

Tema: Fisiología Animal - Cerebro (Neuroquímica)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE FOSFATO, TAURINA Y ZINC SOBRE LA CAPTURA DE CALCIO EN  
TERMINALES NERVIOSAS"

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

BIOLOGO

Presenta

ROBERTO SANCHEZ OLEA

México, D. F., Octubre de 1987.



## **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.

## INTRODUCCION

La taurina es un aminoácido sulfonado (ácido 2-aminoetano sulfónico) que se encuentra ampliamente distribuido como constituyente universal de los tejidos animales. Se identificó por primera vez en la bilis de toro, en 1827, en los estudios de Tiedemann y Gmelin. Posteriormente se describió en la mayoría de los phyla del reino animal: poríferos, braquiópodos, sipuncúlidos, anélidos, artrópodos, equinodermos y moluscos, detectándose en estos últimos las concentraciones más elevadas (Jacobsen y Smith, 1968). En los cordados se ha localizado en urocordados y en diversos tejidos de vertebrados, principalmente en tejido nervioso, contráctil, glandular y en órganos como hígado, bazo y riñón (Jacobsen y Smith, 1968; Kocsis et al., 1976; Crabai et al., 1979).

A pesar de su amplia distribución y de los numerosos estudios realizados al respecto, todavía no se conoce cuál es el papel fisiológico de la taurina en el organismo. Se sabe que este aminoácido no forma parte de la estructura de proteínas ni participa en el metabolismo general, excepto en la formación del ácido taurocólico. Esto ha llevado a pensar que dicho aminoácido debe cumplir con alguna función específica en los tejidos donde se encuentra presente.

En todas las especies animales estudiadas la taurina se ha identificado en el sistema nervioso, donde se encuentra distribuida de manera heterogénea en las distintas regiones del mismo. Las concentraciones más elevadas se observan en los cuerpos geniculados laterales, glándula pineal, pituitaria,

cuerpo estriado, cerebelo y retina mientras que los niveles más bajos se encuentran en médula espinal (Mandel y Pasantes-Morales, 1978). En estudios en la médula espinal y tálamo se ha visto que la taurina se distribuye homogéneamente en sus diferentes secciones, pero en cerebelo se concentra preferentemente en la capa molecular (McBride y Frederickson, 1978).

En estudios sobre la distribución subcelular de la taurina, se ha establecido que la mayor parte, cerca del 70%, se encuentra en forma soluble y que sólo una fracción pequeña está asociada a membranas (Agrawal et al., 1971). En las vesículas sinápticas es el aminoácido más abundante (De Belleruche y Brodford, 1973; Kontro et al. 1980).

Los niveles de taurina en los tejidos son muy estables en condiciones fisiológicas así como en diversas condiciones experimentales tendientes precisamente a modificarlos en ambos sentidos, incluyendo una deficiencia severa de vitamina B<sub>6</sub>, que se sabe es indispensable para la síntesis de taurina, dietas deficientes en el aminoácido y con exceso del mismo. En la mayoría de los casos las concentraciones de taurina permanecen inalteradas (Hope, 1957), observándose una respuesta compensatoria del organismo modificando las tasas de síntesis y excreción (Sturman, 1973).

Se ha detectado que la concentración de taurina en las distintas regiones del sistema nervioso tiene relación con el grado de maduración del mismo y que, a medida que éste avanza, los niveles de taurina disminuyen, alcanzando valores más bajos cuando se ha completado dicho proceso, ya sea antes o después del nacimiento, según la especie. En el tejido nervioso fetal la

concentración de taurina es cuatro veces mayor que en el tejido nervioso adulto (Agrawal et al., 1966 a, b) y aunque esta reducción afecta a todas las regiones, la proporción no es la misma (Cutter y Dudzinski, 1974). Se ha dicho que posiblemente la taurina pudiera intervenir en la formación de los microtúbulos, en el transporte axonal o más probablemente como un factor de crecimiento no específico durante el desarrollo embrionario (Martin y Patrick, 1961).

#### SINTESIS Y DEGRADACION

En ciertas especies, como el hombre y el gato, la taurina es un aminoácido esencial, ya que existe una capacidad muy limitada para su síntesis y tiene que obtenerse por medio de los alimentos de los que la taurina forme parte. En otras especies, se han propuesto varias vías metabólicas para su síntesis a partir del aminoácido azufrado cisteína. En el sistema nervioso predomina la vía que se inicia con la oxidación de la cisteína por la dioxigenasa de la cisteína para producir el ácido cisteín sulfínico, el cual, por medio de la descarboxilasa del ácido cisteín sulfínico, forma hipotaurina, la que finalmente es oxidada a taurina. Alternativamente, el ácido cisteín sulfínico puede ser oxidado a ácido cistéico por una deshidrogenasa y posteriormente por una descarboxilación producir taurina (Chatagner y Bergeret, 1952). La descarboxilasa del ácido cisteín sulfínico se ha identificado en hígado, riñón y cerebro de varias especies de vertebrados, y la hipotaurina deshidrogenasa en hígado, riñón y músculo de rata (Cavallini et al., 1954; McBride

y Frederickson, 1978).

En relación a la degradación metabólica de la taurina, se ha reportado su conversión a ácido isetiónico, pero debido a su lentitud, se ha descartado como vía principal de degradación (Huxtable, 1981). A pesar del desconocimiento de su degradación, se ha demostrado en la rata que la taurina muestra un recambio rápido en hígado, riñón y páncreas; moderado en pulmón, bazo, intestino y médula ósea; y lento en corazón, cerebro y músculo (Spaeth y Schneider, 1976). Este aminoácido al conjugarse con ácidos biliares forma el ácido taurocólico en gran número de vertebrados, reacción que es dependiente de los niveles de taurina sintetizados endógenamente o suministrados de manera exógena.

#### CAPTACION Y LIBERACION

En el tejido nervioso la acumulación de taurina presenta dos componentes en diversas preparaciones, tales como rebanadas de tejido, neuronas y células gliales en cultivo y sinaptosomas, uno de baja afinidad ( $K_M$  de 0.1 a 10 mM) y otro de alta afinidad ( $K_M$  de 3.95  $\mu$ M). El sistema de captación de alta afinidad es dependiente de sodio y sensible a temperatura (Hruska et al., 1978), además de ser altamente específico, por lo que en diversas preparaciones sólo puede ser bloqueado por análogos estructurales estrechamente relacionados, tales como la beta-alanina y el GES (guanidinoetano sulfonato) (Huxtable, 1980). La acumulación de taurina en el cerebro in vivo está limitada por la barrera hematoencefálica.

La liberación espontánea de taurina es, en general, inferior

a la de otros aminoácidos neuroactivos. En respuesta a condiciones despolarizantes de cloruro de potasio, la liberación se ve incrementada, pero en forma mucho menor que la observada para el GABA. Además esta respuesta no depende de la presencia de calcio extracelular y, por el contrario ésta se ve estimulada en ausencia del catión (Sieghart y Heckl, 1976). En la retina, la taurina es liberada en respuesta a una estimulación luminosa, como sucede con otros aminoácidos neuroactivos como el GABA y la glicina (Pasantés-Morales et al., 1974; Salceda et al., 1977; Schmidt, 1978; Kennedy y Neal, 1978; Pasantés-Morales et al., 1981). Sin embargo, existe evidencia que señala que dicha liberación procede de la poza de los fotorreceptores, probablemente del segmento externo. Esto aunado a una cinética diferente de la liberación de los neurotransmisores clásicos (incluidos el GABA y la glicina en preparaciones similares) han sugerido que dicho proceso podría relacionarse con eventos fisiológicos diferentes de la transmisión sináptica.

#### ACCIONES FISIOLÓGICAS

Se ha propuesto a la taurina como un posible neurotransmisor inhibitorio, ya que al ser aplicada iontopóricamente a neuronas del sistema nervioso central, produce una depresión de la actividad eléctrica neuronal, resultando en una hiperpolarización del potencial de membrana (Curtis y Tebécis, 1972; Pasantés-Morales et al., 1973; Curtis y Johnston, 1974), debido muy posiblemente a un incremento en la conductancia a los iones cloro y potasio

(Gruener y Bryant, 1975).

En contraposición a estos argumentos para considerar a la taurina como neurotransmisor, se ha visto que la acción depresora del aminoácido en médula espinal (Curtis et al., 1968) y en tallo cerebral (Haas y Hosli, 1973) es antagonizada por la estriquina, reconocido agente antagónico específico de los receptores sinápticos de la glicina. Además, dicho efecto inhibitor de la taurina en tálamo y corteza cerebral, es revertido por la bicuculina (Curtis et al., 1971), que se conoce bloquea los efectos del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Esto ha llevado a pensar que el efecto de la taurina es mediado por una interacción con los receptores de la glicina y GABA, conocidos neurotransmisores en el tejido nervioso, debido a la semejanza estructural que guarda con éstos. Si se considera además, que la búsqueda de un receptor y antagonistas específicos para la acción de la taurina ha resultado infructuosa en el sistema nervioso central (López-Colomé y Pasantes-Morales, 1980), que la liberación de la misma no es dependiente de calcio (Clarck y Collins, 1975) y su abundancia en tejidos no nerviosos, ha resultado difícil sostener la idea de considerar a la taurina como un neurotransmisor, por lo que la búsqueda de funciones alternativas es en la actualidad objeto de intensa investigación.

Una serie de datos experimentales indica que la taurina es necesaria para el mantenimiento de la integridad estructural de los fotorreceptores. Al eliminar el aminoácido de la dieta de animales incapaces de sintetizar taurina, como los gatos, se observa, paralelamente a una disminución de los niveles del aminoácido en plasma y retina, una degeneración progresiva de los



fotorreceptores (Hayes et al., 1975 a, b). Este efecto se revierte con solo añadir taurina a la dieta, dentro de cierto intervalo de tiempo, pero si el tratamiento de deficiencia en taurina se continúa más allá de un período crítico, la muerte celular se produce irremediablemente.

En experimentos in vitro, también se ha observado que la taurina protege a los fotorreceptores de los desarreglos membranales producidos por efecto de excesiva iluminación (Scultze, 1866; Meyer-Shultz et al., 1973; McConell, 1975), lo cual indica que este aminoácido podría estar actuando como un estabilizador de membrana.

#### ACCIONES FARMACOLOGICAS

Entre las acciones farmacológicas de la taurina se han descrito efectos sobre diversos procesos biológicos, tales como la regulación de la temperatura, la producción del dolor y el control del hambre y la sed (Sgaragli y Pavan, 1973; Lipton y Tickner, 1979). Entre estos efectos el que ha sido objeto de mayor interés y estudio es el de su acción anticonvulsionante. Van Gelder et al., (1972), reportaron que la concentración de taurina era menor en focos epileptógenos de cerebro humano que en el tejido periférico. Posteriormente se comprobó su efecto anticonvulsionante contra daños producidos por cobalto en corteza cerebral de ratón (Van Gelder, 1972).

El efecto protector de la taurina se ha observado en diversos modelos experimentales de epilepsia como las producidas por pentilenetetrazol (Izumi et al., 1974), ouabaina (Izumi et

al., 1973; Tsukada et al., 1974), cobalto (Craig y Hartmann, 1973; Mutani et al., 1974), estriquina, metrazol y 4-aminopiridina. El que esta accion de la taurina sea potente y especifica, se desprende de experimentos realizados con ouabaina en ratas (Donaldson et al., 1971), donde la taurina protegió más fuertemente que el GABA y la glicina, hipotaurina y beta-alanina (Tsukada et al., 1974) en la supresión de las convulsiones.

Con base en estos experimentos se investigó este efecto de la taurina en humanos, con objeto de una posible aplicación clínica. Barbeau y Donalson (1974), fueron los primeros en obtener resultados positivos en epilépticos humanos, y se ha confirmado con los trabajos de varios investigadores como Striano et al., 1974; Bergamini et al., 1974; Borronei et al., 1975, por medio de aplicación intravenosa de la taurina; y por Barbeau et al., (1976), Takahashi y Nakene, (1978), por suministro oral. Desafortunadamente el efecto de la taurina está limitado en gran parte por la barrera hematoencefálica, la cual en sujetos normales limita grandemente la captación de taurina por el encéfalo. En animales, utilizando taurina radiactiva, se ha visto que menos del 1% de la cantidad suministrada atraviesa la barrera hematoencefálica (Barbeau et al., 1976).

No se conoce de qué manera la taurina produce su acción anticonvulsionante, pero debido a que ésta se observa en estados convulsivos de muy diversa etiología, se ha pensado que pudiera estar actuando como un agente modulador de la excitabilidad de membranas neuronales.

## MECANISMOS DE ACUMULACION DE CALCIO

La membrana celular tiene una permeabilidad muy reducida para el calcio y otros cationes. Esto es muy claro cuando se observa el gradiente intermembranal existente, pues en condiciones de reposo la concentración citosólica de calcio es del orden de 100 nM (Rink et al., 1980; Borle, 1981) y la concentración extracelular de 2.5 mM.

Debido al gran número de procesos celulares en los que interviene el calcio, es de suponerse que deben existir mecanismos fisiológicos precisos para modular los cambios de concentración del catión, dependiendo del tipo celular de que se trate y de los procesos particulares a los que esté sujeta la célula en un momento determinado. Dichos mecanismos se localizan tanto a nivel de la membrana plasmática como a nivel de organelos celulares, tales como la mitocondria y el retículo endoplásmico.

Los mecanismos principales a través de los cuales se regulan los flujos de calcio son: transporte activo, intercambio  $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$  ó  $\text{Ca}^{++}/\text{Ca}^{++}$ , canal específico para calcio y difusión pasiva a través de la membrana (Holmes et al., 1983).

El transporte activo se ha identificado en mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana plasmática. Se ha propuesto también que existe en la envoltura nuclear y en vesículas intranucleares, donde el calcio parece ser importante durante la división mitótica (Silver et al., 1980).

El intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{++}$  se ha detectado únicamente en membrana plasmática de células excitables, no así en células sin

esta característica. Se cree que, aunque in vitro puede actuar en ambas direcciones, in vivo actúa expulsando calcio de la célula (Holmes et al., 1983).

El canal específico para la entrada de calcio a la célula ha sido más estudiado en membrana plasmática de células excitables (Borle, 1981), pero se piensa que está presente en gran número de tipos celulares. En células excitables, este canal es sensible a voltaje y la captación de calcio se incrementa marcadamente utilizando condiciones despolarizantes, tales como altas concentraciones de KCl en el medio de incubación. En eritrocitos (Varecka y Carafolli, 1982) y en células de riñón en cultivo (Sandvig y Olsnes, 1982), se ha detectado un canal específico para calcio que es sensible a altas concentraciones de verapamil.

Los tres procesos de acumulación de calcio descritos están mediados por la intervención de proteínas. Los lípidos de membrana también son importantes por intervenir en la difusión pasiva de calcio. Se ha observado que el ácido fosfatídico incrementa notablemente la permeabilidad de liposomas al calcio (Serhan et al., 1981).

Una alteración de los mecanismos de expulsión o captación del calcio, a nivel de la membrana plasmática, puede saturar y rebasar los sistemas de regulación interna y producir un estado de activación constante. Normalmente la concentración citosólica se eleva cuando la célula se activa en respuesta a algún estímulo recibido a nivel de membrana, ya sea éste una hormona, un neurotransmisor o un estímulo eléctrico; pero inmediatamente son restituidas las concentraciones del estado de reposo (Holmes et al., 1983). Si por alguna razón ésto no sucede, se produce un

hinchamiento y daño funcional del retículo endoplásmico y mitocondria, daño a nivel de membrana debido a la liberación de ácidos grasos por fosfolipasas activadas por el calcio, perturbación del metabolismo intracelular (Trump et al., 1981) y finalmente puede llegar a producirse la muerte celular.

## TAURINA Y CALCIO

La hipótesis de que los efectos farmacológicos y fisiológicos de la taurina en las distintas preparaciones, se podrían explicar con base en un mecanismo de acción común considera, entre otros, la alteración que produce el aminoácido en la cinética de captura y liberación de calcio a través de las membranas biológicas. Es muy conocida la importancia que tiene la regulación eficaz de los niveles intracelulares de este catión en fenómenos como la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, en la regulación de la corriente oscura de sodio en los fotorreceptores, etc.

En preparaciones de retina de pollo (Pasantes-Morales et al., 1979) se ha observado que la acumulación de calcio disminuye cuando se añade taurina al medio de incubación. Este efecto se presenta también en otras preparaciones como sinaptosomas de cerebro de rata (Pasantes-Morales y Gamboa, 1980) y sarcolema (Huxtable et al., 1979). Sin embargo es necesario mencionar que las características de la acumulación de calcio y los efectos que ejerce la taurina dependen de la concentración de dicho catión en el medio de incubación.

Las características de captación de calcio por sinaptosomas

y segmentos externos de fotorreceptores en un medio Krebs normal (2.5 mM de  $Ca^{++}$  en el medio) se describen en las investigaciones de Pasantes-Morales y colaboradores (Pasantes-Morales et al., 1982). La acumulación de calcio bajo estas condiciones es independiente de ATP, no se altera con ouabaina ni con concentraciones despolarizantes de KCl, tampoco es sensible a venenos metabólicos como oligomicina o dinitrofenol. Por otra parte el fosfato interviene de manera muy importante, ya que al eliminarlo del medio de incubación, la captación de calcio disminuye en un 60% y 50% en sinaptosomas y segmentos externos de fotorreceptores, respectivamente (Pasantes-Morales, et al., 1982). Esta dependencia de fosfato se ha observado en otras preparaciones. En mitocondrias de riñón y corazón, el fosfato estimula la acumulación de calcio, pero solamente con concentraciones mayores de 2.5 mM de calcio en el medio de incubación, no teniendo ningún efecto con concentraciones menores (Brierley et al., 1964).

Dado que la cinética de captura de calcio es diferente a concentraciones bajas y fisiológicas de calcio en el medio de incubación, es sugerente que se trate de dos tipos de mecanismos diferentes. En este sentido la taurina también muestra efectos diferenciales dependiendo de los procesos por los cuales se lleve a cabo la acumulación de calcio, pero ejerciendo un efecto sobre ambos.

Así, en un medio de incubación con calcio 2.5 mM la taurina inhibe la captación de calcio de manera dependiente de la dosis, tanto en sinaptosomas como en segmentos externos de

fotorreceptores (Pasantes-Morales, et al., 1982). Esta acción de la taurina es principalmente sobre la captación de calcio dependiente de fosfato, ya que si éste es retirado del medio, el efecto inhibitor de la taurina no se observa y éste se incrementa al aumentar la concentración de fosfato en el medio (Pasantes-Morales, et al., 1982).

Quando se incuban segmentos externos de fotorreceptores y sinaptosomas en un medio Krebs-bicarbonato con bajas concentraciones de calcio (50 a 100  $\mu\text{M}$ ), la acumulación de calcio se estimula en forma muy notoria con la adición de ATP al medio de incubación, lo que indicaría la intervención de una ATPasa en este proceso (Rahaminmoff y Abramovitz, 1978)

A diferencia de la acumulación de calcio en un medio con calcio 2.5 mM, el fosfato no interviene en la captación de calcio con bajas concentraciones de este catión, ya que al eliminarlo del medio de incubación no se observa ninguna diferencia respecto al control (Pasantes-Morales et al., 1982). La oligomicina, inhibidor del canal de la ATPasa mitocondrial y el desacoplante dinitrofenol tampoco alteran la captación; ésta si es significativamente disminuida por el rojo de rutenio.

A bajas concentraciones de calcio se observa un efecto de la taurina opuesto al que se ejerce en un medio con calcio 2.5 mM. Tanto en sinaptosomas como en segmentos externos de fotorreceptores, se observa un incremento del 80% en la captura de calcio cuando se añade taurina (20 mM) al medio de incubación (Pasantes-Morales et al., 1982). Este efecto es principalmente en la acumulación de calcio estimulada por ATP, aunque también se

observa un pequeño incremento en ausencia del mismo durante la incubación (Pasantas-Morales et al., 1982).

El agente amortiguador de pH utilizado es importante para que se manifieste el efecto de la taurina. Con bicarbonato, el efecto de la taurina que incrementa la acumulación de calcio se observa claramente; este efecto es menor con TRIS, y con HEPES no se observa ningún efecto sobre la acumulación de calcio (Pasantas-Morales et al., 1982).

La taurina también incrementa la unión de calcio en preparaciones de sarcolema (Chovan et al., 1979) y la captación de calcio en mitocondrias de cerebro de rata (Kuriyama et al., 1978).

#### TAURINA Y ZINC

Se ha sugerido una asociación entre taurina y zinc por observaciones que muestran que una deficiencia en zinc produce movilización y pérdida de taurina a través de sangre y orina (Hsu y Anthony, 1970). De igual manera una deficiencia en taurina produce pérdida de zinc de los tejidos oculares (Sturman et al., 1981). Ambos compuestos se encuentran en concentraciones elevadas en la retina, principalmente en la capa de los fotorreceptores (Halsted et al., 1974). Una dieta deficiente en zinc produce alteraciones en la estructura y organización de los fotorreceptores (Leure-Dupree y Bridges, 1982) similares a las observadas bajo una condición de deficiencia en taurina. Otros efectos similares entre una dieta deficiente en zinc y una dieta deficiente en taurina son el de una reducción en el tamaño del



cerebro (Dvergsten et al., 1983), así como alteraciones morfológicas en la capa granular y en la corteza del cerebelo (Sturman et al., 1985)

Se ha demostrado que el zinc, además de participar como cofactor de metaloenzimas en el metabolismo general, tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad de las membranas biológicas (Bettger et al., 1981). Animales privados de zinc presentan un desarreglo generalizado en sus membranas celulares y el suministro exógeno de dicho catión incrementa la estabilidad membranal (Bettger et al., 1981). Este efecto estabilizador ha sido relacionado con la peroxidación de lípidos de membrana, ya que la ausencia de zinc incrementa la peroxidación lipídica en los tejidos de animales deficientes. Sin embargo se conoce que el zinc protege de los desarreglos membranales producidos por agentes que aumentan la peroxidación de los lípidos sin que esta protección sea acompañada por un decremento en la peroxidación (Bettger et al., 1978; Pasantes-Morales y Cruz, 1984). En una preparación de segmentos externos de fotorreceptores, el zinc y la taurina agregados simultáneamente, protegen contra las alteraciones morfológicas producidas por sulfato ferroso sin que disminuya el grado de peroxidación, por lo que se piensa que protegen en una etapa posterior a ésta, posiblemente regulando la permeabilidad de la membrana, evitando la entrada excesiva de iones y agua (Pasantes-Morales y Cruz, 1984). En músculo, el zinc altera la permeabilidad a los principales iones, la fuerza contráctil, el potencial transmembranal y la actividad espontánea (Chavapil,

1973; Bettger y O'Dell, 1981).

El zinc también muestra una acción protectora contra los efectos de los compuestos retinoides (retinol y ácido retinoico) sobre la viabilidad y el contenido de agua de células linfoblastoides humanas en cultivo (Pasantes-Morales et al., 1984). La protección por zinc es aditiva con la observada con taurina y con la de la vitamina E, mostrando un efecto protector del 100% en presencia de los tres compuestos. El efecto del zinc es específico, ya que concentraciones altas de calcio, magnesio, manganeso o cobalto, no mostraron ninguna acción protectora.

La presencia de zinc durante el aislamiento de fracciones membranales promueve la cohesión y mantiene la actividad de enzimas de membrana (Chvapil, 1973). También concentraciones elevadas de zinc protegen contra la fragilidad osmótica de los eritrocitos, lo mismo que contra la hemólisis inducida por varias toxinas (Bettger y O'Dell, 1981). El suministro de zinc in vivo protege contra el efecto producido por toxinas bacterianas y tetracloruro de carbono, igual que del daño testicular inducido por cadmio y de la necrosis cardíaca producida por isoproterenol (Chvapil, 1973; Bettger y O'Dell, 1981).

Chvapil ha propuesto que el zinc interacciona a nivel de la membrana celular a tres niveles: 1) con enzimas que controlan la integridad membranal; 2) con componentes macromoleculares de la membrana, cambiando su conformación o la especificidad enzima-sustrato; y 3) intererencia con el proceso de peroxidación de lípidos de membrana.

## OBJETIVOS

A pesar de que se ha demostrado de manera concluyente la participación de la taurina en procesos fisiológicos muy diversos, no se ha determinado aún el mecanismo básico por medio del cual interviene en dichos procesos. Una de las hipótesis propuestas para explicar los efectos fisiológicos producidos por la taurina en tejidos excitables, considera que el aminoácido funciona primariamente como modulador de los flujos de calcio a través de las membranas biológicas. Las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha para apoyar esta hipótesis han caracterizado los efectos de la taurina en los flujos de calcio sólo en condiciones basales y no se ha evaluado su efecto bajo condiciones de despolarización de la membrana celular, lo cual simularía de una manera aproximada un estado de actividad neuronal. En vista de ello, se decidió investigar en el presente trabajo el posible efecto del aminoácido sobre la captura de calcio en presencia de una concentración despolarizante de cloruro de potasio (56 mM), en terminales nerviosas de cerebro de rata.

Por otra parte se conoce que la acumulación de calcio en las terminales nerviosas requiere de la presencia de fosfato en un medio de incubación con calcio 2.5 mM, y que el efecto inhibitor producido por la taurina en la captura del ión bajo estas condiciones, no se observa en un medio carente de fosfatos (Pasantés-Morales et al., 1982). En el presente trabajo se investigó la importancia del fosfato en la acumulación de calcio

en terminales nerviosas, en condiciones basales y bajo despolarización, en un medio de incubación con bajo calcio (25  $\mu$ M), además de su relación con el posible efecto de la taurina en la acumulación de calcio producida bajo condiciones de despolarización.

Se ha reportado que la sustancia amortiguadora de pH utilizada interviene per se con los mecanismos de acumulación de calcio (Pasantes-Morales y López-Colomé, 1981) y que puede ser determinante en el efecto producido por la taurina en la captura de calcio en condiciones basales (Pasantes-Morales et al., 1982). Con objeto de determinar la importancia del amortiguador en la captura de calcio en condiciones de despolarización con cloruro de potasio (56 mM), se emplearon dos amortiguadores diferentes: TRIS Y HEPES.

Existen pruebas indirectas de que el zinc disminuye la permeabilidad de la membrana celular a los iones en diversas condiciones experimentales que dañan la integridad membranal (Pasantes-Morales y Cruz, 1984; Pasantes-Morales et al., 1984). Considerando esto y el hecho de que algunos de los efectos de la taurina en diversas preparaciones experimentales se ven potenciadas o se observan únicamente en presencia de zinc (Pasantes-Morales y Cruz, 1984; Pasantes-Morales et al., 1984) se decidió evaluar su efecto en la captura de calcio, con el fin de determinar si algunas de sus acciones pudieran explicarse a través de la mediación del ión calcio.

Con el fin de determinar posibles diferencias regionales en los procesos de acumulación de calcio, la mayoría de los experimentos se realizaron en terminaciones nerviosas del

cerebelo y de la corteza cerebral de rata.

## METODOS

### 1. Obtención de la fracción sinaptosomal cruda ( $P_2$ )

Se utilizaron ratas albinas Wistar, con un peso de aproximadamente 120 gr. Se sacrificaron por decapitación, separándose rápidamente el cerebelo y la corteza cerebral. El tejido se homogeneizó en sacarosa 0.32 M (10% peso/volumen) a 650 rpm, en un homogeneizador Potter Elvejem de vidrio, con un pistón de teflón. Todo lo anterior se realizó en frío y se hizo lo más rápido posible para evitar al máximo la autólisis y el deterioro del tejido. El homogenado resultante se centrifugó a  $1000 \times g$  durante 10 minutos; el sobrenadante se separó por decantación y el precipitado formado, correspondiente a la fracción nuclear ( $P_1$ ), se resuspendió en la mitad del volumen inicial de sacarosa 0.32 M y se repitió la centrifugación. Se mezclaron ambos sobrenadantes y se centrifugó a  $10\ 000 \times g$  durante 20 minutos; el sedimento así obtenido corresponde a la fracción sinaptosomal cruda ó  $P_2$ , constituida principalmente por terminales sinápticas aisladas y mitocondrias. En la mayor parte de los experimentos se obtuvo la fracción dividida en dos sedimentos iguales, para tratarlos con un medio con o sin fosfato de manera independiente.

## 2. Cuantificación del transporte de Calcio.

La fracción sinaptosomal cruda se resuspendió en 0.65 ml de medio Krebs-Hepes o Krebs-Tris, con una concentración baja de calcio (25  $\mu\text{M}$ ). Cuando se despolarizó la preparación con KCl (56 mM) se redujo la concentración de NaCl a 66.7 mM para mantener la osmolaridad del medio. La composición iónica completa del medio utilizado fue (en mM): NaCl, 118; KCl, 4.7;  $\text{MgSO}_4$ , 1.17;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 (omitido en el medio sin fosfato);  $\text{CaCl}_2$ , 25  $\mu\text{M}$ ; glucosa, 5.6; TRIS o HEPES, 25. Una vez resuspendido el tejido se separó 0.1 ml para determinar el contenido de proteína por el método de Lowry, (Lowry, 1951) y 0.3 ml en dos tubos, uno control y el otro con 25 mM de taurina. Ambos se incubaron a 37 grados centígrados durante 20 minutos, con agitación suave.

La acumulación de calcio se inició agregando 100  $\mu\text{l}$  de tejido preincubado a viales con 0.7 ml de medio conteniendo  $^{45}\text{CaCl}_2$  (1.1  $\mu\text{Ci/ml}$ , final) en todos los ensayos; KCl (56 mM, final) en todas las mediciones en condiciones de despolarización y taurina (25 mM, final) cuando correspondía. Se incubó 30 segundos a 37 grados centígrados en un baño con agitación, deteniéndose la reacción por dilución del medio con 5 ml de medio frío con magnesio en una concentración diez veces mayor de la del medio normal, esto es 11.7 mM, y 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Se tomaron 2 alícuotas de 2.7 ml cada una y se filtraron en filtros millipore de 0.65  $\mu\text{m}$  de poro. Cada filtro se lavó con 2 ml del mismo medio con magnesio 11.7 mM y 250  $\mu\text{M}$  de calcio. Finalmente la radiactividad de cada filtro se midió en un contador de

centelleo, con 5 ml de tritosol (líquido de centelleo) en cada vial.

## RESULTADOS

1. Captura de  $\text{Ca}^{45}$  en fracción sinaptosomal cruda ( $P_2$ ) en respuesta a una concentración despolarizante de KCl (56 mM): Efecto del amortiguador de la solución fisiológica y diferencias entre las regiones cerebrales utilizadas.

La figuras 1 y 2 muestran el incremento en la captura de  $\text{Ca}^{45}$  en la fracción  $P_2$  de las regiones cerebrales estudiadas, cerebelo y corteza cerebral, cuando se utilizan concentraciones despolarizantes de KCl, en un medio Krebs-HEPES y en un medio Krebs-TRIS. Esta última condición sólo se examinó en la preparación de cerebelo.

Cuando se utilizó HEPES como amortiguador, la captura de  $\text{Ca}^{45}$  estimulada por concentraciones despolarizantes de potasio, en fracción  $P_2$  de cerebelo se incrementó 45%, partiendo de un valor basal de  $12.56 \pm 0.77$  cpm/ug de proteína a  $18.24 \pm 1.89$  cpm/ug de proteína, en presencia de potasio 56 mM ( $P < 0.01$ ). Bajo estas mismas condiciones, en fracción  $P_2$  de corteza cerebral, la captura de  $\text{Ca}^{45}$  aumentó 102%, a partir de un valor basal de  $6.68 \pm 0.097$  cpm/ug prot. a  $13.52 \pm 0.946$  cpm/ug prot. en presencia de potasio 56 mM ( $P < 0.001$ ). Puede observarse que la captura basal de  $\text{Ca}^{45}$  en las dos fracciones fue sensiblemente diferente, sin embargo el valor obtenido para la captura exclusivamente dependiente de despolarización (valor obtenido restando la

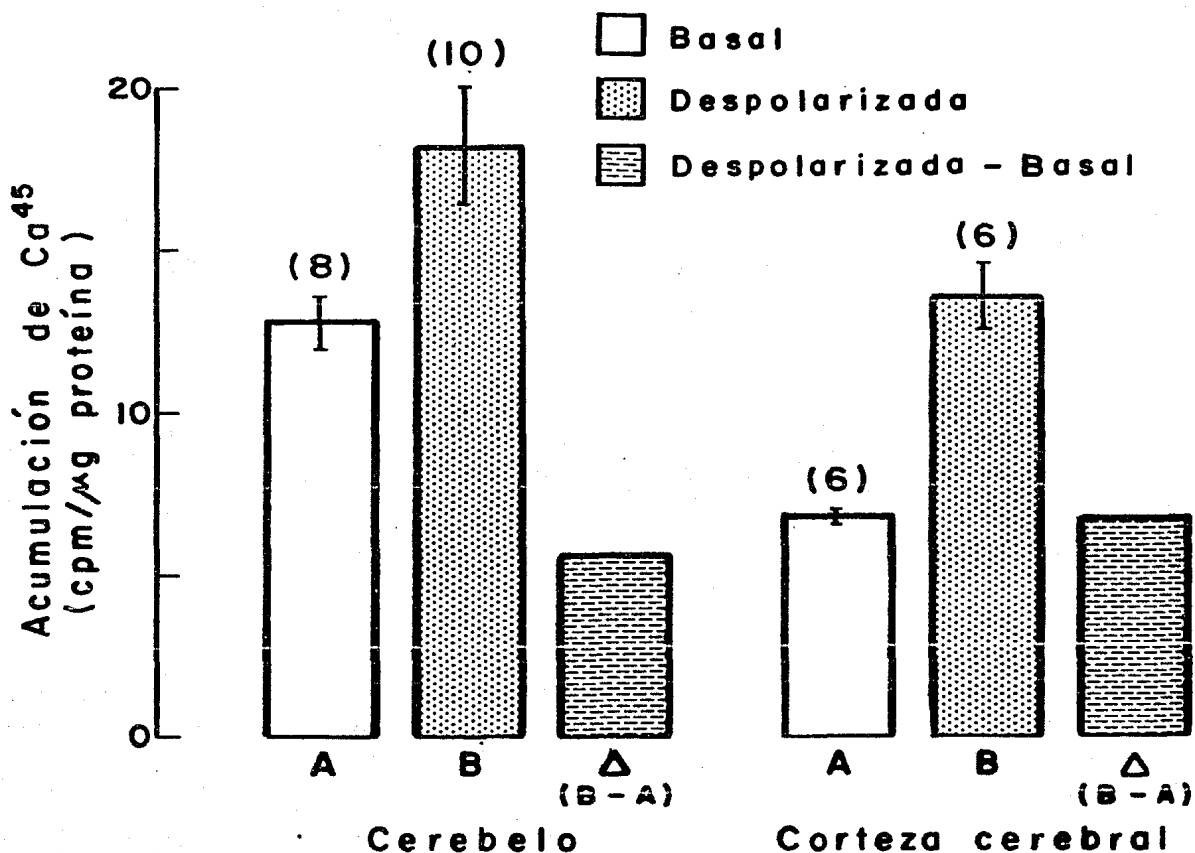


FIGURA 1. Acumulación de  $Ca^{45}$  por la fracción sinaptosomal cruda ( $P_2$ ) de cerebelo y corteza cerebral de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM. En esta condición se disminuyó el NaCl en una concentración equivalente al aumento de KCl para mantener constante la osmolaridad del medio. La concentración de calcio en el medio Krebs-Hepes fue 25  $\mu$ M. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre parentesis.



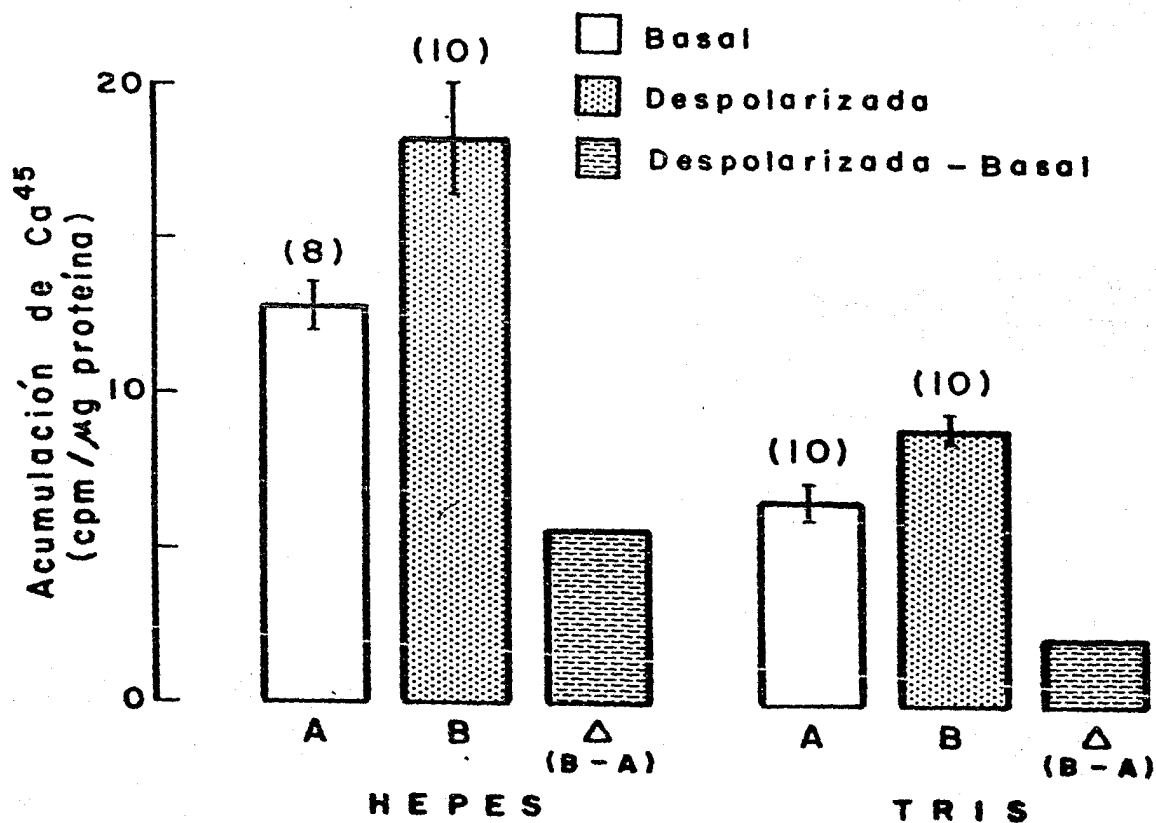


FIGURA 2. Efecto del amortiguador en la captura de  $Ca^{45}$  por la fracción sinaptosomal cruda ( $P_2$ ) de cerebelo de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM. La concentración de calcio en el medio de incubación fue 25  $\mu$ M. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre parentesis.

acumulación basal de calcio de la acumulación observada en presencia de KCl 56 mM) es similar en las dos fracciones sinaptosomales (Fig. 1).

Cuando se midió la captura de  $\text{Ca}^{45}$  en la fracción  $\text{P}_2$  de cerebelo y el amortiguador utilizado fue TRIS en lugar de HEPES, se observó un decremento tanto en los niveles de acumulación basal como en la estimulada. Bajo estas condiciones la captura basal de  $\text{Ca}^{45}$  se redujo de  $12.56 \pm 0.77$  cpm/ug prot. observada con HEPES a  $6.70 \pm 0.66$  cpm/ug prot. ( $P < 0.001$ ) y la captura bajo despolarización se incrementó solamente 34% ( $P < 0.001$ ) sobre el valor basal, a diferencia del 45% observado con HEPES (Fig. 2).

## 2. Efecto de la omisión del fosfato sobre la captura de $\text{Ca}^{45}$ en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM.

El efecto de la omisión del fosfato en los procesos de acumulación de calcio en las preparaciones de cerebelo y corteza cerebral se muestra en las figuras 3, 4 y 5.

En un medio completo (con fosfatos), amortiguado con HEPES, el valor de acumulación de  $\text{Ca}^{45}$  bajo condiciones basales en la fracción  $\text{P}_2$  de cerebelo fue de  $12.56 \pm 0.77$  cpm/ug prot., incrementándose a  $18.24 \pm 1.89$  cpm/ug prot. en presencia de KCl 56 mM. Cuando el fosfato fue omitido del medio de incubación, la captura basal se redujo a sólo  $7.15 \pm 0.64$  cpm/ug prot. ( $P < 0.001$ ) y bajo despolarización a  $13.11 \pm 1.8$  cpm/ug prot. ( $P < 0.001$ ). Nótese que la disminución en la acumulación bajo condiciones de despolarización se debe únicamente a una reducción en la acumulación basal, ya que ésta en un medio sin fosfatos es

sólo del 57% del valor observado en un medio completo. En estas condiciones, la acumulación neta por despolarización no se ve afectada por la omisión de fosfato, ya que es de 5.68 cpm/ug prot. en un medio completo y de 5.96 cpm/ug prot. en un medio sin fosfato (Fig. 3).

En la figura 4 se observa que la omisión del fosfato del medio, altera de manera similar la acumulación de calcio basal en la fracción P<sub>2</sub> de corteza cerebral. En un medio completo la acumulación basal fue de 6.68  $\pm$  0.097 cpm/ug prot., mientras que en un medio sin fosfato esta acumulación se reduce a 3.83  $\pm$  0.37 cpm/ug prot. (P<0.001), correspondiendo a un 57% del valor control. Sin embargo, a diferencia de la fracción de cerebelo, el valor de captura de calcio exclusivamente dependiente de despolarización también se redujo a un 51% del valor control, en un medio carente de fosfato. En el medio completo el valor basal de 6.68  $\pm$  0.097 cpm/ug prot. se incrementó a 13.52  $\pm$  0.946 cpm/ug prot. en presencia de KCl 56 mM, dando un valor neto de despolarización de 6.84 cpm/ug prot. En cambio este valor es de sólo 3.48 cpm/ug prot. en un medio sin fosfato, ya que el valor basal de 3.83  $\pm$  0.336 cpm/ug prot. se incrementó a sólo 7.31  $\pm$  0.35 cpm/ug prot. (P<0.001, comparando la acumulación bajo despolarización en un medio completo con la observada en un medio sin fosfatos).

Cuando se utilizó TRIS como amortiguador (Fig. 5) se observó que la captura basal de calcio en una fracción P<sub>2</sub> de cerebelo, se redujo a un 52% cuando se suprime el fosfato del medio de incubación, ya que de 6.70  $\pm$  0.66 cpm/ug prot. en el medio

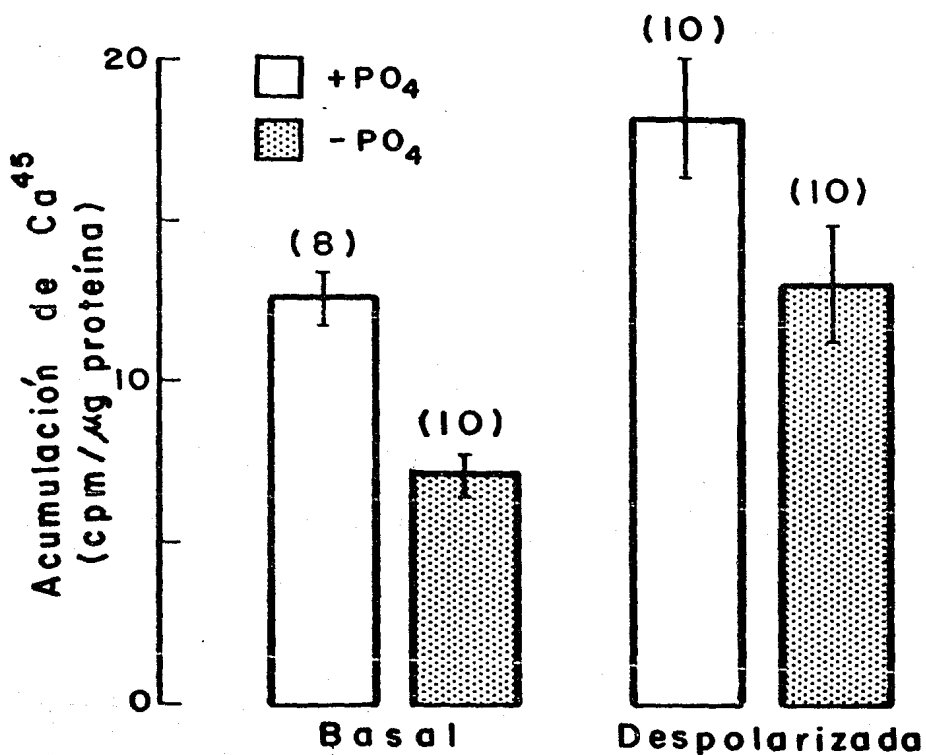


FIGURA 3. Efecto de la omisión de fosfato del medio de incubación en la captura de  $Ca^{45}$  por la fracción sinaptosomal cruda de cerebelo de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en un medio Krebs-Hepes con una concentración de calcio de 25  $\mu$ M. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estandar. El número de experimentos se indica entre paréntesis.

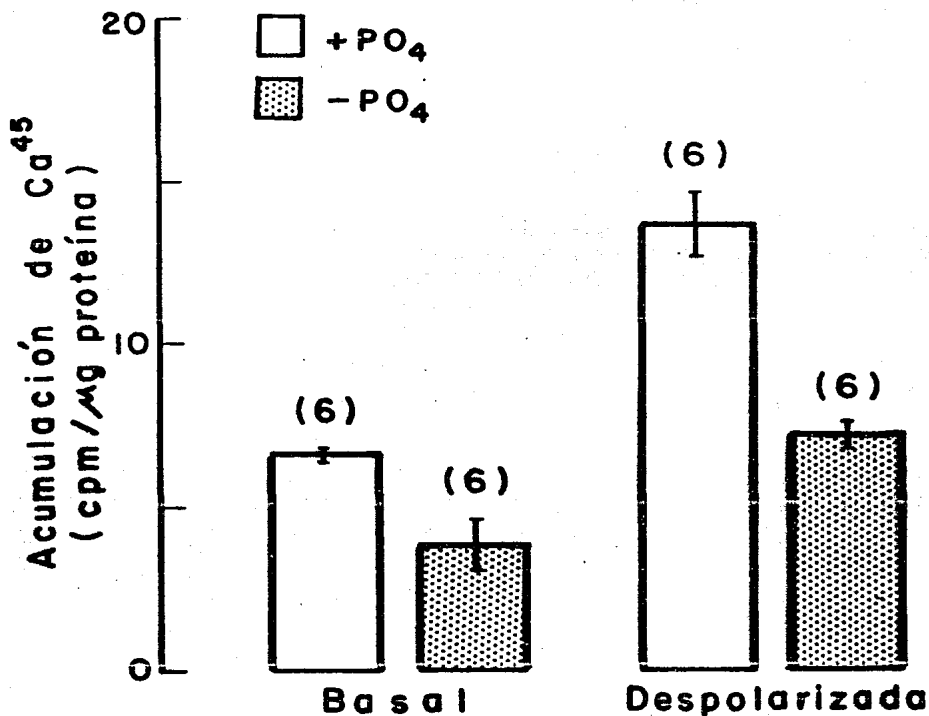


FIGURA 4. Efecto de la omisión de fosfato del medio de incubación en la captura de Ca<sup>45</sup> por la fracción sinaptosomal cruda de corteza cerebral de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en un medio Krebs-Hepes con una concentración de calcio de 25  $\mu$ M. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre paréntesis.

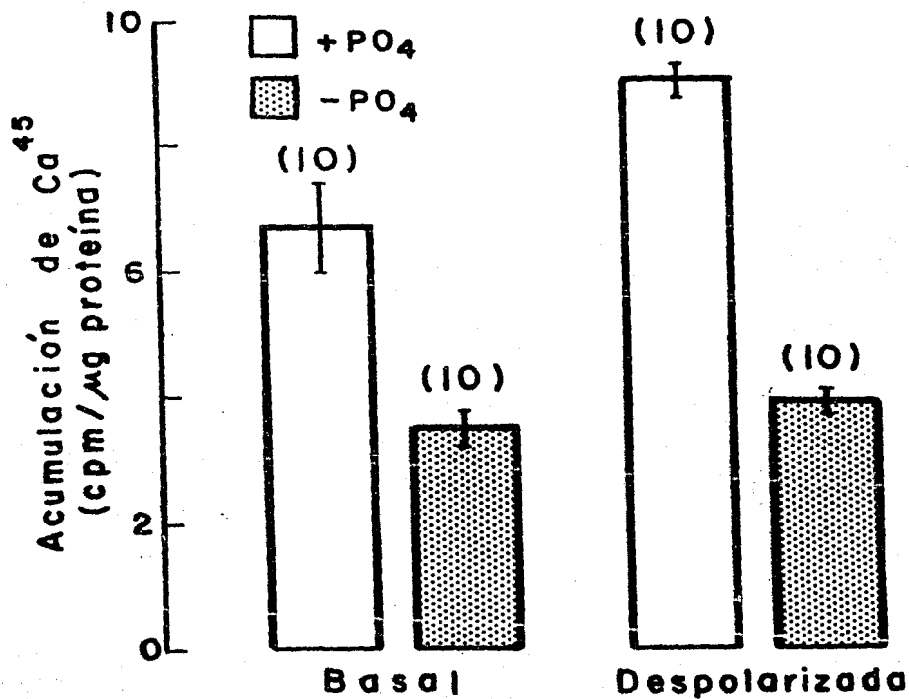


FIGURA 5. Efecto de la omisión de fosfato del medio de incubación en la captura de  $Ca^{45}$  por la fracción sinaptosomal cruda de cerebelo de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en un medio Krebs-Tris con una concentración de calcio de 25  $\mu$ M. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre paréntesis.

normal, se reduce a  $3.50 \pm 0.30$  cpm/ug prot. ( $P < 0.001$ ) en el medio sin fosfato. En cuanto a la respuesta por despolarización, en el medio normal la acumulación se incrementó a  $8.96 \pm 0.30$  cpm/ug prot., mientras que en un medio carente de fosfato la acumulación permanece en un valor de  $3.86 \pm 0.22$  cpm/ug prot. ( $P < 0.001$ , comparando la acumulación bajo despolarización en un medio completo con la observada en un medio carente de fosfatos).

3. Efecto de la taurina sobre la captura de  $Ca^{45}$  en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en presencia y ausencia de fosfato.

En la preparación de cerebelo, utilizando HEPES como amortiguador del pH (Fig. 6), la taurina (25 mM) incrementó 13% (tau vs. control,  $P < 0.05$ ) la acumulación de calcio basal y 21% (tau vs. control,  $P < 0.05$ ) la acumulación bajo despolarización con KCl a una concentración de 56 mM. Cuando se omitió el fosfato del medio, el aumento producido por la taurina sobre la captura basal se redujo a 9% (estadísticamente no significativo), mientras que la captura en presencia de concentraciones despolarizantes de KCl se inhibe 7% (estadísticamente no significativo).

Bajo estas mismas condiciones, pero en una fracción de corteza cerebral (Fig. 7), la taurina (25 mM) incrementó 24% ( $P < 0.001$ ) y 8% (estadísticamente no significativo) la acumulación de calcio basal y bajo despolarización, respectivamente. Al incubar en un medio sin fosfato, el incremento en la captura basal fue de 17% (estadísticamente no significativo) y de 4% (estadísticamente no significativo) en la captura bajo

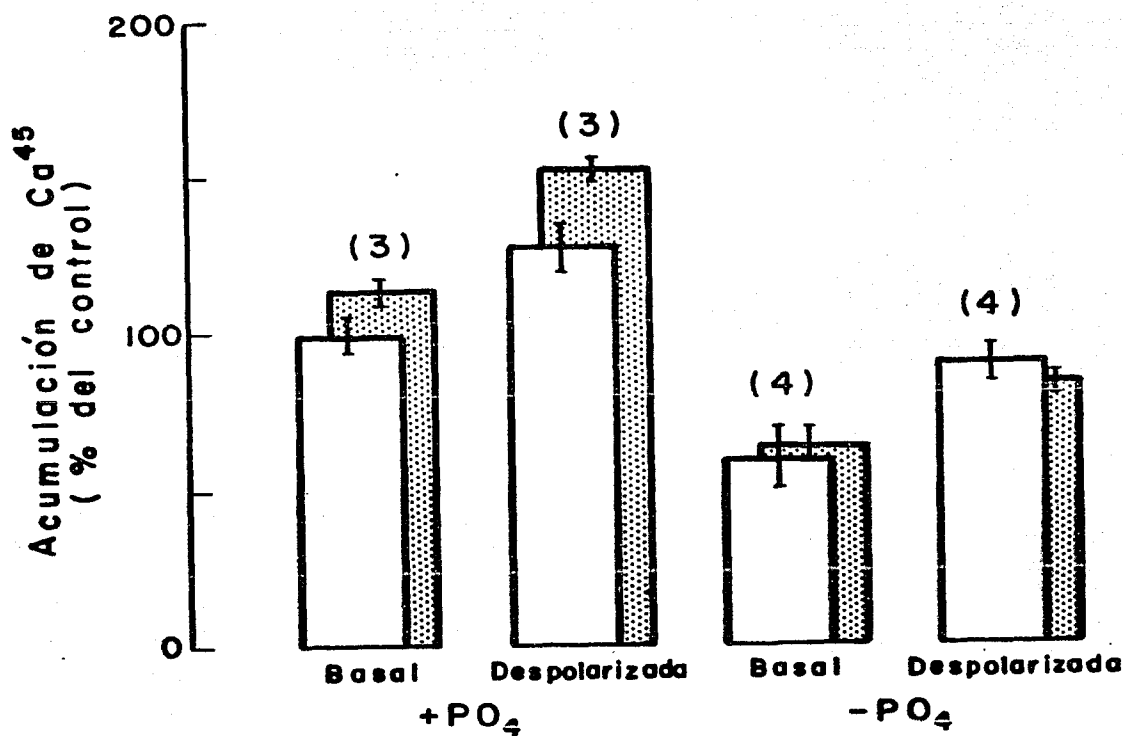


FIGURA 6. Efecto de la taurina (25 mM, concentración final) en la captura de  $Ca^{45}$  por la fracción sinaptosomal cruda de cerebelo de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en un medio Krebs-Hepes +  $PO_4$  con calcio 25  $\mu M$ . Se consideró como 100% la acumulación de  $Ca^{45}$  basal en un medio completo (con fosfatos) y todas las condiciones estudiadas se reportan en función de este valor. Las barras sombreadas corresponden a la captura de  $Ca^{45}$  en presencia de taurina y las barras vacías al control respectivo. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre paréntesis.



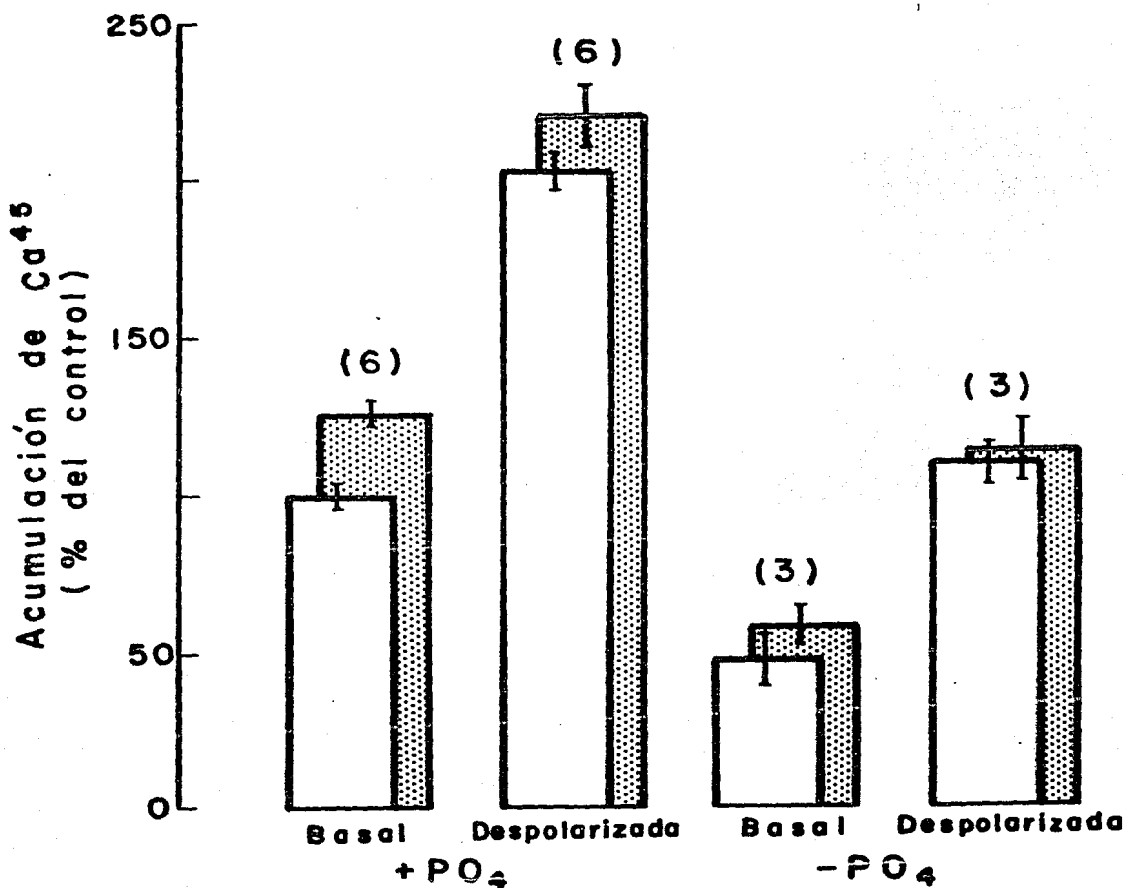


FIGURA 7. Efecto de la taurina (25 mM, concentración final) en la captura de Ca<sup>45</sup> por la fracción sinaptosomal cruda de corteza cerebral de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en un medio Krebs-Hepes  $\pm$  PO<sub>4</sub> con una concentración de calcio 25 uM. La expresión de los resultados es idéntica a la descrita en la figura 5. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre parentesis.

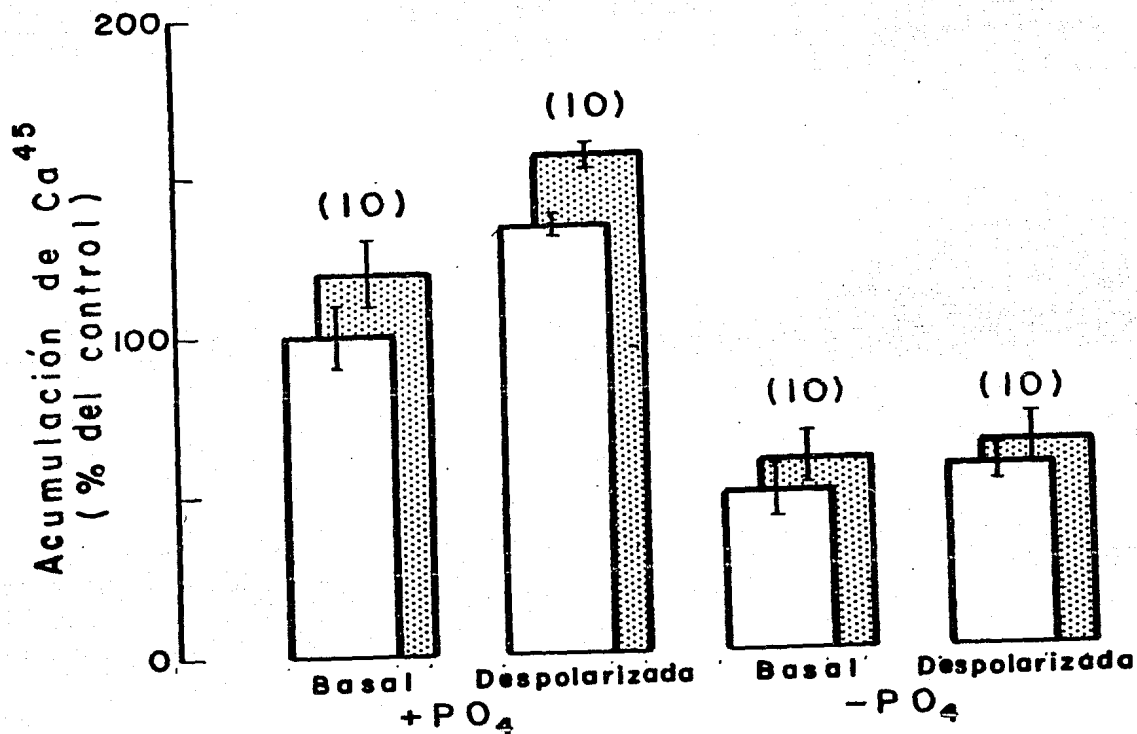


FIGURA 8. Efecto de la taurina (25 mM, concentración final) en la captura de  $Ca^{45}$  por la fracción sinaptosomal cruda de cerebro de rata, en condiciones basales y bajo despolarización con KCl 56 mM, en un medio Krebs-Tris  $+ PO_4$  con una concentración de calcio 25  $\mu M$ . La expresión de los resultados es idéntica a la descrita en la figura 5. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre parentesis.

despolarización.

Cuando se utilizó TRIS y no HEPES como amortiguador, en la fracción de cerebelo, la taurina (25 mM) produjo un incremento de 19% (estadísticamente no significativo) en la acumulación basal y de 15% ( $P < 0.001$ ) en la acumulación bajo despolarización. Cuando se eliminó el fosfato del medio, la taurina incrementó 14% (estadísticamente no significativo) y 7% (estadísticamente no significativo) la acumulación basal y bajo despolarización, respectivamente.

#### 4. Efecto de zinc en la acumulación basal de $Ca^{45}$

La figura 9 muestra que la presencia de zinc 250  $\mu$ M en un medio Krebs-HEPES sin fosfato, inhibió la acumulación de  $Ca^{45}$  en una fracción  $P_2$  de cerebelo aproximadamente 25% ( $P < 0.001$ ). Bajo estas mismas condiciones, pero en presencia de fosfato, el zinc aumentó la cantidad de radiactividad en los filtros de ensayo, tanto en presencia como en ausencia de tejido (no se muestra), por lo que no fue posible evaluar su efecto en la captura de calcio por la fracción en presencia de fosfato.

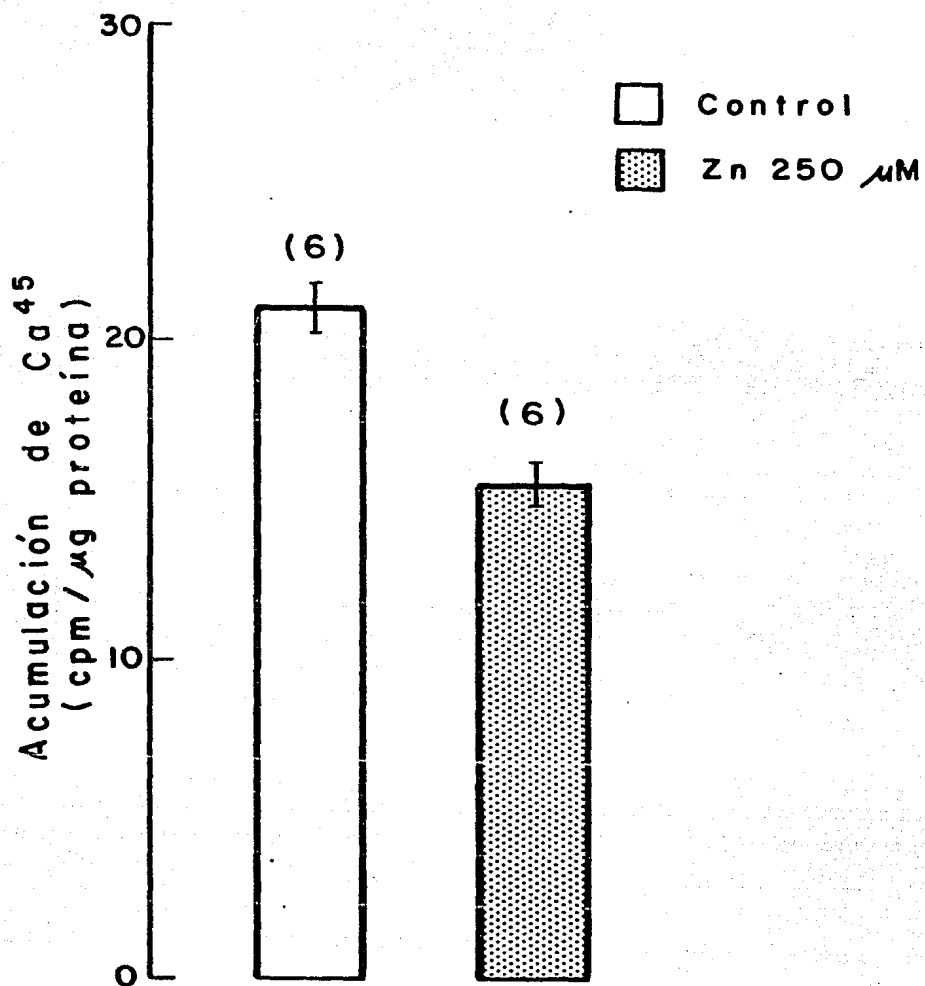


FIGURA 9. Efecto de zinc (250 μM, concentración final) en la captura de Ca<sup>45</sup> por la fracción sinaptosomal cruda de cerebelo de rata, en condiciones básicas, en un medio Krebs-Hepes sin fosfato y con una concentración de calcio de 25 μM. Los valores graficados corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica entre parentesis.

## DISCUSION

Se conoce que los mecanismos involucrados en la acumulación de calcio en el sistema nervioso son distintos dependiendo de la concentración del ión en el medio extracelular (López-Colomé y Pasantes-Morales, 1981). De acuerdo a esto pueden distinguirse claramente dos tipos de mecanismos de transporte de calcio: 1) los que se activan con una concentración elevada de calcio, que corresponde a la que normalmente se encuentra en el espacio extracelular (2.5 mM), y 2) aquellos que intervienen a bajas concentraciones del ión (10 a 100  $\mu$ M). La acumulación de calcio es afectada por diferentes factores en función de los mecanismos implicados en el proceso de captura. En presencia de calcio 2.5 mM, la acumulación de calcio por las terminales nerviosas disminuye significativamente por incubación a 4 grados centígrados y por la omisión de fosfato en el medio. La reversión del gradiente de sodio aumenta dicha acumulación, indicando la participación del intercambiador sodio-calcio. El ATP, la ouabaina, el rojo de rutenio y la oligomicina no alteran la captura de calcio bajo estas condiciones (Pasantes-Morales y Morán, 1981; Pasantes-Morales et al., 1982). Cuando la concentración de calcio es de 100  $\mu$ M o menor, la acumulación es fuertemente estimulada por la presencia de ATP, indicando la participación de una ATPasa. Los compuestos que afectan la función mitocondrial, como la oligomicina y el dinitrofenol, no afectan la acumulación de calcio en estas condiciones, pero ésta disminuye en presencia del rojo de rutenio. El fosfato tampoco

modifica la acumulación de calcio bajo las condiciones de baja concentración extracelular del catión (Pasantes-Morales et al., 1982).

Aunque se ha reportado que concentraciones elevadas de potasio estimulan la acumulación de calcio en medios que contienen tanto concentraciones extracelulares altas como bajas (Nachshen y Blaustein, 1979; Carboni et al., 1985), en este estudio se eligió realizar la totalidad de los experimentos con una concentración baja del ión (25  $\mu$ M) en la solución fisiológica, debido a que los efectos de las concentraciones altas de potasio son más evidentes en esta condición. Así, los resultados presentados en este trabajo se refieren únicamente a los efectos sobre acumulación de calcio que son evidentes cuando operan los mecanismos de acumulación a una baja concentración del calcio.

1. Diferencias entre la acumulación de calcio por las fracciones sinaptosomales del cerebelo y de la corteza cerebral.

La acumulación basal de calcio en las terminales nerviosas de la corteza cerebral es claramente menor (aproximadamente un 50%), que la acumulación observada en la preparación de cerebelo, en un medio Krebs-HEPES. Sin embargo la acumulación de calcio dependiente exclusivamente de la despolarización fué muy similar en ambas fracciones. La medida de la entrada de calcio bajo condiciones de despolarización se obtuvo sustrayendo la acumulación basal de la acumulación observada en presencia de concentraciones elevadas de potasio, debido a que en esta última

condición también están activos los mecanismos que funcionan en condiciones basales. Estos resultados parecen indicar que en un estado de reposo, la afinidad de las terminales nerviosas del cerebelo por el calcio, es mayor que la de las terminales de la corteza cerebral, pero que probablemente en un estado activo, simulado por la despolarización, el incremento en la acumulación del ión es igualmente importante en las dos regiones. El mecanismo principal responsable de la acumulación de calcio bajo despolarización es el canal sensible a cambios de voltaje en la membrana celular, el cual ha sido bien caracterizado en las terminales nerviosas (Nachshen y Blaustein, 1979; Carboni et al., 1985). Sin embargo el calcio basal juega también un papel importante en términos de una posible estabilización de la membrana celular por apantallamiento de cargas de superficie, aumentando el umbral de excitabilidad (Frankenhaeuser y Hodgking, 1957).

## 2. Influencia del amortiguador de pH en los procesos de acumulación de calcio.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el amortiguador utilizado tiene una clara influencia en los procesos de acumulación de calcio. En la preparación de terminales nerviosas de cerebelo, tanto los valores de acumulación basal como los dependientes exclusivamente de la despolarización por alto potasio, se reducen significativamente cuando se utiliza TRIS en comparación con lo que se observa en presencia de HEPES.

En el músculo liso de aorta y vena porta de la rata se ha descrito una acción inhibitoria del TRIS usado como amortiguador tanto sobre la actividad mecánica espontánea como en la inducida por adrenalina, angiotensina y alto potasio. Se ha sugerido que esta acción del TRIS se ejerce a través de una reducción en la cantidad de calcio intracelular disponible para la contracción muscular (Prasad et al., 1978). Esto muestra que el efecto del TRIS tiene lugar tanto en condiciones de reposo (actividad espontánea) como en un estado activo. Los estudios encaminados a analizar directamente el efecto del TRIS sobre los flujos de calcio en el músculo liso de aorta y vena porta, han mostrado efectivamente una reducción en la captura del ión (Prasad et al., 1978).

La importancia del amortiguador en los estudios de acumulación de calcio también ha sido demostrada en una preparación de segmentos externos del fotorreceptor de la rana (López-Colomé y Pasantes-Morales, 1981). En esta preparación la sustitución del bicarbonato por Imidazol, TRIS y HEPES, en un medio con calcio 100  $\mu$ M produce un incremento importante en la captura de calcio (de aproximadamente 100%) por los segmentos externos. Este aumento es menor en presencia de TRIS que en presencia de HEPES. Cuando la acumulación se mide en condiciones de calcio extracelular fisiológico (2.5 mM), el efecto de estos amortiguadores es el inverso, observándose una disminución en la captura de calcio.

Se ha propuesto que el mecanismo por el cual el TRIS inhibe la acumulación de calcio es mediante la unión a los grupos polares de la membrana celular a través de sus tres grupos



hidroxilo, dejando así expuestas un mayor número de cargas positivas que repelerían a los iones de igual carga, dificultándose entonces el movimiento de cationes a través de la membrana celular (Prasad et al., 1979). Este mecanismo puede ser válido tanto para explicar el efecto del TRIS en la acumulación basal de calcio, como el efecto observado en este trabajo sobre la acumulación dependiente exclusivamente de la despolarización de la membrana sináptica. Es importante tener en cuenta estos efectos tanto en los estudios exclusivamente bioquímicos en los que se mide directamente el flujo de calcio, como en los trabajos en los que los efectos mediados por el calcio se observan secundariamente.

### 3. Efecto de la omisión del fosfato.

El fosfato parece participar en forma muy importante en los mecanismos de acumulación de calcio. En un estudio llevado a cabo por Pasantes-Morales et al., (1982) en segmentos externos de fotorreceptores y en terminales nerviosas de cerebro de rana en un medio con calcio 2.5 mM, se menciona que la captura del ión disminuye en forma notable al omitir el fosfato del medio de incubación. En este mismo trabajo se demuestra que el fosfato no es relevante para los mecanismos involucrados en la captura del ión que operan a bajas concentraciones de calcio. Sin embargo Lombardini (1983) ha demostrado en membranas de la retina de rata, que el fosfato es igualmente importante en la acumulación de calcio cuando el proceso se mide a concentraciones extracelulares bajas. En estas condiciones se caracterizaron dos

sistemas de acumulación de calcio, uno de baja y otro de alta afinidad. La capacidad máxima ( $V_{m\acute{a}x.}$ ) del mecanismo de baja afinidad fué el único parámetro afectado en ausencia del fosfato. Las  $K_m$  de los dos sistemas y la  $V_{m\acute{a}x.}$  del sistema de alta afinidad permanecieron inalterados en dicha condición. Como se observa en este trabajo, el fosfato también es determinante en los mecanismos de acumulación de calcio por las terminales nerviosas del cerebro de la rata, a bajas concentraciones de calcio. Independientemente de la región cerebral y del amortiguador utilizado, la acumulación basal de calcio se reduce en un 43% a un 48% cuando se elimina el fosfato, en relación al valor obtenido en un medio completo (con fosfato). Para explicar esta dependencia de fosfato se ha planteado la existencia de un co-transporte calcio-fosfato. Esta hipótesis se sustenta por los estudios que muestran que las condiciones que disminuyen la captura de calcio tales como el rojo de rutenio, o la omisión de calcio, disminuyen también la captura de fosforo radiactivo (Pasantes-Morales et al., 1982).

Se ha descrito que el transporte de calcio en las mitocondrias del cerebro es muy dependiente de fosfatos (Meela y Wrobel-Kuhl, 1978), sugiriéndose que el requerimiento de este anión se sitúa a nivel de los sitios de unión de calcio en el interior de la mitocondria, encargados del desprendimiento del calcio del transportador localizado en la membrana mitocondrial una vez que el ión ha sido introducido al interior de la mitocondria. En los resultados presentados en este estudio, no puede descartarse la posibilidad de que la dependencia de fosfato

en la acumulación de calcio, se deba a un proceso de acumulación mitocondrial, ya que la fracción sinaptosomal cruda tiene, además de las terminales sinápticas, un componente importante de mitocondrias y vesículas de membranas gliales reselladas. Esto explicaría la discrepancia con los resultados de Pasantes-Morales et al., (1982), quienes utilizaron una fracción sinaptosomal purificada y no encontraron dependencia de fosfato en la acumulación de calcio con bajas concentraciones del ión en la solución fisiológica.

#### 4. Efecto de la taurina en la acumulación de calcio

A pesar de que se han caracterizado muchos de los efectos fisiológicos y farmacológicos de la taurina en diversas preparaciones, no se ha logrado establecer el mecanismo por el cual se producen estos efectos. Una de las hipótesis propuestas considera que la taurina actúa primariamente como modulador de los flujos de calcio y que esta acción unificaría los diferentes efectos del aminoácido observados en las distintas preparaciones estudiadas.

Efectivamente, gran número de las acciones de la taurina en preparaciones de músculo y en preparaciones nerviosas parecen estar mediados por procesos que involucran al calcio. En el corazón, la taurina tiene un efecto inotrópico positivo (aumento en la fuerza de contracción) con bajas concentraciones de calcio y un efecto inotrópico negativo con altas concentraciones de calcio en el medio. La taurina, además, protege del fenómeno conocido como la paradoja del calcio, que consiste en la

aparición de un gran daño celular producido por una sobrecarga de calcio, cuando se perfunde el corazón con una concentración fisiológica de calcio después de haber sido perfundido con un medio libre del catión. En el hamster cardiomiopático existe un desarreglo genético en el que los procesos que regulan la concentración intracelular de calcio en el corazón están dañados, por lo que progresivamente el calcio interno va aumentando hasta producir daño celular y necrosis; cuando a estos animales se les suministra taurina por vía oral, se retarda notablemente el tiempo de aparición de las lesiones. (Revisión de Huxtable y Sebring, 1983). El efecto de la taurina en los potenciales de acción de las fibras de Purkinje está asociado con un aumento en la concentración intracelular de calcio (Dolara et al., 1973).

Igualmente en el sistema nervioso el calcio parece participar de una manera muy importante en las acciones producidas por la taurina. El efecto protector del aminoácido contra diversos agentes inductores de estados convulsivos parece estar mediado por los iones calcio (Barbeau et al., 1976). Izumi et al., (1975) han mostrado que el efecto anticonvulsivo de la taurina contra metrazol requiere de la presencia de calcio. La taurina también protege de las convulsiones producidas por la 4-aminopiridina, la que probablemente provoca el estado convulsivo por un aumento en la entrada de calcio en las terminales nerviosas y la subsecuente descarga masiva de neurotransmisores (Lameignan, 1972). La taurina también antagoniza el efecto estimulante de la 4-aminopiridina en la contracción del íleo de cobayo (Arzate et al., 1984).

Cuando se analiza directamente el efecto de la taurina sobre

la acumulación de calcio se observa que, a concentraciones fisiológicas de calcio (2.5 mM) la taurina tiene un efecto inhibitor y que a bajas concentraciones del ión (menores de 100  $\mu$ M) estimula los mecanismos de acumulación. Este efecto estimulante se ejerce sobre la acumulación de calcio dependiente de ATP (Pasantes-Morales et al., 1982). El pequeño incremento producido por la taurina en la acumulación basal de calcio observado en el presente trabajo es significativo en la preparación de corteza cerebral y cerebelo Únicamente cuando se utiliza HEPES como amortiguador. Cuando se emplea TRIS en lugar de HEPES, la taurina no afecta significativamente la acumulación de calcio. Cuando se utiliza bicarbonato como amortiguador, la taurina tampoco afecta la acumulación basal de calcio (Kuriyama et al., 1978; Pasantes-Morales y Ordóñez, 1982). El incremento en la acumulación de calcio en presencia de taurina no se observa cuando se omite el fosfato, lo que indica que el aminoácido tiene una interacción con un proceso de acumulación de calcio dependiente de fosfato. Debido a que la taurina inhibe la acumulación de fosforo radiactivo, se ha propuesto que la taurina afecta primariamente la captura de fosfato y en forma secundaria la captura de calcio, debido a un sistema de cotransporte fosfato-calcio (Pasantes-Morales et al., 1982). Cuando se analiza el efecto de la taurina en la acumulación de calcio en presencia de una concentración despolarizante de potasio, parece que existe un incremento importante. Sin embargo, cuando se calcula la entrada de calcio dependiente exclusivamente de la despolarización, se observa que la taurina no modifica esta

entrada de calcio y que el efecto aparente se debe al incremento en la acumulación basal. En consecuencia puede concluirse que los efectos de la taurina relacionados con el calcio en el sistema nervioso no son el resultado de una acción directa sobre el flujo de calcio que desencadena la liberación de neurotransmisores en el proceso de excitación-secreción.

##### 5. Efecto de Zinc en la acumulación de calcio.

La inhibición en la captura de calcio en la fracción sinaptosomal cruda de cerebelo en presencia de zinc y ausencia de fosfatos indica una interacción de éste con los procesos de transporte iónico y permeabilidad celular. Es conocido que una dieta deficiente en zinc altera la capacidad de las células para regular su volumen y balance iónico (Bettger y O'Dell, 1981). También cuando se adiciona zinc a un medio conteniendo taurina se protege a los segmentos externos de los fotorreceptores de la entrada excesiva de iones y agua observada en presencia de sulfato ferroso (Pasantes-Morales y Cruz, 1984). A pesar de que la acción del zinc no pudo ser evaluado en un medio con fosfato debido al artefacto experimental observado, no se puede descartar que el zinc produzca un efecto similar en esas condiciones.

En las condiciones experimentales de este trabajo se utilizó un medio con calcio 25  $\mu\text{M}$  y la concentración de zinc probada fué de 250  $\mu\text{M}$ , por lo que a pesar de la especificidad de los sistemas de captura, no puede eliminarse la posibilidad de que la disminución en la acumulación de calcio se deba a un fenómeno competitivo, ya que tanto el calcio como el zinc son cationes

divalentes.

## REFERENCIAS

- Agrawal, H.C., Davis, S.M. y W.A. Hinwich (1966). Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain. *J. Neurochem.*, 13: 607-615.
- Agrawal, H.C., Davis, J.M. y W.A. Hinwich (1966). Postnatal changes in free amino acid pool of rabbit brain. *Brain Res.*, 3:374-380.
- Agrawal, H.C., Davison, A.N. y J.K. Kozmarek (1971). Subcellular distribution of taurine and cysteine sulfinic acid decarboxylase in developing rat brain. *Biochem. J.*, 122: 759-763.
- Aprison, M.H., y R. Werman (1968). A combined neurochemical and neurophysiological approach to identification of central nervous system transmitters. En: *Neurosciences Research, Vol 1* Ehrenpreis, S. y G.C. Solnitzky (eds.). Academic Press, New York., 143-174.
- Arzate, M.E., Ponce, H. y H. Pasantes-Morales (1984). Antagonistic effects of taurine and 4-aminopyridine on guinea pig ileum. *J. Neurosc. Res.* 11: 271-280.
- Barbeau, A. (1974). Zinc, taurine and epilepsy. *Arch. Neurol.*, 30: 52-58.
- Barbeau, A., Inowe, N., Tsukada, Y. y R.F. Butterworth (1976). The neuropharmacology of taurine. *Life Sci.*, 17: 669-678.
- Barbeau, A., Tsukada, Y. y N. Inowe (1976). Neuropharmacologic and behavioral effects of taurine. En: *Taurine*, Huxtable R. y A. Barbeau (eds). Raven Press, New York., 253-266.
- Bergamini, L., Mutani, R., Dalsedime, M. y L. Durelli (1974). First clinic experience on the antiepileptic action of taurine. *Eur. Neurol.*, 11: 261-269.
- Bettger, W.J., Fish, T.J. y B.C. O'Dell (1978). Effects of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158: 279-282.
- Bettger, W.J. y B.C. O'Dell (1981). A critical role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.*, 28: 1425-1438.
- Borle, A.B. (1981). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 90: 13-153.
- Borronei, A., Sacquegna, T. y G. Coccagna (1975). Use of taurine in continuous partial epilepsy. Observations of a case.



- Phronesis., 17: 401-415.
- Brierley, E., Murer, E. y E. Bachmann (1964). Studies on ion transport. III. Accumulation of calcium and inorganic phosphate by heart mitochondrion. Arch. Biochem. Biophys., 105: 89-102.
- Cavallini, D., De Marco, C., Mandovi, B. y F. Stirpe (1954). The biological oxidation of hipotaurine. Biochem. kBiophys. Acta., 15: 301-303.
- Clarck, R.M. y G.G.S. Collins (1975). The release of endogenous amino acids from the mammalian visual cortex. J. Physiol., 246: 16-20.
- Crabai, F., Sitzia, A. y G. Pepen (1979). Taurine concentration in the neurohypophysis of different animal species. J. Neurochem., 23: 1091-1092.
- Craig, C.R., y E.R. Hartmann (1973). Concentration of amino acids in the brain of cobalt-epileptic rat. Epilepsia (Amst.), 14: 409-414.
- Curtis, D.R., Hoslin, L.K. y G.A.R. Johnston (1968). A pharmacological study of the depression of the spinal neurons by glicine and related amino acids. Exp. Brain. Res., 6: 1-18.
- Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R. y H. Mc Lennan (1971). Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. Brain. Res., 33: 57-73.
- Curtis, D.R. y A.K. Tebécis (1972). Bicuculline and thalamic inhibition. Exp. Brain Res., 16: 210-218.
- Curtis, D.R. y G.A.R. Johnston (1974). Amino acids transmitters in mammalian nervous system. Ergebn. Physiol., 69: 97-188.
- Cutter, R.W.P. y D.S. Dudzinski (1974). Regional changes in amino acid content in developing rat brain. J. Neurochem., 23: 1005-1009.
- Chatagner, F. y P. Bergeret (1952). Désulfination et decarboxylation enzymatiques de l'acide L-cysteine-sulfonique: sa transformation quantitative an alanine et hipotaurine. Biochem. Biophys. Acta., 9: 141-147.
- Chovan, J.P., Kulakowski, E.C., Benson, B.W. y S.W. Schaffer (1979). Taurine enhancement of calcium binding to rat heart sarcolemma. Biochem. Biophys. Acta., 551: 129-136.
- Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: A stabilizer of macromolecules and biological membranes. Life Sci., 13: 1041-1049.
- De Bellerocche, J.J. y H. I. Brodford (1973). Amino acids in

- synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal. *J. Neurochem.*, 21: 441-451.
- Donaldson, J., St. Pierre, T., Minnich, J. y A. Barbeau (1971). Seizure in rat associated with divalent cation inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. *Can. J. Biochem.*, 49: 1217-1224.
- Dvergsten, C.L., Fosmire, G.J., Ollerich, D.A. y H.H. Sandstead (1983). Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. I. Impaired acquisition of granule cells. *Brain. Res.*, 271: 217-226.
- Gruener, R., y H.J. Bryant (1975). Excitability modulation by taurine. Action on axon membrane permeabilities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 194: 514-521.
- Haas, H.L. y L.K. Hosli (1973). The depression of brain stem neurons by taurine and its interactions with strychnine and bicuculline. *Brain Res.*, 52: 399-402.
- Halsted, J.A., Smith, J.C. y M.J. Irwin (1974). A conspectus of research on zinc requirement of man. *J. Nutr.*, 104: 345-351.
- Hayes, K.C., Carey, R.E. y S. Y. Schmidt (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science.*, 188: 949-951.
- Hayes, K.C., Ravin, A.R. y E.L. Bernson (1975). An ultrastructural study on nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats. *Am. J. Pathol.*, 78: 505-524.
- Hope, D.B. (1957). The persistence of taurine in the brains of pyridoxine-deficient rats. *J. Neurochem.*, 1: 364-369.
- Hruska, R., Huxtable, R. y H.I. Yamamura (1978). High affinity, temperature-sensitive and sodium dependent transport of taurine in rat brain. En: *Taurine and neurological disorders*. Barbeau, A. y R. Huxtable (eds.). Raven Press, New York., 109-117.
- Hsu, J.M. y W.L. Anthony (1970). Zinc deficiency and urinary excretion of taurine  $^{35}\text{S}$  and inorganic sulfate  $^{35}\text{S}$  following cystine  $^{35}\text{S}$  injection in rats. *J. Nutr.*, 100: 1189-1196.
- Huxtable, R.J., Laird, H.E. y S.E. Lippincotti (1979). The transport of taurine in the heart and the rapid depletion of tissue taurine content by guanidinoethyl sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 211-465.
- Huxtable, R.J. y L.A. Sebring. Cardiovascular actions of taurine (1983). En: *Sulfur Amino Acids Biochemical and Clinical Aspects*. Kuriyama, K., Huxtable, R.J. y H. Iwata (eds.). Alan R. Liss, INC, New York. pp. 5-38.
- Izumi, K., Donaldson, J., Minnich, J.L. y A. Barbeau (1973).

- Quabain-induced seizures in rats. Suppressive effects of taurine and GABA. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 51: 885-889.
- Izumi, K., Igisu, H. y T. Fukuda (1974). Suppression of seizures by taurine-specific or non-specific?. *Brain Res.*, 76: 171-173.
- Izumi, K., Igisu, H. y T. Fukuda (1975). Effects of edetate in seizure suppressing actions of taurine and GABA. *Brain Res.* 88: 576-579.
- Jacobsen, J.G. y L.L.H. Smith (1968). Biochemistry and Physiology of taurine and taurine derivates. *Physiol. Rev.*, 48: 424-511.
- Kocsis, J.J., Kostos, V.J. y S.I. Baskin (1976). Taurine levels in the heart tissues of various species. En: *Taurine*. Huxtable, R. y A. Barbeau (eds.). Raven Press, New York. 145-153.
- Kontro, P., Marnela, K.M. y S.S. Oja (1980). Free amino acids in the synaptosome and synaptic vesicle fractions of different bovine brain areas. *Brain Res.*, 184: 129-141.
- Kuriyama, K., Muramatsu, M., Nakagawa, K. y K. Kakita (1978). Modulatory role of taurine on release of neurotransmitters and calcium transport in excitable tissues. En: *Taurine in Neurological Disorders*. Barbeau, A. y R. Huxtable (eds.). Raven Press, New York., 201-206.
- 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 response. *Neuropharmacology*, 11: 551-558.
- Lauré-Dupréé, A.E. y C.D. Bridges (1982). Changes in retinal morphology and vitamin A metabolism as a consequence of decreased zinc availability. *Retina*, 2: 294-302.
- Le Fauconnier, J.M., Urban, P.F. y P. Mandel (1978). Taurine transport into the brain in rat. *Biochimie.*, 60: 381-387.
- Lipton, J.M. y C.G. Tickner (1979). Central effect of taurine and its analogues on fever caused by intravenous leukocytic pyrogen in the rabbit. *J. Physiol. (London)*, 287: 535-543.
- López-Colomé, A.M. y H. Pasantes-Morales (1980). Taurine interactions with chick retinal membranes. *J. Neurochem.*, 34: 1047-1053.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mandel, P. y H. Pasantes-Morales (1978). Taurine in nervous system. En: *Reviews of neuroscience vol. 3*. Epherenpreis J. y I. Kopin (eds.). Raven Press, New York, 157-193.

- Martin, N.G. y H. Patrick (1961). The effect of taurine on the sulfate-<sup>35</sup>S retention by chicks. *Poultry Sci.*, 40: 267-268.
- McBride, W.J. y R.C.A. Frederickson (1978). Neurochemical and neurophysiological evidence for a role of taurine as an inhibitory neurotransmitter in the cerebellum of the rat. En: *Taurine and neurological disorders*. Barbeau, A. y R. Huxtable (eds.). Raven Press, New York., 415-428.
- McConell, D.G. (1975). Relationship of the light-induced proton uptake in bovine retinal outer segments fragments to triton induced membrane disruption and to volume changes. *J. Biol. Chem.*, 250: 1898-1906.
- Meela, L. y K. Wrobel-Kuhl (1978). Special characteristics of brain mitochondrial calcium accumulation. En: *Calcium transport and cell function*, vol. 307. Scarpa, A. y E. Carafol (eds.). Ann. N. Y. Acad. Sci., 242-245.
- Meyer-Shultz, F., Pote, A., Williams, G. y N. Virmaux (1973). Action progressive un detergent anionique sur de segments externes de la rétine de veau soumise ou non a stimulation prealable. *Cytobiologie.*, 7: 393-405.
- Mutani, R., Bergamini, L., Fariello, R., y H. Delsedime (1974). Effects of taurine on cortical acute epileptic foci. *Brain Res.* 70: 170-173.
- Pasantés-Morales, H., Bonaventure, N., Wioland, N. y P. Mandel (1973). Effect of intravitreal injections of taurine and GABA on chicken ERG. *Int. J. Neurosci.*, 5: 235-241.
- Pasantés-Morales, H., Kleithi, J., Urban, P.F. y P. Mandel (1974). The effect of electrical stimulation, light and aminoacids on the efflux of <sup>35</sup>S-*taurine* from the retina of the domestic fowl. *Exp. Brain Res.*, 19: 131-141.
- Pasantés-Morales, H., Ademe, R.M. y A.M. López-Colomé (1979). The effect of taurine on <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> transport by retinal subcellular fractions. *Brain Res.*, 172: 131-138.
- Pasantés-Morales, H. y A. Gamboa (1980). Effect of taurine on <sup>45</sup>Ca accumulation in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 34: 244-246.
- Pasantés-Morales, H. y A. Ordóñez (1982). Taurine activation of a bicarbonate-dependent, ATP-supported calcium uptake in frog rod outer segments. *Neurochemical Res.*, vol. 7, No. 3, pp. 317-326.
- Pasantés-Morales, H., Arzate, M.E. y C. Cruz (1982). The role of taurine in nervous tissue: its effects on ionic fluxes. En: *Taurine in Nutrition and Neurology*. Huxtable, R. y H. Pasantés-Morales (eds.). Plenum Press, New York., 273-292.

- Pasantes-Morales, H. y C. Cruz (1984). Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *Journal of Neuroscience Res.*, 11: 303-311.
- Pasantes-Morales, H., Wright, C.E. y G.E. Gaull (1984). Protective effect of taurine, zinc and tocopherol on retinal-induced damage in human lymphoblastoid cells. *American Institute of Nutrition.*, 2256-2261.
- Pasantes-Morales, H., López-Escalera, R. y J. Morán (1987). Taurine and zinc in nutrition and cellular development. En: *Malnutrition: Determinants and Consequences*. Allan, R. (ed.). 211-237.
- Rahamimoff, H. y E. Abramovitz (1978). Ca transport and ATPase of synaptosomal vesicles from rat brain. *FEBS Letters.*, 92: 163-167.
- Rink, T.J., Tsien, R.Y. y A.E. Warner (1980). *Nature.*, 283: 658-660.
- Salceda, R., López-Colomé, A.M. y H. Pasantes-Morales (1977). Light-stimulated release of <sup>35</sup>S-taurine from frog retinal rod outer segments. *Brain Res.*, 135: 186-191.
- Sandvig, K. y S. Olsnes (1982). *J. Biol. Chem.*, 257: 7495-7503.
- Scultze, M.J. (1866). *Zur anatomie und physiologie der retina.* *Arch. Mikrosk. Anat.*, 2: 175-181.
- Serhan, C., Anderson, P., Goodman, E., Dunham, P. y K.G. Weissmann (1981). *J. Biol. Chem.*, 256: 2736-2741.
- Sgaragli, G.P. y F. Paron (1973). Effects of neutral amino acids injected into cerebrospinal fluid space on glucose metabolism in the rat brain.
- Sieghart, W. y K. Heckl (1976). Potassium-evoked release of taurine from synaptosomal fractions of rat cerebral cortex. *Brain-Res.*, 116: 538-543.
- Silver, R.V., Cole, R.D. y W.Z. Cande (1980). *Cell.*, 19: 505-516.
- Spaeth, D.G. y D.L. Schneider (1976). Taurine metabolisms. Effects of diet and bile salt metabolism. En: *Taurine*. Huxtable, R. y A. Barbeau (eds.). Raven Press, New York, 35-44.
- Striano, S., Grosso, A., Perretti, A. y G.A. Buscaino (1974). Primi risultati sugli effetti della taurina nella epilessia umana. *Act. Neurol.*, 29: 537-542.
- Sturman, J.A. (1973). Taurine pool sizes in the rat: effects of

vitamin B<sub>6</sub> deficiency and high taurine diet. J. Nutr., 103: 1566-1580.

Sturman, J.A., Wen, G.Y., Wisnievski, H.K.M. y K.C. Hayes (1981). Histochemical localization of zinc in the feline tapetum. Histochemistry., 72:341-350.

Sumizu, K. (1962). Oxidation of hipotaurine in rat liver. Biochem. Biophys. Acta., 63: 210-212.

Takahashi, R. y Y. Nakane (1978). Clinical trial of taurine in epilepsy. En: Taurine and neurological disorders. Barbeau, A. y R. Huxtable (eds.). Raven Press, New York., 375-386.

Tiedeman, F. y L. Gmelin (1827). Einige neue Bestandtheile der Galle des Ochsen. Ann Physik. Chem., 9: 326-337.

Trump, B.F., Berezesky, I.K. y A.R. Osornio-Vargas (1981). En: Biology and Pathology. Bowen, I.D. y R.A. Lockshin (eds.). Chapman and Hall, New York., 209-242.

Tsukada, Y., Inoue, N., Donaldson, J. y A. Barbeau (1974). Supressive effects of various amino acids against ouabain-induced seizures in rats. Can. J. Neurol. Sci., 1: 214-221.

Van Gelder, N.M. (1972). Antagonism by taurine of cobalt induced epilepsy in cat and mouse. Brain Res., 47: 157-168.

Van Gelder, N.M., Sherwin, A.L. y T. Rasmussen (1972). Amino acid content of epileptogenic human brain: focal versus surrounding regions. Brain Res. 40: 385-393.

Varecka, L. y E. Carafoli (1982). J. Biol. Chem., 257: 7414-7421.

Vasington, F.D. y J.V. Morphy (1962). Ca<sup>++</sup> uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., 237: 2670-2677.