

17
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**PARTICIPACION DE LA TAURINA EN LA
REGULACION DEL VOLUMEN
DE LOS LINFOCITOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CLAUDIA PATRICIA DIAZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

INTRODUCCION

I.- Propiedades de la molécula	1
II.- Localización y distribución celular y subcelular	2
III.- Metabolismo:	
a) Síntesis y degradación	4
b) Transporte de taurina	7
c) Recambio y mantenimiento de las pozas tisulares de taurina	7
IV.- Consecuencias de la deficiencia en taurina	10
V.- Acciones fisiológicas y farmacológicas de la taurina	11
VI.- Taurina y regulación del volumen celular	16
VII.- Fundamentación del tema	18
VIII.- Planteamiento del problema	20
IX.- Objetivos:	
a) Objetivo general	21
b) Objetivos particulares	21
X.- Hipótesis	21

MATERIAL Y METODOS

I.- Reactivos y soluciones	22
II.- Preparación celular	23
III.- Liberación de Taurina- ³ H	24
IV.- Análisis de los aminoácidos	25

V.- Medida del volumen celular	26
R E S U L T A D O S	28
D I S C U S I O N	47
C O N C L U S I O N E S	61
B I B L I O G R A F I A	63

I N T R O D U C C I O N

I.- Propiedades de la molécula.

La taurina (ácido 2-aminoetano sulfónico) es un aminoácido azufrado que fué descrito y aislado de la bilis de toro en el año de 1827 (Tiedemann y Gmelin, 1827).

La taurina tiene un peso molecular de 125.1 daltones. Es un compuesto incoloro que presenta una cristalización de forma tetragonal (Ansell, 1959). Tiene una solubilidad de 10g/100ml en agua a 25°C. es insoluble en metanol y éter a 25°C (Huxtable, 1982). Los valores de pK para los grupos funcionales de la taurina son pKa=1.5 y pKb=8.74. A pH fisiológico la taurina se encuentra como un zwitterión (Jacobsen y Smith, 1968).

La taurina no forma parte de la estructura de macromoléculas, como proteínas o ácidos nucleicos y aunque se ha detectado la presencia de di o tripéptidos, como la γ -glutamil taurina en el cerebro de ratas y ratones (Marnela y cols., 1984), al parecer en todos los tejidos se encuentra en forma libre.

La taurina no participa en ninguna reacción metabólica conocida a excepción de su conjugación en el hígado con los ácidos biliares para formar el ácido taurocólico, por lo que fué considerada durante mucho tiempo como un compuesto inerte y se le supuso un producto final del metabolismo de los aminoácidos azufrados (Awampara, 1976).

II.- Localización y distribución.

A partir de su descubrimiento hasta la fecha, se ha descrito la presencia y distribución de la taurina en tejidos tanto de invertebrados como de vertebrados (Jacobsen y Smith, 1968). Dependiendo de la especie, de la etapa de desarrollo y del tipo de órgano, las concentraciones de este aminoácido varían. En general, los niveles más bajos de taurina (alrededor de 1mM) se localizan en el pulmón, las concentraciones entre 1 y 3 mM en el hígado y en el riñón y los niveles más elevados (arriba de 10 mM) en tejidos excitables como corazón, músculo liso y estriado, sistema nervioso, glándulas de secreción interna y retina, así como en plaquetas y en linfocitos (Jacobsen y Smith, 1968; Kuriyama y cols., 1983). En este último grupo de órganos y células, la taurina es uno de los constituyentes cuantitativamente más importantes de la poza de aminoácidos libres, representando entre un 40% y un 50% de el total. En algunos órganos como en el cerebro, durante el desarrollo la concentración de taurina disminuye gradualmente desde el nacimiento hasta la madurez del sistema, encontrándose que en el tejido nervioso fetal la concentración de taurina es 4 veces mayor que en el tejido nervioso adulto (Agrawal y cols., 1966 : a y b; Sturman y cols., 1980).

Distribución celular y subcelular.

Se sabe que la taurina se encuentra presente en células tales como los hepatocitos, las células β del páncreas, los fotorreceptores, las plaquetas y los linfocitos. En el sistema nervioso se localiza tanto en neuronas como en células gliales (Jacobsen y Smith, 1966; Fukuda y cols., 1982; Oja y Kontro, 1983; Pasantes-Morales, 1986). En estudios sobre la distribución subcelular de la taurina, se ha establecido que la mayor parte de la poza de este aminoácido se encuentra en forma soluble y que solo una fracción muy pequeña podría estar asociada a membranas (Agrawal y cols., 1971). No se ha detectado la presencia de taurina en organelos subcelulares tales como mitocondrias, ribosomas, etc., sin embargo en las vesículas sinápticas si se encuentran concentraciones altas de taurina, siendo allí el aminoácido más abundante (De Belleruche y Bradford, 1973; Kontro y cols., 1980).

Por otro lado la concentración de taurina en los vegetales es prácticamente nula (Lahdesmaki, 1986). En estudios recientes se ha encontrado la presencia de este aminoácido en semillas de leguminosas como el frijol, el haba y la lenteja y en semillas oleaginosas, aunque las concentraciones de taurina en estas semillas son muy bajas en comparación con las que se encuentran en los tejidos animales, siendo del orden de 10-40 nM (Pasantes-Morales y cols., 1988).

III.- Metabolismo.

a) Síntesis y degradación.

La síntesis de la taurina en la mayoría de los tejidos animales se realiza a partir de precursores endógenos por medio de reacciones enzimáticas. La biosíntesis de la taurina está directamente asociada al metabolismo de los aminoácidos azufrados. Se han propuesto varias rutas de síntesis que tienen como precursor a la cisteína, la cual a su vez, procede del aminoácido esencial metionina. Sin embargo, la vía principal en la mayoría de los tejidos de vertebrados es la que involucra la oxidación de la cisteína (Hayes y Sturman, 1981) para formar el ácido cisteín sulfínico, reacción catalizada por la cisteín dioxigenasa. El ácido cisteín sulfínico es descarboxilado por la acción de una enzima dependiente del fosfato de piridoxal, la cisteín sulfinato descarboxilasa (CSD), dando origen a la hipotaurina (Ácido 2-aminoetano sulfínico), la cual es oxidada para dar lugar a la taurina (figura A). El mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación de la hipotaurina es incierto y existen reportes en los que se sugieren que la reacción se lleva a cabo sin la participación de una enzima determinada, en tanto que otros indican la existencia de una oxidasa de la hipotaurina capaz de llevar a cabo la catálisis oxidativa (Sumizu, 1962). Alternativamente, el ácido cisteín sulfínico puede ser oxidado a ácido cistéico por una deshidrogenasa y posteriormente por una descarboxilación originar la taurina. La enzima limitante en esta

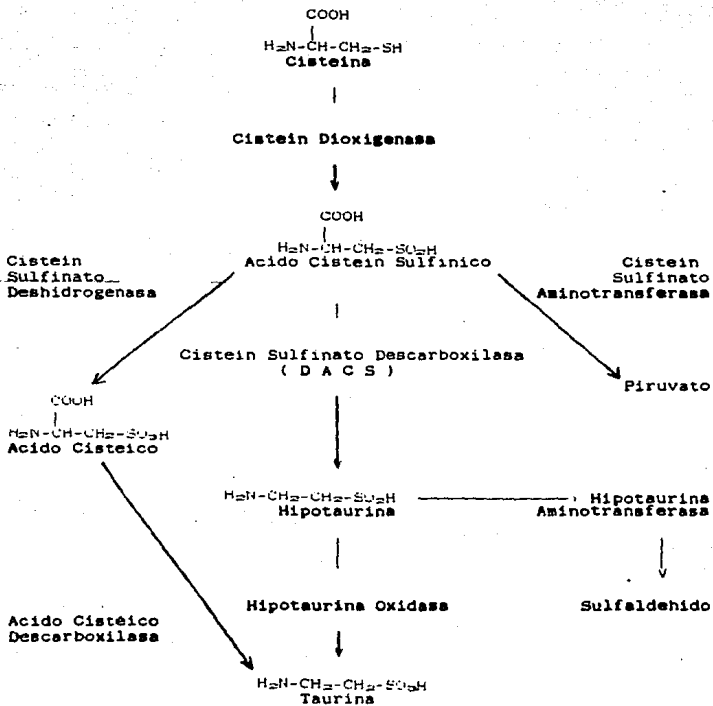


FIG A.- Metabolismo de la Taurina a partir de la Cisteina.

(Pasantes-Morales, 1986).

ruta metabólica parece ser la descarboxilasa del ácido cisteín sulfínico (CSD).

La capacidad de biosíntesis de la taurina difiere considerablemente de especie a especie ó de órgano a órgano en el mismo animal. El riñón y el hígado se consideran entre los órganos más activos en la síntesis de taurina. El cerebro tiene una actividad moderada mientras que el corazón, el músculo y los linfocitos tienen una capacidad muy limitada para sintetizar taurina (Hayes y Sturman, 1981). Parece factible que al menos una parte de la poza endógena de taurina en estos tejidos y células se origine a partir de aquella sintetizada en el hígado y que circule a través del plasma. La existencia de mecanismos de transporte muy activos que captan esta taurina del plasma hacia los tejidos con una baja capacidad de síntesis, es responsable de mantener sus niveles endógenos. La posibilidad de formar taurina a partir de precursores endógenos varía también entre las especies. Algunas como el ratón o la rata tienen una gran capacidad de síntesis del aminoácido, mientras que otros como el hombre y el gato poseen una capacidad muy baja para sintetizar taurina en todos sus órganos, debido a la muy escasa actividad de la cisteinsulfinato descarboxilasa (CSD) (Sturman y cols., 1980). En estos animales, las pozas endógenas de taurina se mantienen a través del aporte dado por la ingesta de los alimentos de los que la taurina forma parte.

En relación al catabolismo de la taurina, solo se han considerado como posibles productos de degradación al sulfato inorgánico y al ácido isetiónico (Jacobsen y Smith, 1962); sin

embargo, debido a la muy baja velocidad de conversión a estos productos, se les ha descartado como vías factibles de degradación de la taurina. De hecho, se ha considerado a la taurina como un producto prácticamente inerte desde el punto de vista metabólico.

b) Transporte de taurina.

El sistema de transporte de taurina es un proceso activo dependiente de sodio y de energía, sensible a temperatura y que en la mayor parte de los tejidos consta de dos componentes que difieren básicamente en sus características cinéticas (Lahdesmäki y Oja, 1973; Hruska y cols., 1978); uno es de alta afinidad (K_m de 3 a 100 μM) y baja capacidad y el otro de baja afinidad (K_m de 0.2 a 11 mM) pero con mayor capacidad (Oja y Kontro, 1978). El transporte de taurina es altamente específico y se inhibe únicamente por análogos estructurales estrechamente relacionados con el sustrato. Entre estos compuestos se ha descrito el guanidinoetanosulfonato (GES) y la β -alanina (Huxtable, 1980; Facantes-Morales y cols., 1983).

c) Recambio y mantenimiento de las pozas tisulares de taurina.

El recambio de las pozas tisulares de taurina, depende de las velocidades relativas de los procesos de acumulación, síntesis y eliminación del aminoácido, los cuales varían en los distintos

tejidos. Así, por ejemplo, el recambio de taurina es rápido en hígado, riñón y páncreas; moderado en pulmón, bazo, intestino y médulas ósea y lento en cerebro, corazón y músculo esquelético (Spaeth y Schneider, 1976).

Se ha tratado de evaluar la contribución relativa a las pozas tisulares de taurina tanto del aporte exógeno, ya sea el de la dieta o el de la taurina circulante en el plasma, como el de su síntesis in situ a partir de precursores endógenos (Lair y cols., 1980). La proporción del aporte de estas dos fuentes a las pozas de taurina varía en gran medida de especie a especie. Aún en un mismo animal, algunos tejidos tienen una gran capacidad de síntesis y probablemente proporcionen la taurina a aquellos que no la tienen. La relación entre estos diversos mecanismos parece que se encuentra en equilibrio ya que el animal es capaz de ajustar la velocidad de síntesis y excreción según la variabilidad en el aporte de la dieta (Huxtable y Lippincott, 1982). Se ha observado en estudios llevados a cabo con animales sometidos a una dieta carente de taurina, que los niveles de este aminoácido se mantienen constantes mediante una disminución en la cantidad de taurina excretada y a un aumento en su biosíntesis. Este equilibrio en el mantenimiento de las pozas tisulares de taurina ha dificultado la investigación orientada a establecer su papel fisiológico ya que, como se mencionó anteriormente, muchas especies privadas de taurina y/o de sus precursores en la dieta, para mantener las pozas tisulares del aminoácido responden con una estimulación en sus mecanismos de biosíntesis paralela con una disminución en la tasa de excreción,

sin que se detecten modificaciones importantes en los niveles basales del aminoácido (Hope, 1957; Sturman, 1973). De igual forma al aumentar los niveles de taurina por diversas vías de administración, se ha visto que solo se produce un aumento transitorio en la concentración de taurina circulante, la cual es restaurada rápidamente por un incremento en el proceso de excreción (Sturman, 1973). No obstante Hayes y colaboradores al realizar estudios nutricionales en el gato, encontraron las condiciones experimentales para la modificación de los niveles tisulares de taurina in vivo. La elección de esta especie fue una circunstancia afortunada ya que el gato, como se mencionó, posee una capacidad muy baja de síntesis de taurina y depende en gran parte del aporte exógeno a través de la dieta (carne) para cubrir sus requerimientos (Hayes y cols., 1975 a). Por otra parte el gato únicamente puede sintetizar ácido taurocólico y no glicocólico, con lo cual una porción muy importante de la taurina tisular y de aquella que se sintetiza se utiliza probablemente para este propósito. En otras especies, como los primates, incluyendo al hombre, una de las primeras respuestas adaptativas a la disminución en el aporte de taurina en la dieta es la biosíntesis del ácido glicocólico en lugar del taurocólico con lo cual no es necesario emplear para este fin la cantidad reducida de taurina que se obtiene por la síntesis (Jacobsen y Smith, 1968; Sturman y cols., 1986).

IV.- Consecuencias de la deficiencia en taurina.

Los estudios sobre las consecuencias de la deficiencia en taurina en tejidos como la retina y el cerebro, pusieron de manifiesto su caracter esencial. Teniendo como modelo experimental a los gatos deficientes en taurina se ha observado que cuando la concentración de este aminoácido disminuye por debajo de un 50% se observan lesiones en el fondo ocular y la desintegración estructural de los fotorreceptores (Hayes y cols., 1975). Los cambios en la morfología de estas células se manifiestan inicialmente en los segmentos externos, los cuales se ven vesiculados, desorientados y con sus membranas desintegradas (Wen y cols., 1979). Esta degeneración se extiende posteriormente a los segmentos internos y a la región nuclear de los fotorreceptores. Coincidentemente, los diversos componentes y la señal eléctrica de la retina, el electroretinograma, disminuyen en forma muy marcada hasta que la señal desaparece por completo. Si el tratamiento a base de la dieta deficiente en taurina es suspendido antes de un tiempo crítico, en un estadio en el cual la mayoría de los núcleos y los segmentos internos de los fotorreceptores se encuentran todavía presentes y se suplementa nuevamente la dieta con taurina, se produce la reversión total de los efectos degenerativos y funcionales; pero si el tratamiento de la deficiencia en taurina se continua más allá del periodo crítico se produce la muerte celular y sobreviene la ceguera (Hayes y cols., 1975 a y b; Schmidt y cols., 1976 y 1977).

También en el gato, en el curso de los procesos de maduración

del sistema nervioso, se ha observado que los animales nacidos de madres deficientes en taurina muestran una migración anormal de las células de la capa granular externa del cerebelo. Esto se expresa en el animal como problemas posturales caracterizados por una abducción anormal pronunciada de las extremidades posteriores que conduce incluso a deformaciones óseas (Sturman y cols., 1985). Un patrón similar de alteración en la migración de las neuronas se observa en monos lactantes alimentados con una fórmula comercial carente de taurina (Sturman y cols., 1985).

V.- Acciones fisiológicas y farmacológicas de la taurina.

A pesar de la amplia distribución y las altas concentraciones de taurina presentes en los tejidos animales, su papel fisiológico aún resulta incierto. Este aminoácido tiene un número de efectos fisiológicos y farmacológicos los cuales incluyen flujos iónicos e interacción con receptores (Pascantes-Morales y cols., 1982), disminución de la excitabilidad nerviosa, acciones antiarrítmicas y anticonvulsivas (Walty y Read, 1964; Van Gelder, 1978), modificaciones del metabolismo de la glucosa (Tokunaga y cols., 1983; Kulakowski y Maturó, 1984) y recientemente protección contra la peroxidación de los lípidos de la membrana (Pascantes-Morales y Fellman, 1988).

En el sistema nervioso central, se ha propuesto a la taurina como un posible neurotransmisor inhibitor. Administrada iontoforéticamente causa una depresión de la actividad eléctrica neuronal en prácticamente todas las regiones examinadas. La taurina produce una hiperpolarización del potencial de membrana

(Curtis y Watkins, 1960; Curtis y cols., 1968; Curtis y Tóbecis, 1972), debido muy posiblemente a un incremento en la conductancia a los iones cloro y potasio (Gruener y Bryant, 1975).

La taurina cumple con algunos de los requisitos necesarios para ser considerada como un neurotransmisor inhibitor. Estos requisitos incluyen: la presencia del compuesto en las terminaciones sinápticas (De Belleruche y Bradford, 1973; Lahdesmaki y cols., 1977; Kontro y cols., 1980), la existencia de un mecanismo específico y muy activo que termine su acción sináptica (Lahdesmaki y Oja, 1973; Hruska y cols., 1978), su liberación en respuesta a estimulación nerviosa y su acción postsináptica idéntica a la del neurotransmisor endógeno mediada a través de los mismos receptores y por los mismos mecanismos iónicos. Sin embargo, existen algunas objeciones en relación con la idea de considerar a la taurina como un neurotransmisor, que pueden resumirse en las siguientes observaciones: el efecto inhibitor de la taurina sobre la actividad neuronal es débil; su acción no ha podido considerarse como específica, ya que se ve antagonizada por estriquina en la médula espinal (Snyder, 1975) y en la corteza cerebral por la bicuculina (Enna y cols., 1975) sustancias que son conocidas como antagonistas específicos de la acción de la glicina y del GABA, respectivamente. Esto ha llevado a pensar que el efecto de la taurina esté mediado a través de una interacción con los receptores de la glicina y del GABA, cuya función como neurotransmisores en el tejido nervioso está bien documentada. Además la búsqueda de un receptor y de antagonistas específicos para las acciones sinápticas de la

taurina han dado resultados negativos (Lopez-Colomé y Pasantes-Moreles, 1980). Se conoce que la taurina se libera en diversas regiones del sistema nervioso bajo estimulación despolarizante (Collins y Jopiwala, 1974), pero a diferencia de otros neurotransmisores, la liberación del aminoácido no es claramente dependiente de la presencia de calcio extracelular (Clark y Collins, 1975), una condición que debe cumplirse para hacer válido este requisito de estimulación en respuesta a despolarización fisiológica.

Alternativamente se ha planteado la posibilidad de que la taurina tenga una acción como modulador de la transmisión sináptica. Este papel se sustenta en base a su presencia en las terminales nerviosas, a las características de su liberación y a su acción sobre la membrana postsináptica. Esta acción moduladora podría llevarse a cabo ya sea directamente a nivel postsináptico o bien a través de un efecto sobre la liberación de neurotransmisores. Se ha propuesto que esta acción de la taurina podría estar relacionada con su capacidad para modificar las concentraciones intraterminales de calcio, reguladas en parte por la retención de este ión en las mitocondrias (Kuriyama y cols., 1978).

Una serie de datos experimentales proponen también la posibilidad de que la taurina pueda actuar como un estabilizador membranar. Huxtable y Bressler (1973) demostraron que la taurina protege contra la alteración membranar inducida por la fosfolipasa C en membranas de retículo sarcoplásmico. Posteriormente Hayes y colaboradores (1975a y b) demostraron que la taurina es necesaria para el mantenimiento de la integridad

estructural de los fotorreceptores, en particular la de las membranas del segmento externo. Como se mencionó en párrafos anteriores utilizando gatos deficientes en taurina como modelo experimental, observaron que una disminución de los niveles del aminoácido en plasma y en retina se acompañaba paralelamente de una degeneración progresiva de los fotorreceptores y que al reducirse por debajo de un nivel crítico la concentración de taurina endógena, se presentaban profundas alteraciones morfológicas que conducían a la muerte celular y a la ceguera. La disminución de los niveles endógenos de la taurina por medio de la inhibición de su transporte, produce en la rata las mismas alteraciones observadas en los gatos deficientes en taurina (Pasantes-Morales y cols., 1983 y 1985). En experimentos in vitro, con segmentos externos aislados de los fotorreceptores, se ha observado que la taurina protege notablemente estos elementos celulares de la desorganización membranar causada por agentes tóxicos de naturaleza química o por efecto de excesiva iluminación (Pasantes-Morales y cols., 1981; Pasantes-Morales y Cruz, 1985).

Un gran número de efectos farmacológicos de la taurina han sido descritos, particularmente en el cerebro y en el sistema cardiovascular. En el sistema nervioso, el efecto farmacológico más conocido de la taurina es su acción anticonvulsiva. Van Gelder y colaboradores (1975) reportaron que los niveles de taurina en los focos epileptógenos de cerebro humano eran significativamente menores que en el tejido periférico. La aplicación de la taurina como anticonvulsivo sobre diferentes

modelos experimentales de epilepsia como las producidas por ouabaina (Izumi y cols., 1973), pentilmetetrazol y 4-aminopiridina entre otros, tuvo resultados favorables en diversas especies como en el gato, la rata, el ratón y el conejo (Izumi y cols., 1973; Van Gelder y cols., 1975; Mutani, 1976).

Asimismo se han llevado a cabo estudios acerca del efecto de la taurina en epilepsias en humanos; se ha demostrado que la taurina es capaz de disminuir en forma importante las crisis convulsivas de los pacientes tratados directamente con el aminoácido (Pasantes-Morales y cols., 1981). El problema en estas condiciones es que la taurina tiene dificultad para cruzar la barrera hematoencefálica, la cual en sujetos normales limita sustancialmente la captación de taurina por el encéfalo. Solo se observan efectos benéficos del tratamiento con taurina cuando, aunado al trastorno en la excitabilidad neuronal, existe una alteración en la barrera hematoencefálica. En los animales, en los que la administración de la taurina es intraventricular, no existe esta restricción y el efecto anticonvulsivo de la taurina es entonces claro. No se conoce de que manera la taurina produce su acción anticonvulsiva, pero debido a que su efecto protector se muestra en una gran variedad de estados convulsivos de muy diversa etiología, se sugiere que podría estar actuando como un agente modulador de la excitabilidad de membranas neuronales, a través de una serie de efectos ya reportados del aminoácido sobre el transporte de iones como potasio, cloro y calcio (Gruener y Bryant, 1975).

Asimismo, se encuentra bien documentada la participación de

la taurina en los procesos neurológicos responsables de la regulación de la temperatura, la producción del dolor y el control del hambre y la sed (Lipton y Tickner, 1979).

Los efectos farmacológicos de la taurina en el sistema cardiovascular incluyen acciones inotrópica positiva y antiaritmica en el corazón y reducción en la presión sanguínea en varios modelos de hipertensión en animales así como en pacientes hipertensos (Walty y Read, 1964; Huxtable, 1980; Azuma y cols., 1983). Los efectos benéficos de la taurina en el tratamiento de enfermedades del corazón se han sugerido por diversos autores, pero estos resultados aún son discutidos (Azuma y cols., 1983).

Recientemente se le ha descrito a la taurina un efecto similar al de la insulina, que consiste en una acción estimuladora sobre la regulación de los niveles de glucosa del plasma (Tokunaga y cols., 1983). Este efecto parece estar mediado a través de una interacción directa de la taurina con el sitio receptor para la insulina (Kulakowski y Maturó, 1984; Kulakowski y cols., 1985).

VI.- taurina y regulación del volumen celular.

En los invertebrados, la taurina parece estar involucrada en los procesos osmorreguladores, actuando en conjunto con otros aminoácidos como un efector osmótico. En general, los tejidos de invertebrados marinos contienen concentraciones de taurina más altas que los tejidos de organismos de agua dulce o terrestre (Gilles, 1979); tal es el caso de los moluscos en sus formas

marina, que contienen concentraciones de taurina tan elevadas como de 70mM/Kg de peso fresco a diferencia de los moluscos de agua dulce y terrestre en donde los niveles del aminoácido son muy bajos (Awampara, 1962).

Diversos estudios han demostrado la presencia de taurina, en concentraciones elevadas, en el tejido cardiaco de vertebrados. En los ventrículos de tres especies de teleosteos, la taurina es el aminoácido más abundante y constituye alrededor del 50% de los aminoácidos intracelulares. Todos los demás aminoácidos identificados están presentes en muy bajas concentraciones (Vislie y Fugelli, 1975; Vislie, 1982). Algunas de estas especies toleran grandes variaciones en la salinidad del agua y viven tanto en agua de mar como en agua dulce. Durante la adaptación de agua de mar a agua dulce, el contenido de taurina del músculo cardiaco disminuye significativamente (Vislie y Fugelli, 1975) y ocurre el fenómeno contrario durante su adaptación de agua dulce a agua de mar (Vislie, 1983). Durante el proceso de regulación hiposmótica los niveles de taurina endógena disminuyen debido a su salida de las células por el cambio osmótico (Vislie, 1983). El volumen celular de las células ventriculares cardiacas de los peces eurihalinos se regula por los flujos del potasio, del sodio y del cloro además de la participación de los aminoácidos intracelulares, especialmente de la taurina (Vislie, 1983).

Existen evidencias recientes de que la taurina puede tener una función osmorreguladora también en mamíferos. En ratones con hipernatremia crónica, el contenido de taurina se incrementa en el corazón y en el cerebro (Thurston y cols., 1981).

Una evidencia más directa de la participación de la taurina

Como efector osmótico se obtuvo en estudios realizados en astrocitos en los que la concentración de taurina es muy elevada (Lehman y Hansson, 1987; Wals y Allen, 1987). Estas células del sistema nervioso central incrementan su volumen en condiciones patológicas incluyendo : hipoglicemia, isquemia, estados epilépticos, traumas cerebrales y encefalopatía hepática (Kimmelberg y cols., 1982). Los astrocitos en cultivo regulan su volumen en respuesta a condiciones anisomóticas. Experimentalmente, en condiciones hiposmóticas se observa un incremento masivo en la salida de taurina con un curso temporal correspondiente al de la fase regulatoria del volumen (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988). Estos resultados indican un papel de la taurina como osmoefector en astrocitos y sumado a las evidencias del cambio en los niveles tisulares del aminoácido en el animal íntegro sugieren que la función osmorreguladora de la taurina no solo se aplica a los invertebrados y a los vertebrados inferiores sino probablemente también a los vertebrados en general.

VII.- Fundamentación del tema.

Como anteriormente se mencionó, la taurina es un aminoácido que se encuentra presente en concentraciones muy elevadas, en una gran variedad de tejidos particularmente en el músculo (liso, estriado y cardiaco), en el cerebro, en las glándulas endócrinas y exócrinas, en la retina y en células como las plaquetas y los linfocitos (Jacobsen y Smith, 1968; Kuriyama y cols., 1983). La

función de la taurina en estos tejidos aún se desconoce.

En invertebrados y vertebrados eurhalinos la taurina participa como regulador osmótico (Vislie, 1983). Se ha comenzado a explorar la posibilidad de una función similar en aquellos tejidos de los mamíferos en donde la taurina, por su concentración elevada, podría actuar como un soluto osmóticamente activo.

En años recientes se empezó a estudiar la participación de la taurina en la Retinosis Pigmentaria, que es un grupo de enfermedades de la retina las cuales se caracterizan por presentar una degeneración progresiva de los fotorreceptores que conduce a una disminución de la función visual y en casos avanzados a la ceguera total (Heckenlively, 1988). Parece ser que la taurina participa en el mantenimiento de la estructura y función de los fotorreceptores ya que, en gatos con deficiencia de taurina, estas células pierden la elevada organización estructural que los caracteriza y los segmentos externos se observan hinchados y vacuolizados (Schmidt y cols., 1977). El mecanismo por el cual la taurina ejerce su acción protectora se desconoce; existe la posibilidad de que actúe como un regulador osmótico por lo que su deficiencia daría como resultado el hinchamiento de los fotorreceptores conducente a su destrucción.

Con el fin de examinar esta posibilidad se investigará, dentro de un proyecto general, la participación de la taurina y de otros aminoácidos libres en el proceso de regulación del volumen en los linfocitos. La selección de este modelo celular se hizo en base a dos características de los linfocitos: primero, la presencia de

taurina en concentraciones muy elevadas y segundo, la capacidad que tienen estas células de llevar a cabo ajustes en su volumen en forma fisiológica. Los resultados que se obtengan en esta investigación podran ser aplicados a otros sistemas celulares como la retina y los astrocitos en el sistema nervioso, en los cuales la aparición de edema celular asociado a estados patológicos como la epilepsia, la encefalopatía hepática y los traumatismos craneanos, es un problema clínico importante.

VIII.- Planteamiento del problema.

El linfocito tiene la capacidad de regular su volumen celular en respuesta a cambios osmóticos. Particularmente, si los linfocitos se exponen a soluciones hiposmóticas, su volumen celular se incrementa en forma rápida y luego lo recuperan durante una fase regulatoria mas lenta, a pesar de la persistencia de las condiciones hiposmóticas (Grinstein, 1982). El proceso de ajuste de volumen se consigue a través del movimiento de solutos osmóticamente activos como el potasio y el cloro, acompañados de la salida de agua. Existe la posibilidad de que, además de los iones mencionados, los aminoácidos libres intracelulares principalmente la taurina por encontrarse en mayor concentración, participen en el proceso de regulación del volumen.

IX.- Objetivos.

a) Objetivo general.

Investigar la participación de la taurina en la regulación del volumen de los linfocitos.

b) Objetivos particulares.

Demostrar que la liberación de taurina ocurre en respuesta al estímulo hiposmótico o a alguna otra condición que produzca un incremento en el volumen celular.

Investigar cual es la señal que desencadena la salida de taurina en respuesta a cambios en el volumen celular.

Investigar el mecanismo por el cual la taurina se libera de las células.

X.- Hipótesis.

La hipótesis de trabajo considera la posibilidad de que la taurina funcione como un soluto osmóticamente activo en las células capaces de regular su volumen en los mamíferos y que a través de este mecanismo, participe en el ajuste del volumen celular. Este estudio en particular se llevó a cabo en linfocitos.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

I.- Reactivos y soluciones.

- * Ficoll-Paque. Obtenido de: Pharmacia Fina Chemicals AB.
- * Histopaque-1077[®]. Obtenido de: Sigma Diagnostics.
- * Azul de Tripán. Obtenido de: Grand Island Biochemicals, N.Y.
- * Quabaina, quinidina, quinina, clorpromazina, iodoacetamida, colchicina, Laurina. Obtenidos de: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.
- * Pimozida. Obtenida de: McNeil Laboratories, Montreal.
- * EDTA. p-nitrofenol. Obtenidos de: Baker S.A. de C.V. Kalostoc, México.
- * A 23187. Obtenido de Calbiochem-Behring Co. San Diego, CA.
- * Floretina. Obtenido de: K y K Laboratories.

Isótopos

- * Taurina³H. Obtenida de: New England Nuclear, Research Products. Boston, MA.
- * 3-O-metil(¹⁴C)-D-glucosa. Obtenida de: New England Nuclear, Research Products. Boston, MA.

Soluciones

- * Medio Krebs-Bicarbonato (Medio Isosmótico), contiene: NaCl 118mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; KCl 4.7 mM; CaCl₂ 2.5 mM; MgSO₄ 1.17 mM;

Glucosa 10 mM; NaHCO_3 25 mM .

Para la preparación de los medios Hipoosmóticos únicamente se modifica la concentración de NaCl del Medio Krebs-Bicarbonato.

Cuando se indique sustituir sodio o cloro, se utilizara cloruro de colina o gluconato de sodio o de potasio, respectivamente.

* Líquido de Centelleo. Contiene: Triton x 100 257ml/L; etilenglicol 37 ml/L; alcohol etílico absoluto 106 ml/L; 2,5-difeniloxazol (PPO) 3 g/L y xileno 600 ml/L .

11.- Preparación celular.

Los linfocitos se aislaron de sangre de conejo obtenida por punción cardíaca. La separación de las células se llevó a cabo mediante un gradiente de densidad (Histopaque). El procedimiento de separación de las células se llevó a cabo con veinte mililitros de sangre fresca, a la cual se trató con cuatro mililitros de EDTA al 10%. La sangre con el anticoagulante se diluyó 1:1 con medio Krebs-Bicarbonato (volumen final de 15 ml). Esta mezcla se colocó sobre 9 ml. de Histopaque y se centrifugó a 400xg durante 30 minutos a 20°C. Los linfocitos se colectaron de la interfase que se forma entre el plasma y el Histopaque y se diluyeron con 12 ml de medio Krebs-Bicarbonato. La suspensión se centrifugó a 100xg durante 10 minutos a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 12 ml. de medio Krebs-Bicarbonato. La suspensión se centrifugó a 100xg durante 10 minutos a 20°C y se repitió la operación para lavar a los

linfocitos. El paquete de células se resuspendió en 720 μ l de medio Krebs-Bicarbonato.

III.- Liberación de taurina- 3 H.

Las células se incubaron en presencia de taurina- 3 H, utilizado como marcador de las pozas endógenas.

Una alícuota de 650 μ l de la suspensión de linfocitos se incubó con taurina- 3 H (2 μ Ci, 5 μ M concentración final) a 37°C durante 1 hora. Al término de la incubación se tomaron alícuotas de 150 μ l y se filtraron a través de filtros millipore (0.65 μ M 0). Los filtros con las células retenidas se transfirieron a cámaras de vidrio (0.25 μ l de volumen) y se superfundieron, con el medio Krebs-Bicarbonato completo o con las modificaciones indicadas en cada experimento, a una velocidad de 1 ml/min. Después de 8 minutos de lavado se colectaron las fracciones cada minuto durante 8 minutos. En ese momento, el medio de superfusión se reemplazó por un medio con osmolaridad reducida en la proporción señalada para cada experimento y con las modificaciones pertinentes y se continuó la colecta de fracciones durante 12 minutos más. La radiactividad en las muestras así como la que permanece en las células se midió por espectrometría de centelleo utilizando 4 ml de Tritosol (líquido de centelleo).

IV.- Análisis de los aminoácidos.

Los aminoácidos se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa.

En esta técnica la derivatización de los aminoácidos se lleva a cabo con o-phtalaldialdehído (OPA). En presencia de un agente reductor, como el 2-mercaptoetanol, el OPA reacciona con las aminas primarias en medio alcalino dando lugar a la formación de isoindoles, que contienen un grupo tioalkilo altamente fluorescente (Simons y Johnson, 1976).

Preparación de la muestra.- Mediante una extracción alcohólica se obtienen los aminoácidos. A las muestras (células retenidas en los filtros) se les adicionó 1 ml. de alcohol etílico al 70 % y se agitó durante 2 minutos. El extracto alcohólico se filtró a través de filtros millipore (0.65 μ m) y así preparada la muestra se llevó a analizar en el cromatógrafo.

Las soluciones patrón de los aminoácidos libres se prepararon en alcohol etílico al 70 % a una concentración de 60 nM/ 10 μ l y de ahí se efectuaron las diluciones necesarias para obtener una solución conteniendo 1 a 6 nM/ 10 μ l.

Para la cromatografía se utilizó una columna ultrasphere (Beckman) de 25 cm x 4.6 mm. La fase móvil utilizada fue metanol/acetato de potasio 0.1M y pH de 5.5 (25% / 75%) que se invierte a 75% / 25% en 14 minutos. La taurina se eluye aproximadamente a los 11 minutos.

El reactivo con el cual se forman los derivados de los aminoácidos se preparó disolviendo 10 mg de OPA en 500 μ l de

etanol absoluto. A esta solución se le agregó 500 μ l de 2-mercaptoetanol, diluyendo a 10 ml con ácido bórico 0.4 M (pH 10.4).

Un volumen de 10 μ l de muestra se mezcló con 10 μ l del reactivo de derivación. Después de tres minutos, que es el tiempo necesario para obtener un derivado estable, la solución se inyectó a la columna. Los productos son registrados al salir de la columna en un detector de fluorescencia, a una longitud de excitación de 340 nm y de emisión de 418 nm.

V.- Medida del volumen celular.

Para la medida de los cambios en el volumen celular se utilizó la técnica de Kletzien y colaboradores. Esta técnica emplea la 3-O-metil-D-glucosa, una hexosa no metabolizable, en conjunto con la floretina, un inhibidor del transporte del azúcar. El volumen celular se determina conociendo la cantidad de 3-O-metil(14 C)-D-glucosa incorporada por las células suponiendo que la concentración intracelular es igual a la extracelular al impedir el eflujo del carbohidrato con floretina.

De una muestra de la suspensión de linfocitos se tomaron dos alícuotas de 300 μ l c/u y se suspendieron en 300 μ l de medio isosmótico y en 300 μ l de medio hiposmótico (159 mOsm). Estos medios contenían 5 μ l de 3-O-metil(14 C)-D-glucosa (0.1 μ Ci/ml). Se incubaron las muestras a 37°C durante 2 y 5 minutos. A estos tiempos se tomaron alícuotas de 100 μ l, se filtraron y los

filtros se lavaron con una solución a 4°C conteniendo fionetina 1 mM. La radiactividad se midió por espectrometría de centelleo adicionando a cada muestra 4 ml de Tritesol (líquido de centelleo).

RESULTADOS

Efecto de la reducción de la osmolaridad sobre la liberación de taurina-³H de los linfocitos.

Los linfocitos de conejo expuestos a un medio con osmolaridad reducida, responden con un rápido hinchamiento. Inicialmente las células tenían un volumen celular de 0.7648 ul / mg de proteína en un medio isosmótico y mostraron un incremento máximo del 66 % (1.27 ul / mg de proteína) al ser expuestas a una solución hiposmótica 50% del valor isosmolar.

Con la disminución en la osmolaridad del medio se observó un efecto marcado sobre la salida de taurina-³H acumulada por los linfocitos durante el periodo de incubación. Una disminución de la osmolaridad en el medio de superfusión de 318 a 159 mOsmoles estimuló la salida de taurina; la liberación fraccional de taurina-³H se incremento de 1.7 % (+_ 0.05) por minuto en condiciones isosmóticas a 6 % (+_ 0.3) y 8.5 % (+_ 0.7) por minuto, después de 1 y 2 minutos respectivamente de exposición a las condiciones hiposmóticas (Figura 1). El máximo de liberación fue observado entre el primer y segundo minutos después de la exposición al medio hiposmótico (159 mOsm); durante los siguientes minutos, la liberación de taurina-³H fue disminuyendo gradualmente a pesar de la persistencia del medio llegando a valores de la tasa de liberación cercanos a los observados inicialmente (2.2 % +_ 0.1).

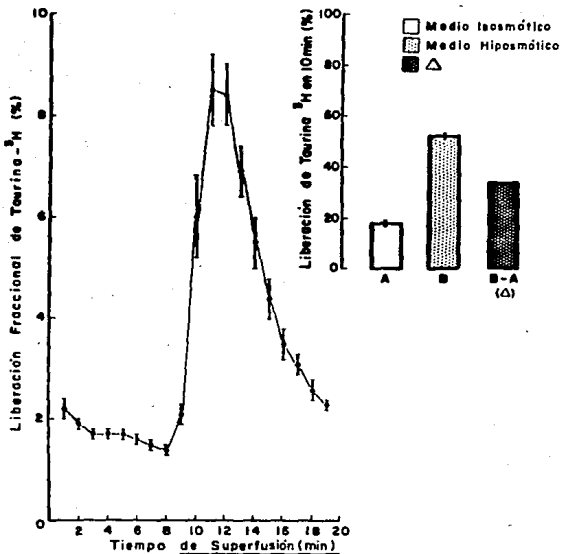


Figura 1.- Efecto de las condiciones hiposmóticas sobre la liberación de Taurina-³H en linfocitos de conejo. Las células fueron preincubadas con taurina-³H (2 μ Ci, 5 μ M) y superfundidas con medio Krebs-Bicarbonato (1 ml/min) a 37°C. Después de 8 minutos de superfusión (lavado) las muestras fueron colectadas cada minuto. Durante el tiempo indicado por la barra, el medio de superfusión fue reemplazado por un medio con osmolaridad reducida (159 mOsm, 38.5 mM NaCl). Al final de la superfusión, la radioactividad en las muestras y la que permanece en las células fue determinada por espectrometría de centelleo. Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional que corresponde a la radioactividad en cada fracción como porcentaje del total de radioactividad acumulado por las células, es decir, el total de radioactividad liberado más lo que permanece en las células. La gráfica representa la liberación de taurina-³H en 10 experimentos. Las barras corresponden a la liberación (X) durante 10 minutos antes de la estimulación (barra blanca, A) y durante 10 minutos de exposición al medio hiposmótico (barra con puntos, B). La liberación neta (Δ) de taurina-³H está representada con una barra cuadriculada. Los valores incluidos en la gráfica representan el promedio \pm el error estándar de 50 experimentos.

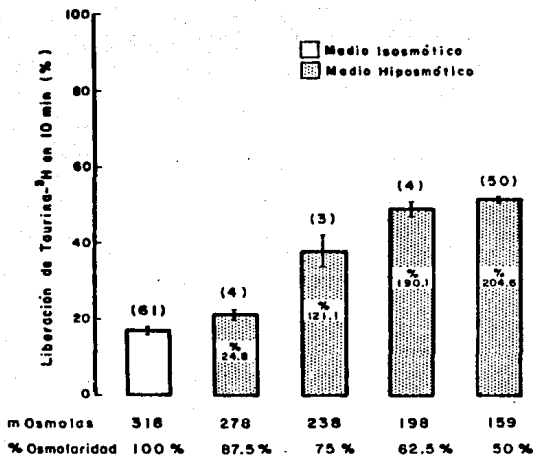


Figura 2.- Efecto de soluciones con distinta osmolaridad sobre la liberación de taurina-³H en linfocitos de conejo. Las condiciones experimentales para la preincubación y la superfusión son las descritas en la figura 1. Las células fueron superfundidas con medios de osmolaridad reducida: 278, 238 y 198 mOsmolías. Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1) en un periodo de 10 minutos. Los valores trazados graficamente representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

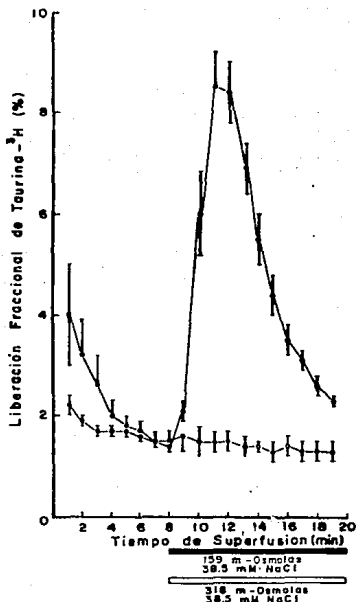


Figura 3.- Efecto de la osmolaridad y de la concentración de NaCl sobre la liberación de Taurina- ^3H en los linfocitos de conejo. Las condiciones experimentales para la preincubación y la superfusión son las descritas en la figura 1. Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1). Las células fueron superfundidas con un medio isosmótico (318 mOsm) y al tiempo indicado por las barras la perfusión continuó con un medio hiposmótico al 50% del valor isosmolar (barra oscura) o con un medio con una concentración de NaCl reducida a la misma concentración del medio hiposmótico, pero llevando la osmolaridad a 318 mOsmol con cloruro de colina (barra blanca). La liberación fraccional de Taurina- ^3H estimulada con un medio de osmolaridad reducida (159 mOsm) está representada con círculos oscuros (●). El efecto del medio isosmótico, pero con concentración de NaCl disminuida sobre la liberación de Taurina- ^3H está representada con círculos vacíos (○). Los resultados son el promedio de 10 experimentos para la liberación bajo condiciones hiposmóticas y de 6 experimentos bajo condiciones de sodio reducido y están representados como el promedio \pm el error estándar.

El análisis de los aminoácidos libres presentes en los linfocitos, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permitió identificar a los aminoácidos más abundantes que son la glicina y la taurina. La concentración de taurina en los linfocitos fué de 6.69 nM/mg de proteína y la concentración de glicina fué de 0.81 nM/mg de proteína. Bajo las condiciones del análisis la suma de estos dos aminoácidos representan cerca del 90% del contenido total de la poza de aminoácidos libres. Por otra parte, la concentración de taurina fué de 3.4 nM/mg de prot. en los linfocitos incubados 15 minutos a 25 °C en medio isosmótico y de 2 nM/mg prot. en el sobrenadante. La concentración de taurina fué de 0.61 nM/mg prot. en los linfocitos incubados 15 minutos a 25°C en medio hiposmótico (159 mOsm) y de 4.28 nM/mg prot. en el sobrenadante (Figura 4).

Efecto de los iones sodio, cloro y calcio sobre la liberación de taurina-³H sensible al volumen.

La omisión del sodio en el medio de superfusión remplazándolo por colina no alteró la liberación de taurina-³H sensible a volumen. Se obtuvo una liberación basal de 16% (+_ 1.75) para el control y del 19.7 % (+_ 2) con un medio sin sodio. La liberación estimulada fué del 52.6 % (+_ 5) para el control y del 50.4 % (+_ 4) en ausencia de sodio. La liberación neta de taurina-³H fué de 36.4 % (+_ 6) para el control y utilizando un medio sin sodio de 36.7 % (+_ 5), (Figura 5).

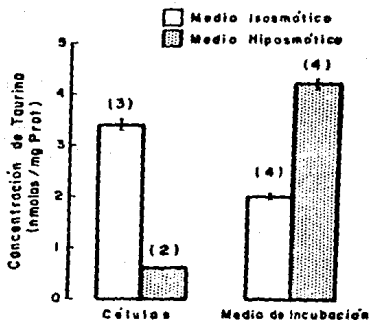


Figura 4.- Cuantificación de la taurina endógena de los linfocitos de conejo incubados en medio isosmótico y medio hiposmótico. Las células fueron incubadas en medio isosmótico y en medio hiposmótico (50% del valor isosmolar) durante 15 minutos a 25°C. La extracción de los aminoácidos se realizó con Etanol al 70%. La concentración de taurina fue determinada por cromatografía de líquidos como se describe en los métodos. Los resultados se expresan como nm/mg de proteína. Las barras de la izquierda corresponden a la concentración de taurina presente en los linfocitos incubados en medio isosmótico (barra blanca) y a la concentración de taurina presente en los linfocitos incubados en medio hiposmótico (50% del valor isosmolar), barra sombreada. Las barras de la derecha corresponden a la concentración de taurina presente en los medios de incubación respectivos. Los valores incluidos en la gráfica representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

Para examinar el efecto del ion cloruro sobre la liberación de taurina sensible a volumen, la preparación de linfocitos se estimuló con un medio hiposmótico (159 mOsm) que carecía de cloruro de sodio y cloruro de potasio; ambos compuestos se sustituyeron por las sales correspondientes de gluconatos. En estas condiciones, la liberación basal de taurina-³H fué del 19.49 % (+_ 2) para el control y del 16.7 % (+_ 1.5) cuando se utilizó un medio sin cloro. Los valores de estimulación fueron del 44.76 % (+_ 4) para el control y del 52 % (+_2) para un medio sin cloro. Los valores de liberación neta de taurina-³H fueron del 25.27 % (+_ 5) para el control y del 35.3 % (+_ 2.5) utilizando un medio sin cloro, (p < 0.1), figura 5.

Cuando se omitió el calcio del medio de superfusión, se obtuvo una liberación basal del 17.92 % (+_ 1) para el control y del 19.14 % (+_ 2) utilizando un medio sin calcio. Los valores de estimulación fueron del 52.10 % (+_ 0.74) para el control y del 57.69 % (+_ 1.4) para un medio sin calcio. La liberación neta fué del 34.18 % (+_ 2.5) para el control y del 38.55 % (+_ 2.8) cuando se utilizó un medio sin calcio, (p < 0.1), figura 5.

Efecto de la quinidina y de la pimozida sobre la liberación de taurina-³H.

Con el objeto de examinar si los flujos de potasio activados por el incremento en el volumen celular constituyen una señal para la liberación de la taurina sensible a volumen, se expusieron los linfocitos a la acción de la quinidina y de la pimozida.

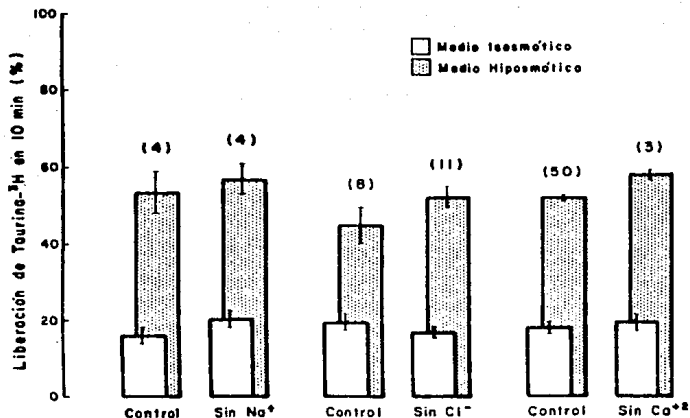


Figura 5.- Efecto de los iones sodio, cloro y calcio sobre la liberación de taurina-³H. Las condiciones experimentales para la preincubación y la superfusión son las descritas en la figura 1. Las barras blancas representan la liberación espontánea, que corresponde a la tasa de liberación fraccional (Fig.1) liberada 8 minutos antes de la estimulación. Las barras sombreadas representan la liberación de taurina-³H estimulada por el medio hipotónico (159 mOsm) tomando las fracciones que abarcan el pico máximo de liberación y las fracciones antes y después del pico máximo necesarias para obtener el resultado de 10 minutos de estimulación. Para la condición de un medio libre de sodio el NaCl y el NaHCO₃ fueron reemplazados por cloruro de colina y KHCO₃ respectivamente. Para un medio sin cloro el NaCl y el KCl se reemplazaron por los gluconatos respectivos. Para un medio libre de calcio, el CaCl₂ se eliminó del medio de superfusión y se le adicionó EGTA 20mM. Los valores trazados gráficamente representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos utilizando pimozida 0.3 μ M y quinidina 75 μ M. La liberación basal fué del 17.3 % (\pm 2) para el control, del 15.3 % (\pm 0.7) utilizando pimozida y del 15.3 % (\pm 1.8) utilizando quinidina. La liberación neta fué del 29.5 % (\pm 4) para el control, del 34.6 % (\pm 5) con pimozida ($p < 0.5$) y del 29.6 % (\pm 4) con quinidina ($p < 0.5$).

Efecto del incremento del calcio intracelular sobre la liberación de taurina- 3 H.

En los linfocitos, un aumento en los niveles intracelulares de calcio desencadenaría la corriente saliente de potasio a pesar, de no ser necesario un ajuste en el volumen celular. Con el objeto de discriminar entre el cambio en el volumen celular y la salida de potasio, como señales para la liberación de taurina sensible al volumen, se incrementó la concentración intracelular de calcio exponiendo a las células a la acción del ionóforo de calcio A23187.

En la figura 7 se presentan los resultados obtenidos. La liberación de taurina- 3 H estimulada con un medio isosmótico conteniendo al ionóforo fué del 15.8 % (\pm 0.6), semejante al de su propia liberación basal y a la liberación basal del control teniendo valores del 16.9 % (\pm 0.8) y del 17.92 (\pm 1) respectivamente.

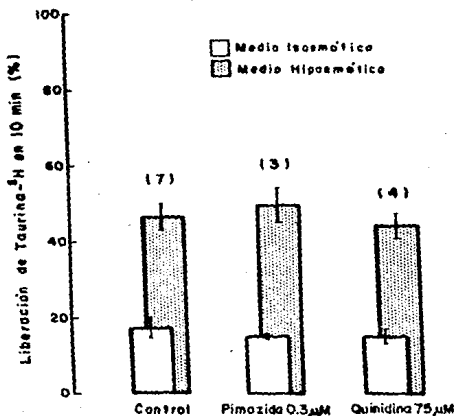


Figura 6.- Efecto de la Pimozida y de la Quinidina sobre la liberación de taurina-³H en los linfocitos de conejo. Las condiciones experimentales para la preincubación y la superfusión son las descritas en la figura 1. La pimozida (0.3 μM) y la quinidina (75 μM) estuvieron presentes tanto en el medio isosmótico como en el medio hiposmótico (50% del valor isosmótico). Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1) en un periodo de 10 minutos (Fig.5). Las barras blancas representan la liberación espontánea y las barras sombreadas la liberación estimulada por el medio hiposmótico. Los valores trazados gráficamente representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

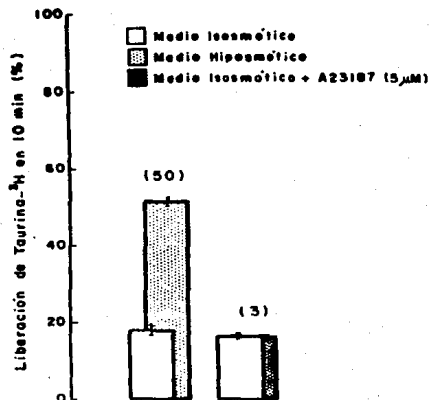


Figura 7.- Efecto del ionóforo de calcio A23187 sobre la liberación de taurina-³H en los linfocitos de conejo. Las condiciones experimentales para la preincubación y la superfusión son las descritas en la figura 1. Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1) en un periodo de 10 minutos (Fig.5). La liberación espontánea de taurina-³H está representada con la barra blanca y la liberación estimulada por medio hiposmótico (50% del valor isosmolar) con la barra con puntos. La liberación de taurina-³H estimulada con el medio isosmótico conteniendo A23187 5μM se representa con una barra cuadriculada. Los valores trazados gráficamente representan el promedio ± el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

Participación del citoesqueleto.

Con el objeto de investigar el papel del citoesqueleto en la liberación de taurina sensible a volumen, se produjo la despolimerización de los microtúbulos exponiendo los linfocitos a la acción de la Colchicina. La figura 8 muestra el efecto de la colchicina (0.5 mM) sobre la liberación de taurina-³H en respuesta al medio hiposmótico (159 mOsm). Los experimentos se llevaron a cabo agregando la colchicina 15 minutos antes de finalizar el periodo de captura (Figura 8 A). En otros experimentos la colchicina estuvo presente además durante todo el periodo de superfusión (Figura 8 B).

En la figura 8 A se presentan los resultados obtenidos. La liberación basal fué del 16 % (+_ 1.4) para el control y del 21.5 % (+_ 1.8) utilizando colchicina, ($p < 0.05$). La liberación estimulada fué del 58.7 % (+_ 3) para el control y del 54.7 % (+_3) utilizando colchicina. La liberación neta de taurina-³H fué del 42.7 % (+_ 2.6) para el control y del 33.2 % (+_ 4) utilizando colchicina. ($p < 0.1$). Cuando la colchicina se adicionó al medio de incubación y a los medios de superfusión, se obtuvieron los siguientes resultados. La liberación basal fué del 16 % (+_ 1.4) para el control y del 22.4 % (+_ 0.4) utilizando colchicina. Este aumento del 40 % fué estadísticamente significativo ($p < 0.01$). La liberación neta de taurina fué del 42.7 % (+_ 2.6) para el control y del 24.7% (+_ 1.6) utilizando colchicina. Esta disminución del 42.15 % fué estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

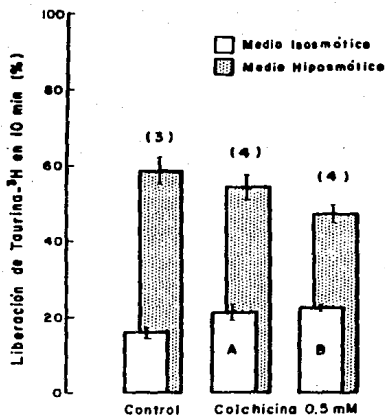


Figura 8.- Efecto de la Colchicina sobre la liberación de taurina- ^3H en los linfocitos de conejo. A: 15 minutos antes de finalizar la incubación con el aminoácido radiactivo se adicionó la colchicina 0.5mM, después las células se superfundieron con los medios isosmótico e hiposmótico (50% del valor isosmolar) sin colchicina. B: la colchicina estuvo presente tanto en la incubación, como se indica para la gráfica A, como durante todas las etapas de la superfusión. Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1) en un periodo de 10 minutos (Fig.5). Las barras blancas representan la liberación espontánea y las barras sombreadas la liberación estimulada con medio hiposmótico (50% del valor isosmolar). Los valores trazados gráficamente representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicado en el paréntesis.

Participación de un homointercambiador como posible mecanismo de liberación de taurina.

Con el objeto de examinar si la liberación de taurina es por medio de un homointercambiador se activó el transportador de taurina incrementando la concentración de taurina extracelular. Solamente se realizaron dos experimentos en los cuales se observó que la liberación basal fué del 20.1% y la liberación estimulada del 17.2% del total de taurina acumulada en 10 minutos. Estos resultados son el promedio de los dos experimentos.

Efecto del agotamiento de los niveles de ATP celular sobre la liberación de taurina-³H.

Con el objeto de evaluar si la liberación de taurina sensible a volumen se realiza por un mecanismo dependiente de energía celular, los linfocitos se expusieron a la acción de la Iodoacetamida (1 mM) y la Antimicina A (1 ug/ml), inhibidores del metabolismo energético.

El resultado de dos experimentos indicaron que la liberación basal fué del 16.1% para los controles y del 30.5% utilizando los inhibidores metabólicos. La liberación estimulada fué del 60.6% para los controles y del 48.5% utilizando los inhibidores. La liberación neta de taurina-³H fué del 44.5% para los controles y del 18% utilizando estas sustancias.

Efecto de la modificación del gradiente de sodio sobre la liberación de taurina-³H .

La liberación de taurina sensible a volumen podría efectuarse a través de la acción de un acarreador que transportara la taurina del interior de la célula hacia el exterior, el cual podría ser el mismo o uno distinto del que acumula activamente la taurina al interior de la célula. Teniendo en cuenta que el transporte de taurina es un proceso activo dependiente de sodio, se diseñaron experimentos con el objeto de evaluar si el mecanismo de liberación de taurina en medios hiposmóticos es afectada por la modificación del gradiente de sodio. Para ello se expusieron las células al inhibidor de la bomba de Na^+/K^+ , ouabaina, en un medio sin sodio para invertir el gradiente de concentración.

En la figura 9 se representa el efecto de estas condiciones, en un experimento realizado de la siguiente manera: se utilizó un medio isosmótico con ouabaina 1 mM durante el periodo de liberación basal y se estimuló la liberación de taurina-³H con un medio hiposmótico (159 mOsm) conteniendo también ouabaina 1 mM pero en ausencia de sodio, sustituyendolo por cloruro de colina. Los valores de liberación basal de taurina-³H obtenidos fueron del 23.2 % (\pm 3) para el control y del 23 % (\pm 1.8) con ouabaina. La liberación estimulada fué del 40.3 % (\pm 2) para el control y del 44.4 % (\pm 1.9) utilizando ouabaina. La liberación neta de taurina-³H fué del 17 % (\pm 3) para el control y del 21.3 % (\pm 2.4) con ouabaina. ($p < 0.1$).

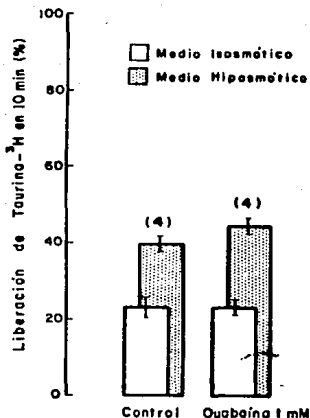


Figura 9.- Efecto de la Ouabaina y la inversión del gradiente de sodio sobre la liberación de taurina-³H en linfocitos de conejo. Las células se superfundieron con un medio isosmótico conteniendo ouabaina 1 mM (liberación basal) y NaCl en concentraciones normales. Al término del periodo de liberación basal, el medio se substituyó por una solución hiposmótica, conteniendo la misma concentración de ouabaina y en la que el NaCl se substituyó por cloruro de colina (liberación estimulada). Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1) en un periodo de 10 minutos (Fig.5). Los valores trazados gráficamente representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

Efecto de la taurina exógena sobre la liberación de taurina- ^3H .

La salida de taurina sensible a volumen puede ocurrir a través de un mecanismo activo o por difusión en favor de un gradiente de concentración. Para discriminar entre estas posibilidades se examinó el efecto de un incremento en la concentración extracelular de taurina sobre la liberación de taurina- ^3H en respuesta a la disminución en la osmolaridad, a valores superiores a los presentes en la célula.

En la figura 10 se presentan los resultados obtenidos experimentalmente. Al estimular con un medio hiposmótico (159 mOsm) en presencia de taurina 30 mM, la liberación basal fue del 14.57 % (± 2) para el control y del 19.34 % (± 1.2) en presencia de taurina exógena, ($p < 0.1$). La liberación neta de taurina- ^3H fue del 36.62 % (± 3.5) para el control y del 37.81 % (± 4) en presencia de taurina, ($p < 0.5$).

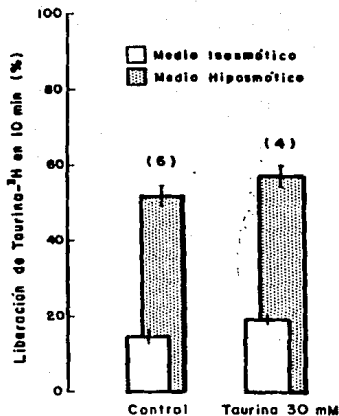


Figura 10.- Efecto de la taurina exógena sobre la liberación de Taurina-³H en linfocitos de conejo. Las condiciones experimentales para la preincubación y la superfusión son las descritas en la figura 1. Las células se superfundieron con medios isosmótico e hiposmótico (50% del valor isosmolar) conteniendo Taurina 30 mM. Los resultados están expresados como la tasa de liberación fraccional (Fig.1) en un periodo de 10 minutos (Fig.5). Los valores trazados gráficamente representan el promedio \pm el error estándar del número de experimentos indicados en el paréntesis.

D I S C U S I O N

La ausencia de una pared rígida que proteja a las células animales de los cambios en su medio ambiente hace que la capacidad para regular el volumen celular sea una propiedad fundamental para su existencia, debido a que, por circunstancias fisiológicas o patológicas, las células pueden sufrir cambios de distinta magnitud en el volumen celular, que en casos extremos podría causar la lisis celular.

Las células animales regulan su volumen cuando son expuestas a medios anisomóticos, aumentando o disminuyendo la cantidad de agua intracelular. El cambio inicial en el volumen es seguido por el movimiento de solutos, acompañados de agua, en una dirección que permita retornar a la célula hacia su volumen normal. Existen algunos factores que permiten la estabilidad en el volumen celular de las células animales. Uno de ellos es la permeabilidad de la membrana para el agua, lo que permite alcanzar un equilibrio osmótico al cruzar libremente la membrana. Otro factor que permite la regulación del volumen celular es la existencia de mecanismos de transporte de cationes y aniones, permitiendo su paso a ambos lados de la membrana hasta obtener un equilibrio. Finalmente, la electroneutralidad que debe mantenerse a ambos lados de la membrana y las diferencias en la presión hidrostática (Hoffman, 1987), son también factores involucrados en la capacidad de regulación del volumen celular.

En un medio hiposmótico, las células de invertebrados y vertebrados se hinchan inicialmente y subsecuentemente reducen su

volumen hasta un nuevo estado estacionario; este volumen es ligeramente mayor pero muy cercano al que inicialmente tenía la célula en un medio isosmótico (Grinstein y cols., 1982b; Grinstein y cols., 1984). La duración del proceso de regulación del volumen celular varía considerablemente en los diversos tejidos, siendo de varias horas en el caso del cerebro (Pollock y Arieff, 1980) y de los eritrocitos de peces eurihalinos (Poznansky y Solomon, 1972) y de pocos minutos en linfoblastos de ratón (Roti-Roti y Rothstein, 1973) y en células tumorales ascíticas de Ehrlich (Hendil y Hoffman, 1974). Entre las células que responden rápidamente se encuentran también los linfocitos humanos, en los que la reducción en el volumen se completa en aproximadamente 5 minutos (Ben-Sasson y cols., 1975) y el volumen final alcanzado es muy cercano al que tenían inicialmente. Esto hace de los linfocitos un sistema muy conveniente para el estudio de los fenómenos de regulación del volumen.

En el presente trabajo se realizó el análisis del comportamiento de los aminoácidos presentes en los linfocitos de conejo. Se observó en este estudio que la taurina es el aminoácido que se encuentra en mayor concentración, siendo alrededor del 89% de la poza total de aminoácidos libres de la célula. Desde hace algún tiempo, se había detectado la presencia de la taurina en la sangre. Stein y Moore en 1954 reportaron que el contenido de taurina en células sanguíneas es mayor que en el plasma. Estudios subsiguientes mostraron que tanto las plaquetas como los leucocitos son ricos en taurina encontrándose que la concentración en plaquetas humanas está entre 16 y 24 $\mu\text{M/g}$ y en

leucocitos humanos entre 20 y 35 $\mu\text{M/g}$. En comparación, el nivel de taurina en los eritrocitos es de solo 50 a 70 nM/g (Jacobsen y Smith, 1963). La concentración de taurina para las células polimorfonucleares representa el 70 % del total de aminoácidos y para los linfocitos (células mononucleares) esta proporción es del 45 % del total de aminoácidos (Fukuda y cols., 1982). Los resultados del presente estudio en linfocitos de conejo, señalan una concentración de taurina de 6.7 nM/mg de proteína que constituye, como se mencionó, la mayor parte de la poza de aminoácidos libres. Estos niveles tan elevados resultan en cierto modo sorprendentes para un compuesto que no muestra ninguna actividad metabólica ni participa en reacciones químicas celulares. Sin embargo, precisamente estas características, la inercia metabólica y la concentración extremadamente alta, lo convertirían en un osmoefector ideal para participar en la regulación del volumen celular que tan eficientemente realizan los linfocitos de manera fisiológica.

En los invertebrados y vertebrados la taurina parece estar involucrada en procesos osmorreguladores actuando en conjunto con otros aminoácidos como un efector osmótico (pag.16).

En eritrocitos del pez *Flatichthys flesus*, el transporte de taurina está asociado con una regulación del volumen celular en medios anisosmóticos. Una disminución en la osmolaridad activa los mecanismos de liberación de taurina (Fugelli y Steinar, 1986). En células tumorales escíticas de Ehrlich, existen cambios importantes en las concentraciones de taurina cuando se exponen a medios hiposmóticos. En este sistema se observa que la concentración de taurina endógena disminuye mientras que los

niveles en el medio de incubación aumentan después del cambio en la osmolaridad, siendo este incremento equivalente a la pérdida de taurina de la poza endógena de aminoácidos (Hoffman, 1987). En los astrocitos, células del sistema nervioso central que también regulan su volumen en respuesta a cambios osmóticos, se ha observado que en condiciones hiposmóticas se presenta un incremento en la salida de taurina con un curso temporal correspondiente al de la fase regulatoria de disminución del volumen sugiriendo un posible papel de la taurina como efector osmótico (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988). Los linfocitos humanos, cuando son expuestos a soluciones hiposmóticas, presentan una etapa inicial de hinchamiento, seguida por una fase de disminución de la regulación del volumen (Grinstein y cols., 1982b; Grinstein y cols., 1984).

Los resultados obtenidos indican que los linfocitos de conejo sufren un aumento de volumen celular (66 %) cuando se exponen a medios hiposmóticos respondiendo de igual forma que los linfocitos humanos ante tal situación.

Como se observa en la figura 1 la salida de taurina por cambios en la osmolaridad es muy rápida y masiva. La cantidad de taurina que contienen las células disminuye notablemente después de la exposición al medio hiposmótico observándose esto tanto en el caso de la concentración endógena del aminoácido como usando taurina-³H. La taurina endógena que se libera en respuesta al choque hiposmótico (159 mOsm.) aparece íntegramente en el medio de incubación, fig 4. Asimismo, es evidente que la liberación de taurina es sensible a cambios en la osmolaridad debido a que, a

medida que se reduce ésta, se incrementa la salida de taurina (fig. 2). Estos resultados sugieren que en los linfocitos, al igual que en las células tumorales ascíticas de Ehrlich y en los astrocitos, la taurina participa en los mecanismos de regulación del volumen probablemente actuando como un osmoefector.

¿Cuál es la señal que desencadena la liberación de taurina?

Se sabe que diversos mecanismos de transporte de iones se activan durante el proceso de regulación del volumen en respuesta a condiciones hiposmóticas. Los principales movimientos iónicos celulares son: 1) Un intercambio electroneutro de K^+ y H^+ acoplado al cambio electroneutro de aniones Cl^-/HCO_3^- dando lugar a la pérdida de cloruro de potasio sin cambio en el pH intracelular. 2) Un sistema de cotransporte electroneutro K^+Cl^- y 3) El flujo conductivo de K^+ acoplado funcionalmente a un flujo conductivo de Cl^- (Hoffman, 1987).

En el linfocito humano (Grinstein y cols., 1982a y b; Grinstein y cols., 1984c; Sarkadi y cols., 1984a, 1985) y en las células tumorales ascíticas de Ehrlich (Hoffman, 1987) este último mecanismo es el que se activa durante la disminución regulatoria del volumen. La pérdida neta de cloruro de potasio es debida primariamente a un incremento en la permeabilidad de la membrana al potasio y depende de un gradiente electroquímico de K^+ dirigido hacia el exterior de la célula (Grinstein y cols., 1982b). El cloruro aparentemente sigue en forma pasiva a los flujos de potasio. Diversas evidencias apuntan hacia la

participación de los canales de potasio activados por calcio como los responsables de este cambio en la permeabilidad membranial. Se ha descrito que los flujos de potasio inducidos por calcio en eritrocitos (Armendo-Hardy y cols., 1975), en células tumorales ascíticas de Ehrlich (Hoffman, 1987), en células de riñón, MDCK (Roy y Sauvé, 1987) y en linfocitos (Grinstein y cols., 1982b) son inhibidos por la presencia extracelular de quinina o quinidina. Estas sustancias también bloquean la pérdida de cloruro de potasio inducida por hinchamiento celular o por el ionóforo de calcio A23187 (Grinstein y cols., 1984). Como consecuencia de estos efectos la quinina o la quinidina bloquean también parcialmente la disminución regulatoria del volumen. Asimismo se ha observado en células tumorales ascíticas de Ehrlich (Hoffman, 1987) y en linfocitos (Grinstein y cols., 1982b; Grinstein y cols., 1984) que los cambios en los flujos iónicos y en el volumen son inhibidos por una variedad de sustancias pertenecientes al grupo de las fenotiazinas como la trifluoperazina, la pimozida y la clorpromazina (Weiss y Levin, 1978), actuando a nivel del sistema Ca^{2+} -Calmodulina. Estas sustancias se enlazan al sitio hidrofóbico de la proteína unida al calcio manteniendo así al catión secuestrado y en consecuencia disminuyendo su concentración como ión activo en el espacio intracelular. Esto da como resultado la disminución de la permeabilidad de la membrana al potasio, inhibiendo de esta forma la regulación del volumen (Grinstein y cols., 1982a). Las sustancias anti-calmodulina bloquean los canales de transporte de potasio y de cloro inducidos tanto por el A23187 o como por los

cambios en el volumen.

Los canales sensibles a volumen también pueden ser activados en las células en un medio isosmótico. La adición del ionóforo de calcio A23187 a una suspensión de células tumorales ascíticas de Ehrlich induce una pérdida neta de KCl asociada con un encogimiento celular indicando lo que también en linfocitos se ha observado; es decir, que el incremento en los niveles citoplásmicos de calcio conduce a un incremento sustancial y específico en la permeabilidad de la membrana al potasio (Lew y Ferreira, 1978; Brinstein y cols., 1982b; Hoffman, 1987). Los cambios producidos por el incremento en los niveles de calcio celular por la acción del A23187 son similares a los inducidos por el choque hiposmótico solo que, en este caso, el calcio penetra al compartimento citoplásmico ya sea del medio extracelular o es liberado de los sitios de almacenamiento intracelulares durante el hinchamiento. Se supone por lo tanto que los cambios en el nivel citoplásmico de calcio también están involucrados en los flujos de potasio inducidos por volumen.

Tomando en cuenta estos antecedentes, podría considerarse la posibilidad de que los movimientos iónicos asociados al mecanismo de regulación del volumen constituyeran la señal primaria para inducir la salida de taurina. Los resultados del presente trabajo indicaron sin embargo que al bloquear la salida de potasio utilizando quinidina y pirozida, la liberación de taurina no disminuyó. Tampoco se observó un incremento en la liberación de taurina que podría esperarse si existiera un retraso en el proceso de regulación del volumen celular causado por la inhibición de la salida de potasio. La ausencia de modificaciones

en el comportamiento de la taurina sugieren que la liberación de este aminoácido tiene un curso temporal definido y termina en forma un tanto independiente del volumen celular. Por otra parte estas observaciones y los resultados obtenidos al simular los eventos bioquímicos que ocurren cuando se produce un choque hiposmótico utilizando el ionóforo de calcio A23187, en los que no se observó un incremento en la salida del aminoácido, sugieren que la liberación de taurina y la activación de la conductancia al potasio son fenómenos independientes.

En conjunto, a partir de estos resultados se sugiere que: 1) la expansión inicial de la membrana producido por el choque hiposmótico es necesaria para desencadenar la salida de taurina pero un hinchamiento sostenido no tiene ningún efecto sobre la liberación de este aminoácido, 2) los movimientos de potasio inducidos durante la disminución regulatoria del volumen y por el ionóforo A23187 no constituyen la señal de liberación de taurina y 3) un incremento en la concentración de calcio celular utilizando el ionóforo A23187 no es una señal para producir la liberación de taurina sugiriendo que el mecanismo de liberación de taurina no es dependiente de la concentración de calcio intracelular.

En otros sistemas celulares se ha examinado la dependencia iónica sobre la liberación de taurina estimulada por otros factores tales como la despolarización de la membrana y el efecto de compuestos neuroactivos. En la retina, la liberación de taurina estimulada por concentraciones despolarizantes de potasio es dependiente de sodio, parcialmente dependiente de calcio y muy

dependiente de cloro (Pasantés-Morales y cols., 1988). En corteza cerebral, la liberación de taurina estimulada por concentraciones elevadas de potasio o por estimulación eléctrica es claramente dependiente de calcio (Bernardi, 1985) y en células de glioma la liberación espontánea de taurina es dependiente de sodio (Schrier y Thompson, 1974).

Al estudiar en este trabajo la dependencia iónica sobre la liberación de taurina sensible al volumen en linfocitos, se encontró que la ausencia de sodio, cloro y calcio del medio de perfusión no modifica la liberación de taurina. Se ha descrito en linfocitos humanos que la omisión de los iones sodio, potasio, calcio o cloro del medio externo no afectan la disminución regulatoria del volumen (Grinstein y cols., 1984).

En trabajos recientes se señala que el citoesqueleto puede jugar un papel importante en el control del volumen celular. VanRossum y Russo (1981) reportaron, en rebanadas de hígado de rata, que la recuperación del volumen después del hinchamiento inducido por frío fue inhibida por el tratamiento con citocalacina, una sustancia que desorganiza los microfilamentos. Con base en estas observaciones se propone que la presencia de una red de microfilamentos intacta es necesaria para eliminar el exceso de agua y de solutos ganados durante la fase de hinchamiento. Mills y Skiest (1985) también analizaron el papel del citoesqueleto en la regulación del volumen celular utilizando células del riñón. Ellos proponen que el estado de organización de la F-actina, resulta afectado por cambios en los niveles de AMPc y tiene un efecto directo sobre la actividad, estabilidad o presencia de los elementos de la membrana que

Juegan un papel en el proceso de control del volumen. Foskett y Spring (1983,1984) en estudios realizados en células de vesícula biliar concluyeron que se requieren los microfilamentos intactos para el proceso de regulación del volumen. Estas observaciones sugieren una participación de los microfilamentos en los mecanismos del control del volumen. En relación con la participación de los microtúbulos en la regulación del volumen, las observaciones de distintos grupos indican que parece variar en las diversas preparaciones utilizadas. Así, mientras que Foskett y Spring señalan que los microtúbulos no son importantes en la disminución regulatoria del volumen, los resultados de Nelmed y colaboradores (1981) indican un papel de los microtúbulos en la conservación del volumen en los macrófagos J774.1. En estas células se observó una reducción de un 20% en el volumen después de la exposición a colchicina, una sustancia que causa la despolimerización de los microtúbulos. Esta observación fue correlacionado con una pérdida efectiva de microtúbulos determinada por inmunofluorescencia. Asimismo, en fibroblastos se ha determinado que puede inducirse un cambio en la forma celular por exposición a la colchicina (Goldman y cols., 1973).

Al evaluar si la despolimerización de los microtúbulos tiene efectos sobre la liberación de taurina, se observó que la presencia de colchicina durante el periodo final de la incubación y a través de las distintas etapas de la superfusión inhibe claramente la salida de taurina sensible al volumen. Una exposición más corta, sólo durante la incubación, no tiene efecto en la salida de taurina. Estos resultados sugieren que para

producir daño en los microtúbulos se necesita un mayor tiempo de exposición a la colchicina. Es posible que al dañar esta estructura, la forma de la célula se vea afectada de modo que produzca señales o cambios en la organización membranaral que determinen que la taurina se libere sin que se estimule su salida por cambios en el volumen; esta posibilidad se sugiere por las observaciones de un incremento en la liberación basal de taurina en estas condiciones. En un estudio realizado en la retina, se observó que la colchicina causa una marcada disminución en la liberación de taurina-³H estimulada por distintos agentes. Los autores sugieren que la liberación de taurina pueda estar relacionada a un proceso que involucre proteínas contráctiles (Pasantes-Morales y cols., 1980).

c. ¿Cuál es el mecanismo mediante el cual la taurina se libera de la célula ?

En los eritrocitos del pez Platichthys flesus la participación de la taurina en el control del volumen se efectúa a través de los sistemas de transporte del aminoácido localizados en la membrana y que son similares a los descritos en otros sistemas, es decir: un sistema dependiente de sodio el cual probablemente acumula la taurina celular contra un gradiente de concentración y un sistema pasivo independiente de sodio cuya actividad es estimulada notablemente por una reducción en la osmolaridad; este sistema independiente de sodio interviene en el eflujo neto de taurina durante la distracción regulatoria del volumen

(Fugelli y Steinar, 1985).

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de liberación de taurina en respuesta a un choque hiposmótico se examinaron en este trabajo algunas posibilidades que incluyen la participación del transportador funcionando de adentro de la célula hacia afuera, o bien la activación de flujos pasivos. A partir de los resultados se puede deducir que: 1) La salida de taurina no se efectúa a través de un homointercambio ya que, al activar el carter portador incrementando la concentración de taurina extracelular (30 mM) no se modifica la liberación de taurina-³H. Asimismo no existe un heterointercambio debido a que al inhibir el transportador utilizando B-alanina (30 mM) no se estimula la liberación de taurina-³H. En otras preparaciones, como en retinas de conejo, la salida de taurina se ve ligeramente acelerada por un homointercambio con taurina extracelular (Onno y cols., 1973). En la retina también se ha observado un heterointercambio con GABA, glutamato, aspartato y B-alanina (Sazentes-Morales y cols., 1974). La liberación de taurina en sinaptosomas no se modifica sensiblemente por homointercambio o por heterointercambio con GABA (Oja y Kontro, 1983). 2) la liberación de taurina sensible al volumen no parece llevarse a cabo mediante un acarreador que transporte este aminoácido del interior de la célula al exterior dependiendo de un gradiente de sodio. En células tumorales ascíticas de Ehrlich se demostró que una reducción en la concentración de Na⁺ celular no tiene efecto sobre la liberación de taurina. Estas observaciones junto con las que indican que la preincubación de

Las células con taurina no radiactiva no afectan la captura de taurina excluyen una relación funcional entre el sistema de captura saturable dependiente de sodio y el sistema de liberación. Además, al igual que lo reportado en el presente trabajo, el sistema de transporte responsable de la salida de taurina parece no ser un sistema de intercambio debido a que al incrementar la concentración de taurina extracelular de 0 a 1 mM no se afecta la salida de taurina. El autor concluye que el sistema de salida es un simple mecanismo de fuga independiente de el sistema de captura saturable (Lambert, 1984), 3) la liberación de taurina sensible al volumen no es por difusión en favor de un gradiente de concentración. En este trabajo se sugirió la posibilidad de que la liberación de taurina sensible al volumen se realizara a través de canales abiertos por la expansión de la membrana. Para examinar esta posibilidad se invirtió el gradiente de taurina de forma que las concentraciones extracelulares de este aminoácido fueran mayores que las intracelulares. En estas condiciones al inducir el choque hiposmótico la liberación de taurina-³H se vería limitada por la obstrucción del gradiente. Al no modificarse la liberación de taurina se llegó a la conclusión de que la posibilidad apuntada anteriormente no tiene lugar.

Con los experimentos efectuados en este estudio no se pudo concluir si la liberación de taurina es un mecanismo dependiente de energía, ya que, al inhibir el metabolismo energético celular de los linfocitos con iodoacetamida y antimicina-A se observó una liberación masiva, sin necesidad de producir el choque hiposmótico. Estas observaciones sugieren entonces que el mantenimiento de la poza intracelular de taurina es un proceso

dependiente de energía y que en presencia de los inhibidores metabólicos la célula no es capaz de retener el aminoácido y lo libera espontáneamente gastando la poza sensible al volumen. En este sentido en astrocitos en cultivo se ha observado que la respuesta de modificación del volumen celular ante un medio hiposmótico involucra un movimiento neto de solutos osmóticamente activos por un mecanismo dependiente de energía celular y estrechamente acoplado al sistema de la bomba de Na^+/K^+ (Olson y cols., 1986).

CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas en el presente trabajo sobre la participación de la taurina en el proceso de regulación del volumen en linfocitos de conejo conducen a las siguientes conclusiones:

1) La taurina es el aminoácido que se encuentra en mayor concentración en los linfocitos de conejo, constituyendo alrededor del 89% de la poza total de aminoácidos libres.

2) La liberación de taurina es un proceso sensible a cambios en el volumen celular inducido por la disminución en la osmolaridad. La salida de taurina estimulada por cambios en la osmolaridad es muy rápida y masiva.

3) La señal que desencadena la liberación de taurina sensible al volumen está dada por una expansión inicial de la membrana y tiene un curso temporal definido.

4) La activación de la conductancia al potasio y el incremento en la concentración de calcio intracelular que acompaña al aumento en el volumen celular no constituyen una señal para desencadenar la liberación de taurina.

5) El mecanismo por el cual se libera la taurina en respuesta a cambios en el volumen celular no se afecta por la eliminación o sustitución de iones tales como Na^+ , Cl^- o Ca^{+2} en el espacio extracelular.

6) El proceso de liberación de taurina no se realiza a través de un sistema de homointercambio ni por difusión en favor de un gradiente de concentración. El eflujo de taurina no se lleva a cabo tampoco a través del transportador que normalmente conduce al aminoácido del exterior de la célula al interior.

7) La liberación de taurina es sensible a alteraciones producidas en la estructura del citoesqueleto.

8) El mantenimiento de la poza intracelular de taurina es un proceso dependiente de energía.

Los resultados del presente trabajo se consideran como evidencias de que la taurina participa en la regulación del volumen celular de los linfocitos como un efector osmótico, aún cuando no fué posible identificar el mecanismo por el cual tiene lugar la liberación de taurina en respuestas a cambios en el volumen celular. Este problema y otras preguntas que surgieron como resultado de este trabajo seguirán siendo exploradas en futuras investigaciones.

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

- Agrawal, H.C., Davis, S.M. y Hinwlich, W.A. (1966a): Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain. J. Neurochem. 13: 607-615.
- Agrawal, H.C., Davis, J.N. y Hinwlich, W.A. (1966b): Postnatal changes in free amino acid pool of rabbit brain. Brain Res. 3: 374-380.
- Agrawal, H.C., Davison, A.N. y Kozzarek, J.K. (1971): Subcellular distribution of taurine and cysteine sulfinate decarboxylase in developing rat brain. Biochem. J. 122: 755-760.
- Ansell, S.B. (1959): Amino acids, peptides and related nitrogenous compounds. En: Late for Biochemical Research (R.M. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott y E.M. Jones, eds.) pp.2-18. Oxford: Clarendon.
- Armando-Hardy, M., Ellory, C.J., Ferraire, H.S., Fleminger, S. y Lew, V.L. (1975): Inhibition of the calcium-induced increase in the potassium permeability of human red blood cell by quinine. J. Physiol. (London), 250: 32-38.
- Awampara, J. (1962): Free amino acids in invertebrates: A comparative study of their distribution. En: Amino Acid Pool (J.F. Holden, ed.) Amsterdam: Elsevier, pp.156-170.
- Awampara, J. (1976): The metabolism of taurine in the animal. En: Taurine (R.J. Muxtable y A. Barbason, eds.) Raven Press, New York, pp.1-19.
- Azuma, J., Hasegawa, N., Awata, A., Sawamura, A. y Harada, H. (1983): Taurine for treatment of congestive heart failure in humans. Progr. Clin. Biol. Res. 125: 61.
- Ben-Sasson, S., Shaviv, R., Bentwich, Z., Slavins, S. y Doljanski, F. (1975): Osmotic behaviour of normal and leukemic lymphocytes. Blood 46: 891-899.
- Bernardi, N. (1965): On the role of taurine in the cerebellar cortex: A Reappraisal. Physiol. Pharmacol. Acta (Lutinoem.) 35: 153-164.
- Cheung, R.K., Grinstein, S., Bosch, H.M. y Gelfand, E.W. (1982): Volume regulation by human lymphocytes: Characterization of the ionic basis for regulatory volume decrease. J. Cell. Physiol. 112: 189-196.
- Clark, R.M. y Collins, G.S. (1975): The release of endogenous

- amino acids from the mammalian visual cortex. J. Physiol. (London) **246**: 16-20.
- Collins, G.S. y Topiwala, S.H. (1974): The release of ^{14}C -taurine from slice of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium concentration. Proc. E. Pharmacol. Soc. pp.451-452.
- Crnac, D.M., Hammerstad, J.P. y Cutler, R.W. (1973): Accelerated efflux of ^{14}C y ^3H amino acids from superfused slices of rat brain. J. Neurochem. **20**: 203-209.
- Curtis, D.R., Hosli, L. y Johnston, G.R. (1968): A pharmacological study of spinal neurons by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res. **6**: 1-18.
- Curtis, D.R. y Tebecis, A.K. (1972): Bicuculine and thalamic inhibition. Exp. Brain Res. **16**: 210-218.
- Curtis, D.R. y Watkins, J.C. (1960): The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. J. Neurochem. **6**: 117-141.
- De Belleruche, J.J. y Bradford, H.I. (1973): Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal. J. Neurochem. **21**: 441-451.
- Deutsch, C., Slater, L. y Goldstein, P. (1982): Volume regulation of human peripheral blood lymphocytes and stimulated proliferation of volume-adapted cells. Biochem. Biophys. Acta. **721**: 262-267.
- Enna, S.J., Kuhar, M. y Snyder, S.H. (1975): Regional distribution of postsynaptic receptor binding for gamma-aminobutyric acid (GABA) in monkey brain. Brain Res. **93**: 168-175.
- Foskett, J.K. y Spring, K.R. (1983): Control of epithelial cell volume regulation. J. Gen. Physiol. **82**: 21.
- Foskett, J.K. y Spring, K.R. (1984): Ca^{2+} and microfilaments in epithelial cell volume regulation. Fed. Proc. **43**: 447.
- Fugelli, K. y Steinar, M. (1986): Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisotonic conditions. J. Physiol. **374**: 245-261.
- Fukuda, K., Hirai, Y., Yoshida, H., Nakajima, T. y Usui, T. (1982): Free amino acids content of lymphocytes and granulocytes compared. Clin. Chem. **28**: 1758-1761.
- Gilles, R. (1979): Intracellular organic osmotic effectors. En: Mechanisms of Osmoregulation in Animals (R. Gilles, ed.) pp.111-154. John Wiley, Chichester.

- Goldman, R.D., Berg, G., Bushnell, A., Chang, C.M. (1973): Filopillar systems in cell motility. En: Locomotion of tissue cells. Ciba Found. Symp. 14: 83-102.
- Grinstein, S., Clarke, D.A., Dupre, A. y Rothstein, A. (1982a): Volume-induced increase of permeability in human lymphocytes. J. Gen. Physiol. 80:801-823.
- Grinstein, S., Dupre, A. y Rothstein, A. (1982b): Volume regulation by human lymphocytes. Role of calcium. J. Gen. Physiol. 79: 849-868.
- Grinstein, S., Rothstein, B., Barkadi, B. y Gelfand, E.W. (1984): Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior. Am. J. Physiol. 246: c204-c215.
- Gruener, R. y Bryant, H.J. (1975): Excitability modulation by taurine: actions on axon membrane permeabilities. J. Pharmac. Exp. Ther. 194 514-521.
- Hayes, K.C., Carey, R.E. y Schmidt, S.Y. (1975a): Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. Science 188: 949-951.
- Hayes, K.C., Rabin, A.R. y Berson, E.L. (1975b): An ultrastructural study of nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats. Am. J. Physiol. 78: S05-S24.
- Hayes, K.C. y Sturman, J.A. (1981): Taurine in metabolism. Ann. Rev. Nutr. 1: 401-425.
- Heckenlively, J.R. (1988): Retinitis Pigmentosa. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Hendil, K.B. y Hoffmann, E. (1974): Cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. J. Cell Physiol. 84: 115-126.
- Hoffmann, E. (1987): Cell volume regulation and anion transport in a mammalian cell.
- 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 Yamamura, H.I. (1978): High affinity, temperature-sensitive and sodium dependent transport of taurine in rat brain. En: Taurine And Neurological Disorders (A. Barbeau y R.J. Huxtable, eds) pp.109-117. Raven Press, New York.
- Huxtable, R.J. (1980): The regulation and function of taurine in the heart and other organs. En: Natural Sulfur Compounds Novel Biochemical and Structural Aspects (D. Cavallini, G.E. Gault y V. Zappia, eds.) pp.277-294. Plenum Press, New York.

- Huxtable, R. y Bressler, R. (1973): Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. Biochem. Biophys. Acta 323: 573-583.
- Huxtable, R.S. y Lippincott, S.E. (1982): Sources and turnover rates of taurine in newborn, weanling and mature rats. Adv. expl. med. Biol. 139: 23-46.
- Izumi, K., Donaldson, J., Munnich, J. y Barbeau, A. (1973): Quabain induced seizures in rats: suppressive effects of taurine and amino butyric acid. J. Physiol. Pharmacol. (Can.) 51: 885-889.
- Jacobsen, J.G. y Smith, L.H. (1968): Biochemistry and Physiology of taurine and taurine derivatives. Physiol. Rev. 48: 424-511.
- Kletzien, F.R., Pariza, M.W. y Potter, R. (1975): A method using 3-0-methyl(¹⁴C)-D-glucose y phorasin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. Anal. Biochem. 66: 537-544.
- Kontro, P., Marnela, K.M. y Oja, S.S. (1980): Free amino acids in the synaptosome and synaptic vesicle fractions of different bovine brain areas. Brain Res. 184: 129-141.
- Kulakowski, E.C. y Maturio, J. (1984): Hypoglycemic Properties of taurine: not mediated through enhanced insulin release. Biochem. Pharmac. 33: 2835-2838.
- Kulakowski, E.C., Maturio, J. y Schaffer, S.W. (1985): The low affinity taurine-binding protein may be related to the insulin receptor. Progr. Clin. Biol. Res. 179: 127.
- Kuriyama, K., Maramatsu, M. y Nakagawa, K. (1978): Modulating role of taurine on release of neurotransmitter and calcium transport in excitable tissues. En: Taurine and Neurological Disorders (A. Barbeau y R. Huxtable, eds.) pp.201-216. Raven Press, New York.
- Kuriyama, K., Shuji, I., Nishimura, R. y Ohkuma, S. (1983): Distribution and function of taurine in nervous tissues. En: Sulfur Aminoacids (R. Huxtable y A. Barbeau, eds.) pp.127-140. Raven Press, New York.
- Lahdesmaki, P. (1986): Determination of taurine and other acidic amino acids in plants (Pergamon Journals Ltd. printed in Great Britain). Phytochemistry vol.25, 10: 2409-2411.
- Lahdesmaki, P., Karppinen, A., Saarni, H.Y. y Winter, R. (1977): Amino acids in the synaptic vesicle fraction from calf brain: content, uptake and metabolism. Brain Res. 184: 295-303.
- Lahdesmaki, P. y Oja, S.S. (1973): On the mechanism of taurine transport at brain cell membranes. J. Neurochem. 20: 1411-1417.

- Lair, H., Lippincott, S.E. y Huxtable, R. (1980): Contribution of dietary taurine to total body taurine in rat. Fed. Proc. 39:1045.
- Lew, V.L. y Ferreira, H.G. (1978): Calcium transport and the properties of a calcium-activated potassium channel in red cell membranes. Curr. Top. Membr. Transp. 10: 217-277.
- Lipton, J.M. y Tickner, C.G. (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 Pasantes-Morales, H. (1980): Taurine interactions with chick retinal membranes. J. Neurochem. 34: 1047-1052.
- Marnela, K.M., Timonen, M. y Lahdesmaki, P. (1984): Mass spectrometric analyses of brain synaptic peptides containing taurine. J. Neurochem 43: 1650-1653.
- Mills, J.M. y Skiest, D.J. (1985): Role of cyclic AMP and the cytoskeleton in volume control in MDCK cells. Mol. Physiol. 8: 247-262.
- Mutani, R., Bergamini, L., Durelli, L. (1978): Taurine in experimental and human epilepsy. En: Taurine and Neurological Disorders (A. Barbeau y R. Huxtable, eds.) pp.359-374. Raven Press, New York.
- Oja, S.S. y Kontro, P. (1978): Taurine and Neurological Disorders (A. Barbeau y R. Huxtable, eds.) pp.181-200. Raven Press, New York.
- Oja, S.S. y Kontro, P. (1983): Taurine. Handbook of Neurochemistry vol. 3 (S.L. Bonting, ed.) pp.89-105. Pergamon Press, LTD. Oxford, New York.
- Olson, J.E., Sankar, R., Holtzman, D. y Fleischacker, D. (1986): Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. J. Cell Physiol. 128: 209-215.
- Pasantes-Morales, H. (1986): Current concepts on the role of taurine in the retina. En: Progress in Retinal Research (N.N. Osborne y G. Chader, eds.) pp.207-229, vol.5. Pergamon Press, Oxford.
- Pasantes-Morales, H., Adame, R.M. y Quesada, O. (1981): Protective effect of taurine on the light-induced disruption of isolated frog rod outer segments. J. Neurosci. Res. 6: 337-348.
- Pasantes-Morales, H., Arzate, M.E. y Cruz, C. (1982): The role of taurine in nervous tissue: its effects on ionic fluxes. Adv. exp. med. Biol. 139: 273-292.

- Pasantes-Morales, H. y Cruz, C. (1985): Taurine: a physiological stabilizer of photoreceptor membranes. En: Taurine: Biological Actions and Clinical Perspective (S.S. Oja, L. Ahtel, P. Kontro y M.K. Paasonen, eds.) pp.371-381. New York, Alan R. Liss.
- Pasantes-Morales, H., Dominguez, L., Montenegro, J. y Morán, J. (1988): A chloride-dependent component of the release of labeled GABA and taurine from the chick retina. Brain Res. **459**: 120-130.
- Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Carabez, A. y Huxtable, R.J. (1983): Effects of the taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate and alanine on the morphology of the rat retina. J. Neurosci. Res. **9**: 135-143.
- Pasantes-Morales, H., Salceda, R. y Lopez-Colomé, A.M. (1980): The effect of colchicina and cytochalasin B on the release of taurine from the chick retina. J. Neurochem. **34**: 172-177.
- Pasantes-Morales, H. y Schousboe, A. (1988): Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. J. Neurosci. Res. **20**: 505-511.
- Pollock, A.S. y Arieff, A.J. (1980): Abnormalities of cell volume regulation and their fractional consequences. Am. J. Physiol. **239**: F195-F205.
- Poznansky, M. y Solomon, A.K. (1972): Regulation of human red cell volume by linked fluxes. J. Membr. Biol. **10**: 259-266.
- Roti-Roti, L.W. y Rothstein, A. (1973): Adaptation of mouse leukemic cells in anisotonic media. Exp. Cell Res. **79**: 295-310.
- Roy, G. y Seuve, R. (1987): Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. J. Membr. Biol. **100**: 83-96.
- Schmidt, S.Y., Berson, E.L. y Hayes, K.C. (1976): Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency. Invest. Ophthalmol. **15**: 47-52.
- Schmidt, S.Y., Berson, E.L., Watson, G. y Huang, C. (1977): Retinal degeneration in cats fed casein. III. Taurine deficiency and ERG amplitudes. Invest. Ophthalmol. **16**: 673-678.
- Schrier, B.K. y Thompson, E.J. (1974): On the role of glial cell in the mammalian nervous system. Uptake, excretion and metabolism of putative neurotransmitters by cultured glial tumor cell. J. Biol. Chem. **249**: 1769-1780.
- Snyder, S.S. (1975): The glycine synaptic receptor in the mammalian central nervous system. J. Pharmacol. Br. **53**: 475-

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

484.

- Spaeth, D.G. y Schneider, D.L. (1976): Taurine metabolism. Effects of diet and bile salt metabolism. En: Taurine (R. Huxtable y A. Barbeau, eds.) pp.33-44. Raven Press, New York.
- Stein, W.H. y Moore, S. (1954): The free amino acids of human blood plasma. J. Biol. Chem. 211: 915-926.
- Sturman, J.A. (1973): Taurine pool sizes in the rat: effects of vitamin B₆ deficiency and high taurine diet. J. Nutr. 103: 1566-1580.
- Sturman, J.A., Kenneth, C. y Hayes, K.C. (1980): The biology of taurine in nutrition and development. En: Advances in Nutritional Research (H. Harold y Draper, eds.) vol.3, pp.231-299. Plenum Publishing Corp.
- Sturman, J.A., Messing, J.M., Rossi, S.S., Hofmann, A.F. y Neuringer, D.M. (1988): Tissue taurine content and conjugated bile acid composition of rhesus monkey infants fed a human infants supplementation for 3 months. Neurochem. Res. vol.3, 4: 311-316.
- Sturman, J.A., Moratz, R.C., French, J.A. y Wisniewski, H.M. (1985): Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. J. Neurosci. Res. 13: 405-416.
- Sumizu, K. (1962): Oxidation of hypotaurine in rat liver. Biochem. Biophys. Acta 63: 210-212.
- Tiedemann, F. y Gmelin, L. (1827): Einige neue Bestandtheile der Galle des Ochsen. Ann. Physik. Chem. 9: 326-337.
- Tokunaga, H., Yoneda, Y. y Kuriyama, K. (1983): Strepto-zotocin induced elevation of pancreatic taurine content and suppressive effect of taurine on insulin secretion. J. Pharmacol. Eur. 89: 237-243.
- Thurston, J.H., Hanhart, R.E. y Naccarato, E.F. (1981): Taurine: possible role in osmotic regulation of mammalian heart. Science 214: 1373-1374.
- Van Gelder, N.M. (1978): Glutamic and epilepsy: the action of taurine. En: Taurine and Neurological Disorders (A. Barbeau y R.J. Huxtable, eds.) pp.387-402. Raven Press, New York.
- Van Gelder, N.M., Shervin, A.L., Sacks, C. y Anderman, F. (1975): Biochemical observations following administration of taurine in patients with epilepsy. Brain Res. 94: 297-306.
- VanRossum, G.D. y Russo, M.A. (1981): Ouabain-resistant mechanism of volume control and the ultrastructural organization of

liver slices recovering from swelling in vitro. J. Membr. Biol. 59: 191-209.

Vislie, T. (1982): On the role of taurine in the hypo-osmotic cell volume regulation in eel (Anguilla anguilla) heart ventricle. Mar Biol. Lett 3: 53-63.

Vislie, T. (1983): Cell volume regulation in fish heart ventricles with special reference to taurine. Comp. Biochem. Physiol. vol.76A. 3: 507-514.

Vislie, T. y Fugelli, K. (1975): Cell volume regulation in flounder (Platichthys flesus) heart muscle accompanying an alteration in plasma osmolality. Comp. Biochem. Physiol 52A: 415-418.

Weiss, B. y Levin, R.M. (1978): Mechanisms for selectivity inhibiting the activation of nucleotida phospho diesterase and adenylate cyclase by antipsychotic agents. Adv. Nucleotide Res. 9: 285-303.

Welty, J.D. y Read, W.O. (1964): Studies on some cardiac effects of taurine. J. Pharmac. exp. Ther. 144: 110-115.

Wen, G.F., Sturman, J.A., Wisniewsky, H.M. y Hayes, K.C. (1979): Tapetum desorganization in taurine-depleted cats. Invest. Ophthalmol., Vis. Sci. 18: 1200-1206.