function and clinical characteristics*. UCLA. Forum in medical sciences, number 8. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. pp 177-210.

48. FRICKE, U. (1975). Tritods: A new scintillation cocktail based on triton X-100. *Annual Biochem.* 63: 551-558.