



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
División de Neurociencias

INFLUENCIA DE LA TAURINA EN LAS CÉLULAS TRONCALES NEURALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

REYNA HERNÁNDEZ BENÍTEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. HERMINIA PASANTES ORDÓÑEZ

Instituto de Fisiología Celular

COMITÉ TUTOR

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES

Instituto de Biotecnología

DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO

<i>Palabras clave</i>	2
<i>Abreviaturas</i>	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. RESUMEN	6
III. ANTECEDENTES	8
<i>El desarrollo embrionario y las células troncales</i>	8
<i>Células troncales neurales</i>	12
<i>La neurogénesis en el cerebro adulto</i>	14
<i>La expansión de las CTN in vitro</i>	17
<i>Factores que influyen la homeostasis de las CPN</i>	19
<i>La diferenciación de las CPN</i>	21
<i>Las CTN y la terapia de reemplazo neural</i>	22
<i>La taurina</i>	24
<i>La distribución y el contenido de la taurina en las especies y los tejidos</i>	24
<i>El contenido de taurina durante el desarrollo del cerebro</i>	26
<i>La síntesis de taurina</i>	27
<i>El transportador de taurina</i>	29
<i>Las funciones de la taurina</i>	30
<i>La conjugación de sales biliares</i>	30
<i>La taurina como osmolito orgánico</i>	31
<i>La modulación de la homeostasis del calcio</i>	32
<i>El efecto estabilizador de membranas</i>	33
<i>La taurina como antioxidante</i>	34
<i>Las acciones de la taurina en el desarrollo del sistema nervioso</i>	36
IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
V. OBJETIVO	41
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
VII. RESULTADOS	43
1. <i>La taurina aumenta la proliferación de las células precursoras neurales del cerebro embrionario de ratón.</i>	43
2. <i>La expresión funcional y localización del transportador de taurina (TauT) en las células precursoras neurales</i>	52
3. <i>La taurina estimula la proliferación y promueve la neurogénesis de las células precursoras neurales del cerebro adulto de ratón</i>	57
4. <i>La taurina potencia la proliferación y promueve la diferenciación neuronal de las células precursoras neurales del cerebro fetal humano</i>	66
5. <i>Las evidencias sobre el mecanismo de acción de la taurina en las CPN</i>	73
VIII. DISCUSIÓN	79
IX. RESUMEN GRÁFICO	93
X. CONCLUSIONES	94
XI. AGRADECIMIENTOS	95
XII. REFERENCIAS	96
XIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS	109

Palabras clave

Células precursoras neurales, proliferación, diferenciación, desarrollo, neurogénesis, transportador de taurina

Abreviaturas

ANDEVA análisis de varianza; **BrdU** bromodeoxiuridina; **BSA** del inglés *bovine serum albumin*; **CDO** cisteína dioxigenasa; **CSD** cisteína sulfinato descarboxilasa; **CPN** células precursoras neurales; **CPNh** células precursoras neurales humanas; **CTN** células troncales neurales; **EE** error estándar; **EGF** del inglés *epidermal growth factor*; **ESC** del inglés *embryonic stem cell*; **FGF** del inglés *fibroblast growth factor*; **FGFR** del inglés *fibroblast growth factor receptor*; **GABA** del inglés *gamma aminobutyric acid*; **GFAP** del inglés *glial fibrillary acidic protein*; **GS** del inglés *goat serum*; **HPLC** del inglés *high performance liquid chromatography*; **MBP** del inglés *myelin basic protein*; **NPCs** del inglés *neural precursor cells*; **ROS** del inglés *reactive oxygen species*; **SNC** sistema nervioso central; **TauT** transportador de taurina; **ZSV** zona subventricular.

Influencia de la taurina en las células troncales neurales

I. INTRODUCCIÓN

La taurina es un aminoácido ubicuo y abundante en las células animales pese a que no forma parte estructural de las proteínas. Su función más conocida es la de osmolito en la regulación del volumen celular. Además, en el cerebro en formación las concentraciones de taurina son elevadas y hay evidencia de que tiene un papel importante en el desarrollo normal del sistema nervioso central. Sin embargo, se desconoce cuál es la acción de la taurina que provoca su requerimiento, la cual parece ser independiente de su función descrita como molécula reguladora del volumen celular. Hasta la fecha no se han realizado estudios que determinen por qué la taurina es necesaria para el óptimo desarrollo del sistema nervioso y se ha mostrado que su deficiencia provoca alteraciones morfológicas y funcionales.

A partir de los años 70's se publicaron diversos estudios que evidenciaron que la ingesta inadecuada de taurina en los gatos provocaba abortos frecuentes y los fetos presentaban anomalías en la formación del cerebro, observadas principalmente a nivel del cerebelo y la corteza visual (Hayes *et al.*, 1975; Palackal *et al.*, 1986; Sturman *et al.*, 1985; Wen *et al.*, 1979). Algunos años más tarde, se mostraron algunas consecuencias similares en monos (Hayes *et al.*, 1980; Neuringer *et al.*, 1990; Sturman, 1993); y desde finales de los años 80's, se prescribió la taurina como suplemento en las fórmulas lácteas para infantes (Heird, 2004; Sturman *et al.*, 1988).

Sin embargo, los estudios sobre el papel de la taurina en el desarrollo de las células cerebrales son escasos (Chen *et al.*, 1998; Moran *et al.*, 1996), y se sabe poco sobre el mecanismo que subyace la acción de la taurina en estas células. Algunos sugieren que su acción es consecuencia de un efecto antioxidante, como el observado en otros tejidos (Schaffer *et al.*, 2009); mientras que otros proponen que sus efectos pueden relacionarse con su efecto en la estabilización de membranas o en la modulación del calcio (Huxtable,

1992). En las células neurales maduras, los trabajos que exploran un papel trófico de la taurina al proteger a las células de daños son variados (Pasantes-Morales y Cruz, 1985a; Pasantes-Morales y Cruz, 1985b; Pasantes-Morales *et al.*, 1985; Rivas-Arancibia *et al.*, 2001); y a pesar de estas evidencias aún no se ha determinado si esa es la causa de su requerimiento para el desarrollo del cerebro (Pasantes-Morales y Hernández-Benítez, 2010).

Durante la formación del sistema nervioso están presentes las células troncales y progenitoras neurales, en conjunto llamadas células precursoras neurales (CPN). El comportamiento de las CPN se modifica por factores diversos, tanto endógenos como exógenos, muchos de los cuales aún no han sido explorados (Dutton *et al.*, 1999; Lieberwirth y Wang; Lu *et al.*, 2008; Ramasamy *et al.*, 2013). La taurina es una molécula con la cual convergen espacial y temporalmente las CPN en la etapa embrionaria o fetal y que puede interactuar con las CPN adultas, principalmente aquellas que radican en la zona subventricular debido al contacto con el líquido cefalorraquídeo. La taurina es interesante debido a que es un aminoácido, que sin formar parte de las proteínas, es abundante durante la etapa del desarrollo del cerebro y al considerar sus funciones sobre otros tipos celulares y las consecuencias de su deficiencia en el desarrollo cerebral, se sugiere la posibilidad de que la taurina actúe como un factor trófico o protector, necesario para la ontogenia óptima de las células cerebrales. La comprensión del papel de la taurina en las CPN ayudará a dilucidar su función en el desarrollo del cerebro y también permitirá conocer sus posibles aplicaciones como un factor de soporte en el manejo de las CPN.

El estudio de los mecanismos por los cuales la taurina ejerce sus efectos en las células inmaduras del sistema nervioso, puede ser propiamente abordado en el cultivo de neuroesferas, un sistema *in vitro* que permite el aislamiento y la propagación de las CPN. Este cultivo representa un modelo de fácil mantenimiento y reproducción, que permite evaluar de forma consistente las repercusiones de la taurina en las células neurales en desarrollo. Adicionalmente, esta investigación se une a los trabajos que examinan la importancia de los factores que intervienen en la proliferación, la sobrevivencia

o la diferenciación de las CPN y que podrían ser prometedores para futuras aplicaciones.

En este contexto, esta investigación examina la influencia de la taurina en las propiedades biológicas básicas que caracterizan a las células troncales y progenitoras neurales –como la proliferación, la autorrenovación y la multipotencialidad-, con el propósito de explicar el papel de la taurina en el desarrollo del cerebro y contribuir a optimizar el manejo de esas células.

II. RESUMEN

La taurina es un aminoácido presente en concentraciones altas en el sistema nervioso central en desarrollo y necesario para la adecuada ontogenia del cerebro. Las razones de este requerimiento aún se desconocen. Para abordar ese cuestionamiento, la presente investigación determinó las acciones de la taurina en las células troncales y progenitoras neurales, en conjunto llamadas células precursoras neurales (CPN), obtenidas mediante el sistema de neuroesferas. Las CPN están presentes en el sistema nervioso en desarrollo y en regiones discretas del cerebro adulto. Se generaron cultivos de neuroesferas a partir del tejido de cerebro embrionario y adulto de ratones, así como del tejido de cerebro fetal humano. Las células de los cultivos fueron entre 76 y 97% positivas a nestina, un marcador de CPN. La taurina aumentó el número de CPN en los cultivos de neuroesferas hasta 120% sobre el control, uno de los efectos más altos reportados ante la adición de cualquier otro componente al medio tradicional de cultivo. Este efecto se relacionó con el incremento en la cantidad de las células positivas a BrdU y de las células en fase S del ciclo celular, cuantificadas por inmunocitoquímica y citometría de flujo, respectivamente. En ningún caso se evidenciaron cambios en la viabilidad celular medida con azul tripano. Luego de sembrar a las CPN en un medio de diferenciación con taurina, se evaluó la presencia de marcadores gliales y neuronales y se obtuvieron de 3 a 4 veces más neuronas en comparación con el control. Las CPN incorporan la taurina mediante el transportador TauT, el cual se encontró expresado funcionalmente en el 98.8% de las células. Mediante microscopia confocal, se determinó que la taurina capturada se ubicó en el citoplasma de las células y alcanzó concentraciones semejantes a las encontradas en el entorno embrionario, de acuerdo a las mediciones por HPLC del contenido de taurina. Los efectos de la taurina examinados por un análisis de microarreglo, evidenciaron cambios en la expresión de 2177 genes. El posterior análisis bioinformático mostró que la taurina reguló la expresión de genes relacionados con vías de proliferación, moléculas de adhesión y metabolismo mitocondrial, mientras que disminuye la expresión de moléculas relacionadas con la muerte celular. En conjunto, estos resultados son relevantes para explicar las acciones que la taurina podría ejercer en las células durante el desarrollo del sistema nervioso central, así como el papel que podría desempeñar en la neurogénesis del adulto; asimismo la apuntan como una molécula útil en el manejo *in vitro* de las CPN para favorecer su proliferación y la diferenciación hacia neuronas.

ABSTRACT

Taurine is a free amino acid present in high concentrations in the central nervous system during development. Taurine seems to be necessary for brain ontogeny, though the reasons of that requirement are poorly understood. The present investigation addressed that question in neural stem and progenitor cells (collectively named neural precursor cells, NPCs), which could be isolated and expanded *in vitro* in a neurosphere culture system. Neurospheres were derived from embryonic and adult mouse brain, and from fetal human brain. Neurosphere forming cells were 76-97% positive to the NPCs marker nestin. Taurine increased NPCs number in neurosphere cultures, reaching 120% over the control condition, being this one of the highest effects reported for the addition of any component to the typical culture media. Taurine increased the number of BrdU positive cells and the number of cells in S phase of the cell cycle, measured by immunocytochemistry and flow cytometry, respectively. By the experimental approach used in this work, no difference was observed in the cellular viability. The results point to an effect of taurine on cell proliferation. NPCs plated under differentiation conditions generate glial and neuronal cells. In this condition, taurine increased the number of neurons about 3-4 times over controls. Taurine is incorporated to NPCs by the specific taurine transporter TauT, which was found functionally expressed in 98% of the cells. When grown in a taurine-supplemented medium, taurine levels in NPCs (measured by HPLC) reached the concentrations present in the embryonic niche. Confocal microscopy analysis revealed that taurine is located at the cytosol, and absent in the nucleus. A microarray analysis of cells grown in the presence of taurine showed changes in the expression of 2177 genes, as compared to cultures without taurine. Then, the bioinformatic analysis revealed that taurine regulate the expression of genes related to proliferation pathways, adhesion molecules and mitochondrial metabolism, and decreased the gene expression of molecules related to cellular death. Altogether, these results provide information about the mechanisms of taurine effects on NPCs cultures and are relevant to the knowledge of the physiological role of taurine during development.

III. ANTECEDENTES

El desarrollo embrionario y las células troncales

El desarrollo embrionario comienza con un ovocito fecundado. Este cigoto es una célula totipotencial capaz de generar al embrión y a las estructuras extraembrionarias: la placenta, el saco vitelino y el cordón umbilical. El cigoto se divide en células cada vez más pequeñas llamadas blastómeros, con lo que aumenta el número celular sin modificar la masa inicial. Este proceso de segmentación genera la mórula, cuyas células (en número de 8 a 16) son iguales en morfología y potencialidad, y solo se distinguen por su posición interna o externa; es decir, hasta este estadio, todas las células son totipotenciales (Cockburn y Rossant, 2010; Oron y Ivanova, 2012; Artus y Hadjantonakis, 2012).

Inmediatamente después de la implantación, las células externas de la mórula forman el trofoblasto, y las internas generan la masa celular interna y al endodermo primitivo. Luego, durante el proceso de cavitación, las células del trofoblasto secretan un fluido al interior de la mórula y crean una cavidad (el blastocelo), que desplaza a las células de la masa celular interna, las cuales se ubican sobre el endodermo primitivo. A esta estructura, limitada por el trofoblasto, se le llama blastocisto (**figura I**). Las células de la masa celular interna, son células pluripotentes con la habilidad de formar células de cualquier tejido del organismo, pero incapaces de originar estructuras extraembrionarias. Las células de la masa celular interna aisladas en cultivo, se comenzaron a nombrar células troncales embrionarias (ESC, del inglés embryonic stem cell) (Rossant, 1976).

El desarrollo del blastocisto procede a través de la gastrulación, durante la cual se establece el patrón corporal básico de los organismos. En todos los animales, la gastrulación origina tres linajes: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo, cada uno conformado por un grupo de células que conservan su pluripotencialidad, pero comprometidas por su localización en el embrión. Estas

capas germinales darán lugar a diferentes órganos; el ectodermo formará la piel y el sistema nervioso; el endodermo, el tracto digestivo y el respiratorio; y el mesodermo, originará al tejido conectivo, la sangre, el corazón, el sistema urogenital y a la mayoría de órganos internos (Rossant y Tam, 2009). Las células comprometidas con un linaje particular son células multipotentes o con la potencialidad de diferenciarse hacia los linajes del tejido del cual derivan. Fue entonces que al identificar, a través del desarrollo embrionario, a células con diferentes potencialidades se describieron a las células troncales (Baizabal *et al.*, 2003).

En una definición general, las células troncales se caracterizan por su potencial para desarrollar los diferentes linajes celulares del cuerpo de un organismo. Son células indiferenciadas, capaces de proliferar, de autorrenovarse y bajo las condiciones apropiadas, fisiológicas o experimentales, diferenciarse en células especializadas y funcionales; de acuerdo a su nivel de potencialidad para originar los diferentes tipos celulares, se clasifican en totipotentes, pluripotentes y multipotentes. La autorrenovación es la propiedad que les permite generar células nuevas con las características biológicas de la célula troncal original, durante un gran número de generaciones y algunas veces aún después de largos periodos de inactividad (Ahmed, 2009).

Las células troncales en el organismo adulto se identificaron por primera vez en el sistema hematopoyético de ratones (Till y McCulloch, 1961). Después se encontraron en otros tejidos y es probable que la mayoría de los tejidos adultos tengan un grupo de células troncales mantenidas bajo un estricto control de crecimiento y que se activen para intervenir en determinadas circunstancias. Se considera que las células troncales forman, mantienen y regeneran a los tejidos y órganos donde residen; son indispensables en el desarrollo de los organismos y tienen el potencial de generar nuevas células en respuesta a determinadas lesiones (Baizabal *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2007).

En el adulto, la tasa de producción de células maduras a partir de células troncales varía entre los distintos tejidos. En algunos órganos, tales como el intestino, la piel o la médula ósea, las células troncales se dividen continuamente para reparar y reemplazar a los tejidos muertos o dañados; en otros órganos, como el páncreas, el corazón y el cerebro, las células troncales se dividen a una tasa más baja o en condiciones especiales (Ahmed, 2009).

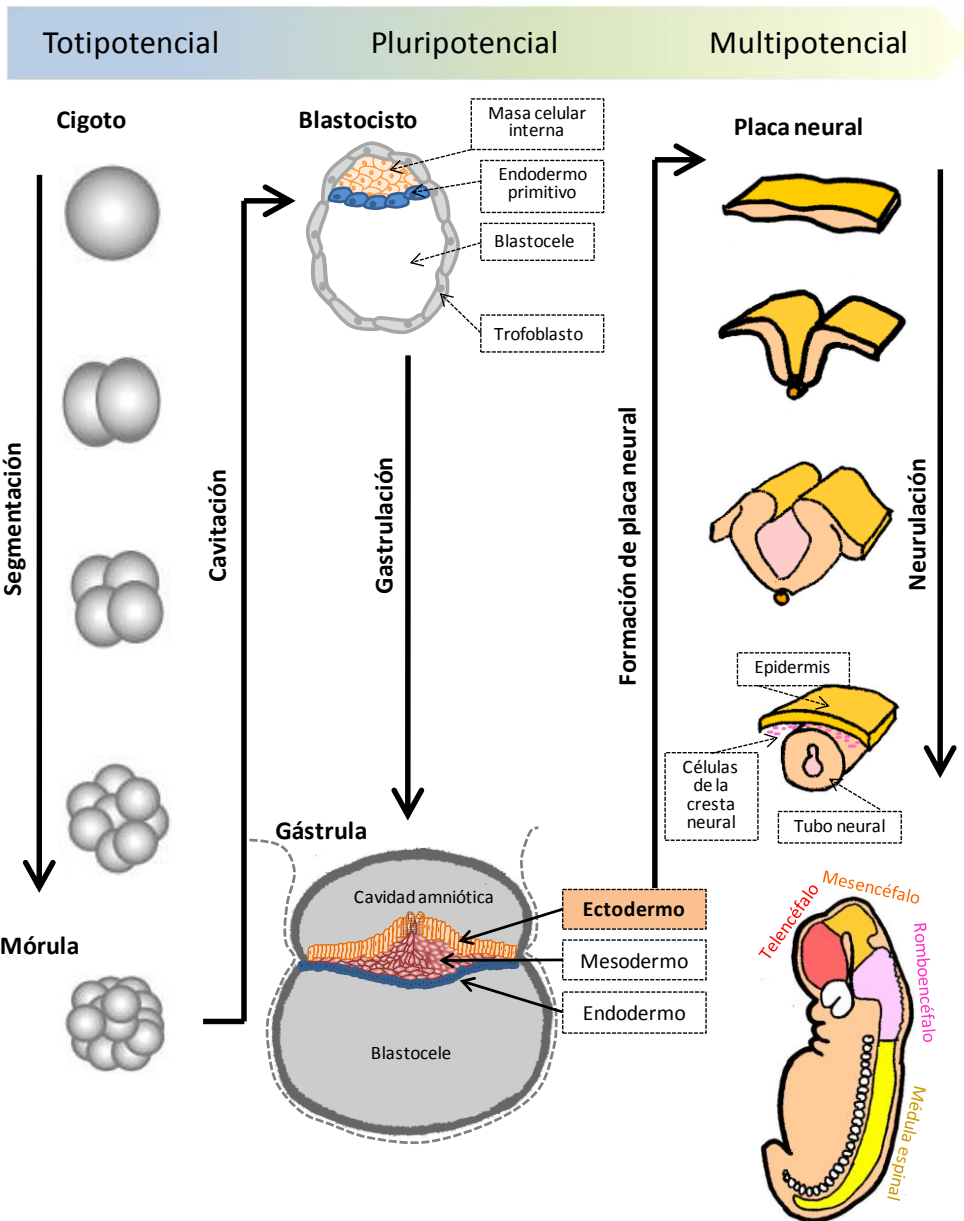


Figura 1. El desarrollo embrionario del ratón y la potencialidad de las células. El cigoto es una célula totipotencial, capaz de producir al embrión y a las estructuras que no formarán parte de él. La totipotencialidad continúa hasta el estadio de la mórula, donde cada célula es idéntica a las otras. Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el que cada una de las células que forman a la masa celular interna es capaz de formar a las células de cualquier tejido del organismo, de ahí que se les considere células pluripotenciales. Estas células, incapaces de dar origen al linaje extraembrionario, durante la gastrulación producen tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Cada capa germinal está destinada a generar diferentes tejidos. El mesodermo genera al tejido conectivo, sistema urogenital y a la mayoría de órganos internos; mientras que el endodermo origina al tracto digestivo y respiratorio. El ectodermo forma al sistema nervioso y la piel. Desde la especificación de la placa neural, hay un conjunto de células multipotentes, que mediante la neurulación forman al sistema nervioso embrionario y que están comprometidas a formar los linajes gliales y neuronales.

Células troncales neurales

La neurulación define a la población celular que originará al sistema nervioso en el embrión luego de la gastrulación. La neurulación inicia con señales de proliferación en la zona de contacto entre las capas del mesodermo y del ectodermo. En ese sitio, las células de origen ectodérmico se reacomodan, adquieren una forma aplanada y proliferan a lo largo del eje antero-posterior para formar la placa neural, la cual consiste en una capa de células neuroepiteliales indistintas y multipotentes, positivas a nestina y Sox2 (Graham *et al.*, 2003; Lendahl *et al.*, 1990). Posteriormente, en el centro de la placa neural se definen dos pliegues que forman un surco, el cual divide al embrión en los lados derecho e izquierdo; los pliegues se fusionan por una serie de movimientos morfogénéticos para formar el tubo neural, el cual se segmenta en vesículas que representan al lóbulo frontal, el mesencéfalo, el romboencéfalo y una prolongación posterior que desarrollará a la médula espinal (**figura I**) (Colas y Schoenwolf, 2001; Schoenwolf y Smith, 1990).

El desarrollo del sistema nervioso progresa, pero no todos los precursores neurales presentes en el estadio embrionario y fetal se diferencian, sino que se mantienen regiones discretas de neurogénesis en el cerebro joven y adulto, que se regulan cuidadosamente para mantener una proliferación controlada. Así, en el sistema nervioso, tanto en la etapa embrionaria como en la adulta, se distinguen un conjunto de células no diferenciadas, con capacidad proliferativa y con la potencialidad de diferenciarse en los tipos celulares del linaje neural, llamadas células troncales neurales (CTN) (Baizabal *et al.*, 2003; Reynolds y Weiss, 1996).

Las células troncales neurales existen en conjunto con células progenitoras, que son poblaciones intermedias, con una capacidad proliferativa limitada y un potencial de diferenciación más comprometido. Las células troncales a diferencia de las progenitoras, son capaces de dividirse y originar tanto a una célula progenitora como a una nueva célula troncal; en cuanto a las

células progenitoras generan, células de su misma identidad o comprometidas hacia un fenotipo terminal (Campos, 2004). De manera general, al conjunto de células troncales y progenitoras se les denominan células precursoras neurales (CPN) (Svendsen y Caldwell, 2000).

Las CPN están presentes de manera abundante durante el desarrollo embrionario, así como en ciertas regiones del sistema nervioso central del adulto. Las CPN son heterogéneas y pueden expresar marcadores como nestina, CD133, CD34, CD31, Tie2, SOX2, nucleostemina, vimentina, GFAP y Pax6, (Bez *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguno de esos marcadores es específico para las CPN, y la identificación de esas células se basa en sus características funcionales (es decir, por la identificación de su multipotencialidad y de su capacidad de autorrenovación) (Lu *et al.*, 2008).

La mayor parte de estudios sobre las CTN se han llevado a cabo en modelos murinos; sin embargo también se estudian sus características biológicas en modelos de CTN derivadas de humanos, primates y cerdos (Liard *et al.*, 2009). En 1998 se realizó la primera investigación de la neurogénesis en el hipocampo del cerebro humano (Eriksson *et al.*, 1998), y actualmente es posible mantener cultivos estables de CTN humanas, principalmente derivadas de tejido fetal. Las CTN embrionarias y fetales son más apropiadas que las CTN de tejido adulto para las posibles aplicaciones clínicas debido a su mayor flexibilidad, supervivencia y capacidad de migración (Ubiali *et al.*, 2007); además son más abundantes que las CTN adultas, lo que permite su obtención en gran cantidad a partir de poco tejido (Lu *et al.*, 2008). El principal problema del uso de las CTN es ético y se relaciona con la necesidad de la destrucción de embriones en fases tempranas, el uso de fetos abortados con fines experimentales y la definición de la vida en el ser humano según las connotaciones biológicas, filosóficas o religiosas; en este sentido las CTN adultas tienen una ventaja (Urruela-Mora, 2005). Sin embargo, desde un punto de vista práctico, las posibilidades de avanzar en la investigación y en sus aplicaciones son mayores si se emplean ambos tipos de CTN.

La neurogénesis en el cerebro adulto

El dogma de un cerebro estático incapaz de generar nuevas neuronas cambió con el descubrimiento de las CTN y la neurogénesis en cerebros maduros. La primera indagación de la neurogénesis se documentó por Altman en 1962, quien identificó la presencia de nuevas neuronas marcadas con timidina³H en áreas restringidas de los cerebros de ratas adultas. Posteriormente, Goldman y Nottembohm (1983) mostraron la neurogénesis en el telencéfalo de canarios. Finalmente, Reynolds y Weiss (1992) desarrollaron el sistema de neuroesferas con tejido estriado de cerebros de ratones adultos (Altman, 1962; Goldman y Nottembohm, 1983; Reynolds y Weiss, 1992).

En el cerebro de los adultos, las CTN se encuentran en dos principales regiones neurogénicas, la zona subventricular (ZSV) que limita a los ventrículos laterales (considerada la mayor fuente de CTN) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Gage, 2000). Desde su sitio de origen, las nuevas células migran hacia el bulbo olfatorio, por la vía rostral migratoria, o hacia la capa granular del hipocampo, respectivamente, donde se diferencian y se integran en circuitos funcionales (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Ming y Song, 2005).

La neurogénesis en el adulto también se ha documentado en otras regiones que tradicionalmente no se consideran neurogénicas. Por ejemplo, en el hipotálamo de diferentes animales se ha observado la generación de nuevas neuronas (Lee y Blackshaw, 2012; Migaud *et al.*, 2010); también se reporta neurogénesis en áreas como la neocorteza (Dayer *et al.*, 2005), el estriado (Bedard y Parent, 2004), la amígdala (Okuda *et al.*, 2009), la sustancia nigra (Zhao *et al.*, 2003) e incluso en el sistema nervioso periférico (Stemple y Anderson, 1992). Sin embargo, entre los investigadores hay discrepancia sobre la existencia de verdadera neurogénesis en esas áreas debido a los métodos utilizados en los estudios para detectar a las nuevas neuronas y replicar consistentemente los resultados (Gould, 2007; Migaud *et al.*, 2010); asimismo porque esas regiones no muestran proliferación ni producen nuevas neuronas

de forma espontánea en condiciones fisiológicas en el cerebro adulto, a diferencia de las dos zonas reconocidas usualmente (Gould, 2007). La diferente capacidad de las CTN de diferentes zonas para generar neuronas *in vivo versus in vitro*, sugiere la importancia del ambiente que las rodea para lograr una adecuada proliferación y diferenciación (Kim y Sun, 2012).

La neurogénesis en el cerebro adulto aumenta en respuesta a diversos factores. Se sabe que ciertos daños en el cerebro, como la isquemia y los traumatismos, inducen la proliferación de las CTN para generar nuevas células gliales y neuronales, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel en los mecanismos de auto-recuperación del cerebro (Arvidsson *et al.*, 2002; Kernie y Parent, 2010; Richardson *et al.*, 2007). Sin embargo, la cantidad de neuroblastos generados luego de un daño es limitada y la sobrevivencia y diferenciación hacia fenotipos maduros está lejos de producir efectos regenerativos. Otros factores ambientales externos que intervienen en la neurogénesis son la edad (Bondolfi *et al.*, 2004), la alimentación (Levenson y Rich, 2007), el ejercicio (Van Praag *et al.*, 1999) y el enriquecimiento del ambiente percibido sensorialmente (Kempermann *et al.*, 2000). Sin embargo, para que la neurogénesis ocurra, las CTN requieren de un conjunto apropiado de señales endógenas en las regiones donde se ubican, y hasta la fecha, no se conocen todas las características del microambiente de esas regiones (Gage, 2000).

De acuerdo al modelo más aceptado de neurogénesis en el cerebro adulto, las células troncales neurales son células de tipo astrocítico, posiblemente derivadas de la glia radial y positivas a nestina y GFAP. Las CTN en el adulto, nombradas células B, originan una población intermedia de células progenitoras capaces de proliferar activamente, denominadas células C, las cuales generan a las células A o neuroblastos migratorios (**figura II**). Esos neuroblastos inmaduros migran y pueden desarrollar neuronas maduras (Doetsch *et al.*, 1999; Lendahl *et al.*, 1990; Steiner *et al.*, 2006). La regulación de las CTN es compleja, sin embargo, el conocimiento del ambiente o nicho de las troncales es determinante para comprender las señales que modulan su comportamiento biológico. El nicho es el área especializada que provee

nutrientes, soporte estructural y protección a las células troncales, las cuales pueden permanecer quiescentes durante largos periodos. Entre los elementos que componen al nicho neurogénico se encuentran: vesículas sanguíneas, astrocitos, microglia, proteínas de matriz extracelular y proteoglicanos (Basak y Taylor, 2009). En la ZSV, las células B pueden alcanzar el ventrículo con sus procesos apicales y, por lo tanto, entrar en contacto con el líquido cefalorraquídeo, del cual pueden recibir señales; también están rodeadas por las células endoteliales, lo que añade complejidad a su regulación (Zappaterra y Lehtinen, 2012). Asimismo, las CTN pueden contactar con los vasos sanguíneos en áreas de la barrera hematoencefálica con menor restricción, lo que permite el intercambio de varios factores (Tavazoie *et al.*, 2008).

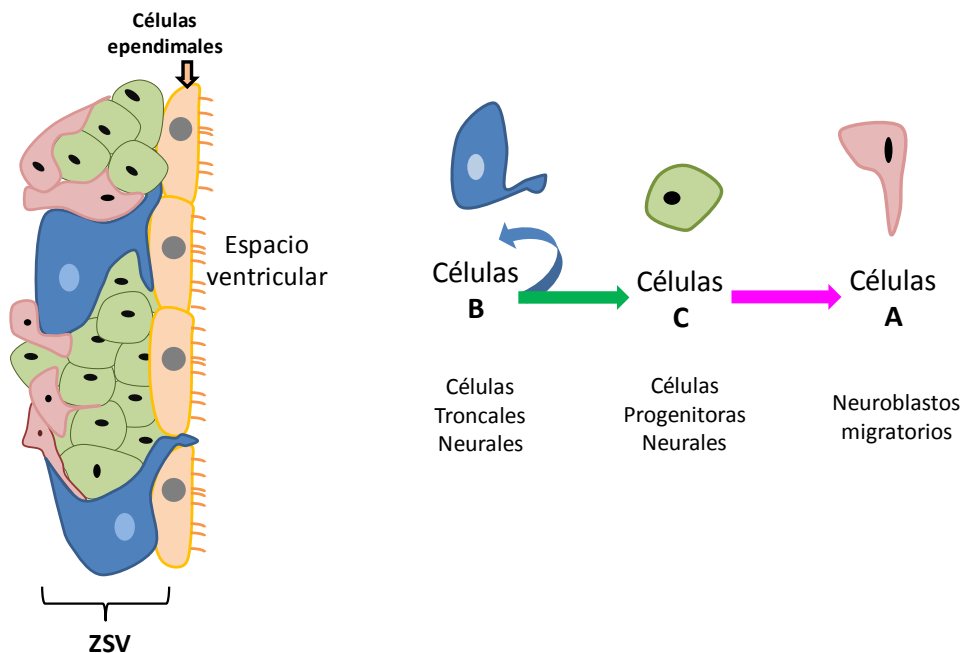


Figura II. Las células troncales y progenitoras neurales en la zona subventricular del cerebro adulto. Las células troncales neurales (CTN), también conocidas como células B (en azul), son células de tipo astrocítico con capacidad de autorrenovación, pues pueden originar a otra CTN o a las células progenitoras. Las células progenitoras, nombradas células C, también conocidas en inglés como *transit amplifying intermediate progenitors* (en verde), son células de proliferación continua que originan a los neuroblastos migratorios, o células A (en rosa). Las células A, pueden migrar y llegar a los sitios donde se diferenciarán en fenotipos terminales. Este grupo de células, ubicadas en la zona subventricular (ZSV), están en contacto con las células endoteliales que limitan con los ventrículos laterales, por lo que las células B también contactan y reciben señales de esas células y del líquido cefalorraquídeo (Doetsch *et al.*, 1999; Zappaterra y Lehtinen, 2012).

La expansión de las CTN *in vitro*

El conocimiento de muchas de las características de las CTN se debe a las técnicas de aislamiento y de expansión *in vitro*. Sin embargo, es posible que en ese proceso las CTN pierdan algunas propiedades de su estado fisiológico, determinadas por el contacto con las células de su nicho. Los cultivos de CTN se realizan ya sea con células adheridas al sustrato o con agregados celulares en suspensión. Ambas formas de cultivo son sencillas, robustas y mantienen la autorrenovación, la proliferación y la multipotencialidad de las CTN; la ventaja de los cultivos de CTN en suspensión es que crean un nicho donde se establecen gradientes y contactos más parecidos a los fisiológicos, lo que los hace más relevantes que los cultivos en monocapa (Ahmed, 2009). Las líneas celulares de CTN, generalmente crecen en monocapa, entre las líneas más conocidas se incluyen a CTN murinas (MHP36, rFetalNSC y C17.2) y humanas (ReNcellVM, ReNcellCX, ReN001, ReN005 y H9-derived). En cuanto a los cultivos de CTN en suspensión, la mayoría se obtienen por cultivos primarios y son modificaciones del primer protocolo desarrollado para la expansión de las células troncales *in vitro*, llamado sistema de neuroesferas e incluyen: el sistema NFU (cultivo de unidades formadoras de neuroesferas), el cultivo de CTN con baja densidad, los sistemas de neuroesferas inmovilizadas (que pueden emplear matrices de gel de colágeno o agarosa) y el ensayo N-CFCA (ensayo de células formadoras de colonias neurales) (Ahmed, 2009; Louis *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007).

El modelo experimental más empleado para estudiar las CPN en cultivo es el sistema de neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992). Éste es un cultivo selectivo que emplea medio libre de suero y una combinación de componentes tróficos, que permiten la proliferación de las células precursoras neurales y la generación de clonas multipotentes, mientras que otros tipos de células mueren (Chaichana *et al.*, 2006; Rietze y Reynolds, 2006). Aunque los componentes y concentraciones de ese sistema de cultivo, no son uniformes y varían significativamente entre los diversos estudios, lo que se utiliza de manera

consistente son: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Chaichana *et al.*, 2006).

Las células necesarias para formar cultivos de neuroesferas pueden ser obtenidas de distintas regiones del cerebro embrionario y de zonas específicas del cerebro adulto (Reynolds y Weiss, 1992; Rietze y Reynolds, 2006). Las neuroesferas pueden disociarse y producir varias generaciones de cultivos similares. Además, en el medio de cultivo apropiado, las células se vuelven adherentes, se diferencian y expresan los marcadores de los tres linajes neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Por lo tanto, las células de las neuroesferas satisfacen los criterios de multipotencia y autorrenovación de las células troncales neurales (Ahmed, 2009; Baizabal *et al.*, 2003; Campos, 2004; Deleyrolle y Reynolds, 2009; Liard *et al.*, 2009; Singec *et al.*, 2006).

Las neuroesferas son estructuras dinámicas y complejas, formadas por agregados heterogéneos de pocas células troncales, muchas células progenitoras y en ocasiones, algunas células diferenciadas (Reynolds y Weiss, 1992). En general, las neuroesferas tienen bordes bien definidos con una forma esférica, pero también pueden formar agregados irregulares, ya que no solo derivan de un crecimiento clonal a partir de una célula única, sino que pueden ensamblarse por la unión de células y de diferentes neuroesferas (Mori *et al.*, 2006). Las células formadoras de neuroesferas están interconectadas por complejos de unión débiles (Bez *et al.*, 2003) y tienen capacidad de migración por un proceso dependiente de integrinas (Mori *et al.*, 2006).

Las células formadoras de neuroesferas son diversas en tamaño, contenido citoplásmico y metabolismo; no se encuentran sincronizadas, pues hay células en todas las fases del ciclo celular. Sus características dependen del lugar que ocupan dentro de la neuroesfera; su distribución afecta fenómenos biológicos como la proliferación celular, la sobrevivencia, la apoptosis, la fagocitosis y la transcripción. El grado de actividad metabólica que tiene cada CPN dentro de la neuroesfera depende del acceso a los nutrimentos y al oxígeno del medio de cultivo (Bez *et al.*, 2003). Las neuroesferas grandes tienen centros

oscuros, mientras que las pequeñas son más bien translúcidas. Cuando las neuroesferas crecen, sus centros se tornan más oscuros debido a los eventos necróticos y apoptóticos que ocurren en esa zona, probablemente por la reducción del oxígeno y del aporte nutricional proveniente del medio (Bez *et al.*, 2003). Por el contrario, la presencia de células viables y de figuras mitóticas es particularmente evidente en las células de las capas más externas de las neuroesferas, donde hay una alta transcripción y síntesis de proteínas, debido al fácil intercambio de nutrientes y metabolitos (Bez *et al.*, 2003).

La neuroesfera no es una estructura estática, sino un conjunto de CPN que forman una unidad biológica tridimensional, donde únicamente una pequeña fracción de las CPN formadoras de neuroesferas corresponde a CTN reales (Reynolds y Weiss, 1992). Los cálculos de Reynolds y Rietze (2005) sugieren que hay cerca de 2.4% de CTN en un cultivo de neuroesferas, estimación derivada de las tasas de crecimiento de los cultivos. Sin embargo, bajo ciertos modelos el número de neuroesferas se considera como representativo del número de CTN presentes en un cultivo (Campos, 2004; Reynolds y Rietze, 2005).

Factores que influyen la homeostasis de las CPN

Las células troncales neurales *in vivo* regulan su autorrenovación y la coordinan con la supervivencia y la diferenciación, lo cual evita su pérdida o su proliferación excesiva. Cuando se realizan cultivos de CPN, las concentraciones y tipo de factores añadidos al medio deben ser evaluados cuidadosamente para conocer su papel en el adecuado crecimiento de poblaciones de células específicas en división (Nelson *et al.*, 2008). La influencia de diversos factores y de moléculas sobre la viabilidad, la proliferación y la multipotencialidad de las CPN ha sido extensamente examinada (Chaichana *et al.*, 2006; Tropepe *et al.*, 1999).

Varias moléculas extracelulares, incluidos factores de crecimiento, aminoácidos y neurotransmisores, regulan la proliferación de las CPN (Cameron

et al., 1998). Aunque la formación de neuroesferas se mantiene principalmente por dos mitógenos, los factores de crecimiento EGF y FGF2, la capacidad de respuesta de las CPN depende también de otros factores (Ciccolini, 2001; Tropepe *et al.*, 1999).

La etapa de desarrollo de la que se obtienen las CPN, influye en su respuesta a los factores de crecimiento. Desde el establecimiento de la placa neural hay células que expresan el FGFR y responden a FGF2; más adelante, en el transcurso del desarrollo surge la población que responde a EGF. En un medio libre de suero, las CPN aisladas alrededor del día 8.5 embrionario proliferan en respuesta a FGF2, pero solo responderán a EGF si se aíslan de estadios posteriores. Las CPN que responden a FGF, localizadas en etapas tempranas del desarrollo, más tarde darán origen a las CPN sensibles a EGF (Tropepe *et al.*, 1999).

La densidad de las CPN en cultivo también influye en la proliferación. Por un lado, en los cultivos a baja densidad, hay una mayor proliferación con el FGF2 que con el EGF, mientras que la suma de esos factores tiene un efecto sinérgico. Por otro lado, la máxima proliferación de las CPN ocurre en los cultivos a alta densidad en presencia de ambos factores de crecimiento. Esto sugiere que la proliferación es posiblemente regulada por los contactos entre las células, independientemente de la señalización de FGF y EGF (Tropepe *et al.*, 1999).

La región del SNC de la que se extraen las células para los cultivos de CPN determina su comportamiento *in vitro*. Desde el establecimiento de la placa neural, las CPN se especifican gracias a moléculas especializadas, organizadas en gradientes llamadas morfógenos, los cuales brindan identidad posicional a las CPN y comprometen su potencial de diferenciación a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral (Ulloa y Briscoe, 2007).

Los estudios en los que aíslan y expanden a las CPN *in vitro*, utilizan diferentes tipos y concentraciones de factores de crecimiento; generalmente las concentraciones de EGF y FGF2 se añaden en un intervalo de 10 a 50 ng/mL,

solos o combinados. Otros emplean LIF (factor inhibidor de leucemia) para mantener la proliferación a pases tardíos (superiores al pase 40). También se reporta el uso de hormonas como la insulina y la progesterona, y de otros componentes como la heparina, la glutamina, la transferrina, la selenita y la putresina; la heparina es ampliamente usada, por su acción en la regulación de la afinidad entre el receptor FGFR1 y el factor FGF2 (Chaichana *et al.*, 2006; Ornitz y Leder, 1992).

La diferenciación de las CPN

Las CPN pueden detener la proliferación e iniciar la diferenciación cuando se cultivan, en el medio apropiado, lo cual modifica la expresión de algunas de sus proteínas. Durante este proceso disminuye la expresión de nestina y aumenta la expresión de los transcritos específicos de células maduras. También ocurren cambios morfológicos: las células se adhieren, se aplanan, desarrollan filopodios y aumentan su migración (Schwindt *et al.*, 2009).

Las CPN aisladas y expandidas en cultivos de neuroesferas, incluso por largos periodos, retienen la capacidad de diferenciación hacia células gliales o neurales; sin embargo siguen un patrón en el cual durante los primeros pases de los cultivos pueden producir más neuronas, en comparación con los cultivos de pases avanzados que producen más células gliales (Nelson y Svendsen, 2006; Wright *et al.*, 2006). También las proporciones de cada tipo celular generado durante el proceso de diferenciación cambian en función de la concentración y tipo de factores empleados durante el cultivo de neuroesferas (Tropepe *et al.*, 1999).

Cuando las neuroesferas intactas se siembran en un medio de diferenciación, las CPN pasan por una ronda final de división celular; luego se observa el primer pico de neurogénesis al tercer día. Los niveles de FGF2 en un cultivo de diferenciación, caen a niveles muy bajos durante los primeros 5 días de cultivo, pero a partir del día 7, cuando las células se encuentran en estadios tardíos de su diferenciación, las células secretan grandes cantidades de ese

factor (Nelson y Svendsen, 2006). Así el FGF2 es un factor que promueve la proliferación de CPN y la adquisición de destino celular (Palmer *et al.*, 1999), por lo que es importante tanto en la proliferación de células precursoras, como en la diferenciación hacia neuronas, tanto en el cerebro en desarrollo como *in vitro* (Ciccolini y Svendsen, 1998).

Las CTN y la terapia de reemplazo neural

Las únicas células troncales que actualmente se utilizan de forma clínica son las hematopoyéticas, en el tratamiento de leucemias, y las mesenquimales, en casos ortopédicos. A la fecha no existe otro tipo de célula troncal que se utilice en procesos terapéuticos. Sin embargo los avances en la utilización de las células troncales en terapias clínicas, se favorecen de los conocimientos obtenidos por los estudios en los diversos tipos de células troncales.

La evidencia de neurogénesis en el cerebro adulto y la posibilidad del aislamiento y la manipulación de las CTN *in vitro*, trajo algunas perspectivas para la terapia celular y la regeneración neural como posibilidad para reparar los daños funcionales originados por muerte o disfunción neuronal debido a enfermedades, traumatismos o por el envejecimiento. La terapia celular con CTN se refiere a su uso para sustituir a las células dañadas y restaurar la función del SNC, mientras que la regeneración consiste en promover la restauración o reemplazo de las estructuras dañadas parcial o totalmente (Gage, 2000).

Las CTN podrían contribuir a la restauración celular y funcional a través de dos mecanismos. El primero es por el reemplazo de las células neurales perdidas, mediante el trasplante directo de las CTN o de las células ya diferenciadas (particularmente neuronas especializadas). La segunda opción es por el aporte de factores tróficos que apoyen a las CTN endógenas en el sitio dañando y rescaten o regeneren el tejido (Goldman, 2005). Hasta ahora, las limitantes se detectan en dos vertientes: la baja supervivencia de las células implantadas y la capacidad restringida de la diferenciación hacia neuronas, que además sean capaces de desarrollar sinapsis funcionales (Lu *et al.*, 2008).

Diversos datos publicados sugieren que las CTN trasplantadas a una región del SNC que normalmente carece de neurogénesis, no sobreviven debido a la ausencia de un nicho apropiado; adicionalmente un gran número de CTN se diferencian hacia células gliales luego de ser implantadas (Cao *et al.*, 2001; Lepore *et al.*, 2004). Asimismo cuando la neurogénesis y la gliogénesis endógena ocurren luego de lesiones traumáticas, hemorrágicas o isquémicas, la reparación del SNC no es eficiente debido al microambiente desfavorable que existe (Chirumamilla *et al.*, 2002; Sgubin *et al.*, 2007; Takasawa *et al.*, 2002). Estas observaciones señalan el interés de profundizar en la búsqueda de la composición del medio de cultivo ideal para la expansión y diferenciación de las CPN *in vitro*, así como a la mejoría de las condiciones en la regeneración autónoma.

La taurina

La taurina es un aminoácido muy abundante en las células animales, particularmente en los tejidos excitables; se encuentra libre en el citosol y no forma parte estructural de las proteínas. El nombre de la taurina deriva de su identificación inicial en la bilis del toro en 1838. En 1968, Jacobsen y Smith describieron que la taurina participaba en la síntesis de sales biliares y en la regulación osmótica de los invertebrados marinos (Jacobsen y Smith, 1968). El estudio sobre la taurina progresó, pero hasta la fecha, no se conocen completamente los mecanismos que subyacen a algunos de sus efectos, especialmente durante el desarrollo del sistema nervioso central.

La distribución y el contenido de la taurina en las especies y los tejidos

En las plantas y las semillas la taurina está prácticamente ausente o en cantidades traza. Algunas algas marinas, contienen concentraciones altas de taurina, aunque varía entre las especies. En los animales la taurina está presente en todas las especies. Entre los invertebrados, los artrópodos marinos y los moluscos, tienen concentraciones de taurina muy altas; los insectos contienen taurina, principalmente en el sistema nervioso, donde es el aminoácido más abundante. La taurina también es abundante en los peces y en las aves, mientras que los reptiles tienen una menor concentración. En los mamíferos, la taurina es casi ubicua y con concentraciones en el rango milimolar (Kataoka y Ohnishi, 1986; Schafer *et al.*, 1988; Spitze *et al.*, 2003) (**tabla I**).

La taurina se encuentra también en el humano; un individuo de 70 kg contiene en promedio 70 g de taurina en su cuerpo, aunque puede variar dependiendo de la dieta consumida (Huxtable, 1992). En una misma especie, los niveles de taurina difieren considerablemente entre los tejidos y los estadios de desarrollo. Las concentraciones más altas, se encuentran en el corazón, el cerebro y los músculos esqueléticos. El corazón concentra el 60% del contenido total de taurina del cuerpo; mientras que el cerebro registra las concentraciones más altas de taurina durante el desarrollo, cuando las concentraciones de otros

aminoácidos tienden a ser bajas. En el cerebro adulto en general, las concentraciones son bajas aunque varían dependiendo de la región (Miller *et al.*, 2000).

En el sistema nervioso de todos los animales, el contenido de taurina es mayor en la retina que en el cerebro. La retina de los mamíferos contiene más taurina que la de las especies de otras Clases; cerca de 2/3 partes de la taurina de la retina se ubica en el segmento externo de los fotorreceptores (Huxtable, 1992; Pasantes-Morales, 1985). Los bulbos olfatorios, al igual que la retina, tienen un alto contenido de taurina durante la etapa adulta (Miller *et al.*, 2000; Sturman *et al.*, 1975). Otras estructuras con taurina abundante son las glándulas como la pineal, la pituitaria y la neurohipófisis, las cuales contienen niveles superiores a 60 $\mu\text{mol/g}$ de tejido (Crabai *et al.*, 1974; Huxtable, 1992; Lombardini, 1976).

Los eritrocitos representan un caso excepcional respecto al contenido de taurina en las células de los mamíferos, pues durante su desarrollo contienen taurina como el resto de las células animales, pero cuando maduran y eliminan su núcleo, también pierden la taurina (Geminard *et al.*, 2002).

Tabla I. Registros del contenido de taurina
[$\mu\text{mol/g}$ tejido fresco]

Plantas	> 0.01	Camarones	12	Abejas	~ 34.4	Res	2.8 – 4.1
Hongos, líquenes y musgos	0.001 – 0.007	Almejas	33.7 - 49.3	Moscas	37 - 100	Pollo	2.4 – 12.5
Semillas de calabaza	~ 0.013	Cangrejos	11.3 - 75.5			Pavo	6.25 – 9.19
Nueces y almendras	~ 0.046	Peces Rubia	~ 83	Venado	11.6 – 12.1	Borrego	1.02-4.07
Frijoles negros	~ 0.005	Tilapias	~ 9.1	Ranas	~ 0.005	Conejo	2.78 – 3.19
		Truchas	~ 48.7			Cerdo	0.73 – 16.6
Algas		Pulpo	20.8 – 36.1			Lácteos*	
Rhodophytas	0.98 – 1.24					- Queso	~ 0.49
-Gelidium sp.	0.193 –					- Helado	~ 0.16
-Grateloupia sp.	0.203					- Leche de vaca	~ 0.83 - 1.6

Datos de: Kataoka y Ohnishi, 1986; Huxtable 1992 y Spitzte *et al.*, 2003. * $\mu\text{mol/mL}$

El contenido de taurina durante el desarrollo del cerebro

El cerebro de los mamíferos contiene taurina en concentraciones milimolares (mM). Durante el paso de la etapa embrionaria hacia la etapa adulta, la taurina disminuye en el cerebro de 3 a 5 veces; este patrón se registra en diferentes especies, sin importar las diferencias en las concentraciones iniciales propias de cada especie (Agrawal *et al.*, 1971; Chanda y Himwich, 1970; Miller *et al.*, 2000; Sturman y Gaull, 1975). Por ejemplo, la concentración de taurina en el cerebro de los roedores aumenta rápidamente durante la gestación, alcanza un máximo al nacimiento; en neonatos es alta, luego baja durante el estadio postnatal a juvenil y llega a un nivel reducido en el cerebro adulto (Oja *et al.*, 1968). Un patrón similar existe en los cerebros de monos *Rhesus*, en los que la concentración de taurina en el lóbulo occipital disminuye linealmente respecto al aumento en edad (a partir de los 9 meses) (Sturman y Gaull, 1975).

El primer reporte acerca de la concentración de taurina en el cerebro humano data de 1960, cuando se determinó la concentración de taurina en dos cerebros fetales humanos de 5 y 8 meses de gestación y en un cerebro humano adulto *post-mortem* (Okumura *et al.*, 1960). Luego, Sturman y Gaull midieron la concentración de taurina del lóbulo occipital de cerebros fetales humanos del segundo trimestre de gestación y la de cerebros de adultos; aunque el número de registros fue pequeño, el patrón de cambio durante el desarrollo concuerda con lo observado en otras especies (Sturman y Gaull, 1975).

La gran cantidad de taurina de los cerebros fetales y neonatos deriva del aporte materno, ya que las células inmaduras del sistema nervioso carecen de las enzimas responsables de la producción de taurina (Oja *et al.*, 1973; Rassin *et al.*, 1981). Los animales en gestación adquieren la taurina de la madre a través de la placenta, la cual contiene altas concentraciones de taurina, betaina y creatina (Miller *et al.*, 2000). El acceso de la taurina a las células del cerebro en desarrollo se comprueba con ensayos donde se administra taurina ³⁵S a hembras gestantes de monos *Rhesus* y posteriormente se detecta en el cerebro de los monos neonatos (Rassin *et al.*, 1981).

En la etapa postnatal, prácticamente toda la taurina se adquiere de la leche materna (Sturman *et al.*, 1977). Los estudios en roedores y monos *Rhesus* postnatales muestran que los cambios en la ingesta de la leche materna se correlacionan con los niveles de taurina; en consecuencia, durante el destete los niveles disminuyen significativamente (Sturman y Gaull, 1975).

La dieta provee la mayor cantidad de la taurina presente en los tejidos de los mamíferos adultos. El hígado es el primer órgano que responde al influjo de los aminoácidos derivados de los alimentos y desempeña un papel crítico en el depósito y regulación de sus niveles en el plasma y en los tejidos no hepáticos. El hígado libera a la taurina hacia el torrente sanguíneo, a través del cual circula y se distribuye hacia diferentes tejidos, donde sus niveles son regulados por un mecanismo de captura específico. La taurina no utilizada por las células es removida por el riñón y excretada en la orina (Stipanuk, 2004). Cuando se altera la ingesta de taurina, el metabolismo responde con modificaciones en las tasas de recambio más que con cambios en las concentraciones de taurina típicas de los tejidos (Sturman y Gaull, 1975; Sturman *et al.*, 1975).

La síntesis de taurina

La taurina es el último producto del metabolismo de la metionina (Sturman *et al.*, 1987). Gran parte de los conocimientos sobre la biosíntesis de la taurina se derivan de las investigaciones en roedores. La medida de la capacidad metabólica para sintetizar taurina en diferentes tipos celulares muestra que los hepatocitos tienen la mayor capacidad de biosíntesis (Bella *et al.*, 2002; Stipanuk, 2004).

La vía más aceptada para la síntesis de taurina es la ruta que involucra a la cisteína dioxigenasa (CDO), la cisteína sulfinato-descarboxilasa (CSD) y la hipotaurina deshidrogenasa. Estas tres enzimas catalizan la conversión secuencial de la cisteína hacia la taurina (**figura III**). Mediante esta vía, el cerebro

adulto sintetiza solo una parte de la taurina que contiene (Oja y Kontro, 1981; Stipanuk, 2004).

Aunque las enzimas implicadas en la síntesis de la taurina han sido purificadas y clonadas, su funcionalidad en las células cerebrales *in vivo* está en controversia (Dominy *et al.*, 2004). Estudios en astrocitos *in vitro* muestran su capacidad de sintetizar taurina; por ejemplo, en cultivos de astrocitos de ratas neonatas, la síntesis de taurina va de 80 a 300 nmoles/mg proteína y la variabilidad se debe a la región de la cual se extraen las células (Lehmann y Hansson, 1987). La gran concentración de hipotaurina en astrocitos sugiere una robusta capacidad de síntesis de taurina; sin embargo, la evidencia más contundente es la capacidad de los astrocitos de convertir a la cisteína³⁵S en taurina³⁵S (Beetsch y Olson, 1998). Adicionalmente, se ha demostrado que los astrocitos expresan a las proteínas CDO y CSD (Beetsch y Olson, 1998; Reymond *et al.*, 1996). Las investigaciones revelan que aproximadamente el 22.5 % del contenido de taurina en los astrocitos deriva del proceso de la síntesis (Brand *et al.*, 1998).

Las neuronas también contienen taurina pero, a diferencia de las células gliales, contienen poco o nada de hipotaurina (Olson y Li, 2000). En los cultivos de neuronas, la taurina aumenta solo si se añade hipotaurina al medio o cuando se siembran en un medio condicionado con astrocitos. Además, en las neuronas no se han encontrado todas las enzimas de la vía de síntesis de la taurina (Parsons *et al.*, 2001). Se concluye entonces que el contenido de taurina en las neuronas depende de la hipotaurina o de la taurina exportada desde los astrocitos (Almarghini *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1998).

La dinámica de la síntesis de la taurina en el cerebro varía entre las especies, lo cual se refleja en las diferencias en los niveles de expresión de las enzimas encargadas de la síntesis de la taurina y en el contenido de cisteína en las células (Dominy *et al.*, 2004). Asimismo, la síntesis cambia durante el desarrollo del cerebro, es muy baja durante la gestación, se incrementa lentamente hasta el nacimiento y alcanza los niveles más altos en el adulto

(Rassin *et al.*, 1981). Aún así, debido a una síntesis promedio insuficiente, las células obtienen la mayor parte de su taurina de la dieta y la incorporan por un mecanismo de transporte específico, el cual desempeña un papel esencial en el mantenimiento de las pozas intracelulares de taurina (Tappaz *et al.*, 1992).

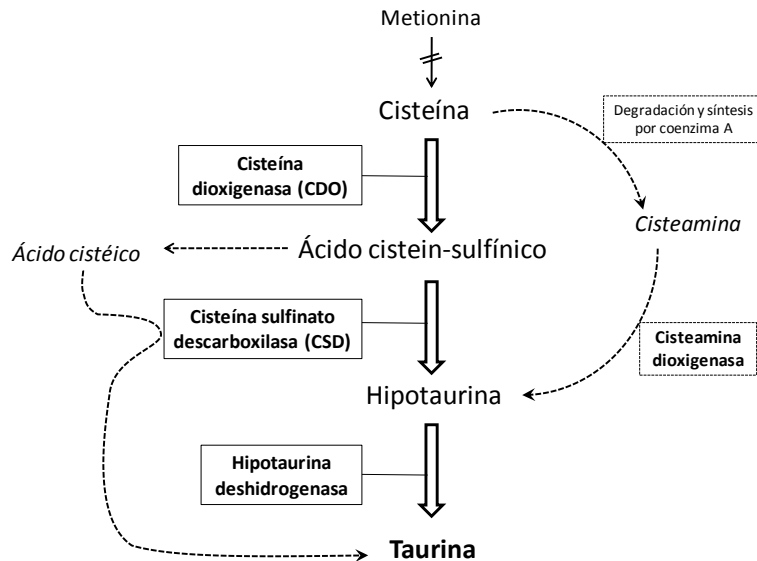


Figura III. La síntesis de la taurina. La taurina se sintetiza desde la cisteína mediante las acciones secuenciales de las enzimas cisteína dioxigenasa (CDO, la cual produce al cisteinsulfinato), la enzima cisteína-sulfinato-descarboxilasa (CSA, la cual descarboxila el cisteinsulfinato hacia hipotaurina) y la hipotaurina deshidrogenasa (que oxida la hipotaurina hacia la taurina). En el sistema nervioso se han propuesto dos vías alternativas para la síntesis de la taurina: la vía de la cisteamina dioxigenasa y la vía del ácido cistéico. La vía de la cisteamina dioxigenasa contribuye poco en condiciones fisiológicas, debido a que sus concentraciones son menores (en dos órdenes de magnitud) que las concentraciones de la cisteína dioxigenasa (CDO). La ruta del ácido cistéico ocurre en el tejido cerebral cuando el ácido cistéico, sintetizado a partir de la cisteína, se descarboxila hacia la taurina por la vía CSAD (Dominy *et al.*, 2004; Peck y Awapara, 1967).

El transportador de taurina

El transportador de taurina (TauT) pertenece a la familia de los transportadores dependientes de la energía derivada del gradiente transmembranal del Na^+ ; dentro de esta familia se incluyen a los transportadores de GABA, glicina y glutamato (Liu *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992). Todos los miembros de esta familia son proteínas con 12 dominios transmembranales, con los extremos -N y -C terminales expuestos hacia el citosol, donde se ubican sitios de fosforilación para la regulación de su expresión (Voss *et al.*, 2004). El TauT presenta dos

variantes, TauT1 y TauT2, ambas con una alta afinidad por la taurina y una baja capacidad de transporte (Fujita *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2004).

El TauT se distribuye ampliamente en los tejidos de diversos animales, en etapa embrionaria y adulta (Magnusson, 1996; Nagelhus *et al.*, 1993; Pow *et al.*, 2002). En el sistema nervioso central de los mamíferos, la caracterización funcional del transportador de taurina está reportada para las neuronas (Fujita *et al.*, 2006; Schousboe *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992), los astrocitos (Larsson *et al.*, 1986; Sanchez-Olea *et al.*, 1991) y en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Kang *et al.*, 2002; Lee y Kang, 2004).

Las funciones de la taurina

La taurina es un β -aminoácido sulfónico que no forma parte de las proteínas. Es impermeable a las membranas biológicas, lo que permite que la taurina genere gradientes de concentración elevados. Por ejemplo, para la retina el gradiente de concentración de la taurina es de 400:1 (Pasantes Morales, 1986), para las células cerebrales puede ser de hasta 600:1, mientras que para las células HeLa el gradiente alcanza 7000:1 (Huxtable, 1992). En los mamíferos la taurina se elimina como tal o conjugada como sales biliares, por lo que inicialmente se consideró como un producto de desecho del metabolismo (Huxtable, 1992).

La conjugación de sales biliares

Las sales biliares son detergentes derivados del colesterol, que solubilizan o emulsifican a las grasas (gracias a sus regiones lipofílicas e hidrofílicas) y las hacen más accesibles a la digestión. En todos los vertebrados, la taurina es el aminoácido que conjugado con derivados del colesterol forma sales biliares. Por mucho tiempo, la formación de sales biliares se consideró como la única función de la taurina. Algunos mamíferos además de taurina usan glicina, para producir el taurocolato y el glicolato, respectivamente. El taurocolato es la sal biliar más eficiente. Los mamíferos carnívoros tienden a ser exclusivos conjugadores de taurina. Los humanos producen taurocolato y glicolato en una proporción 3:1,

aunque la proporción varía entre los individuos y está en función de la disponibilidad de taurina adquirida por la dieta (Chen *et al.*, 2012; Vessey, 1978).

La taurina como osmolito orgánico

En las células animales, las alteraciones en el volumen celular ocurren debido a la permeabilidad de las membranas al agua y como consecuencia de un desbalance osmótico. Las células corrigen los cambios en su volumen, ya que de no hacerlo, los aumentos o las reducciones de tamaño provocarían cambios en la concentración de las moléculas que afectarían a los procesos bioquímicos, el metabolismo celular y la comunicación intercelular; en casos extremos, dañarían la integridad de la membrana y el citoesqueleto. Por lo que la regulación del volumen celular es importante para mantener la homeostasis de las células animales. (Lang, 2007; Pasantes-Morales y Cruz-Rangel, 2010). A diferencia de las células animales, en las células vegetales, los cambios osmóticos pueden ser ignorados gracias a la pared celular rígida (Huxtable, 1992).

Los osmolitos son solutos citoplasmáticos que contribuyen a la osmolaridad celular; pueden ser moléculas orgánicas o inorgánicas. En los mamíferos, los osmolitos inorgánicos contribuyen de forma predominante a la osmolaridad de las células (60–70%), mientras que los osmolitos orgánicos lo hacen en menor medida (20–25%); ambos tipos de osmolitos son osmóticamente activos y participan en la regulación del volumen (Pasantes-Morales *et al.*, 2000; Yancey, 2004). Ante un cambio en la presión osmótica, las células movilizan rápidamente a los osmolitos inorgánicos (como los iones Cl^- , K^+ y Na^+), pero esta movilización repercute en el equilibrio del potencial membranal, lo cual es crítico especialmente en las células excitables, por lo que esta movilización solo puede ser un fenómeno transitorio (Pasantes-Morales *et al.*, 2000; Pasantes-Morales *et al.*, 2006; Yancey, 2004). A diferencia de los iones, los osmolitos orgánicos interfieren en menor medida con el metabolismo y en algunos casos, contrarrestan los efectos desestabilizantes producto de la movilización de los osmolitos inorgánicos (Lang, 2007). Los osmolitos orgánicos se clasifican en tres categorías: polioles (sorbitol, mio-inositol), aminoácidos

libres (taurina, glutamato) y metilaminas (glicerofosforilcolona, creatina, betaina); pero los tipos y proporciones de dichos solutos varían entre los tejidos, donde además pueden desempeñar funciones no osmóticas (Miller *et al.*, 2000).

La taurina se considera un osmolito regulador ideal, pues es una molécula muy sensible a la perturbación osmótica, ya que se moviliza y cambia rápidamente su concentración citosólica, ante los cambios de la osmolaridad extracelular (estrés hiposmótico o hiperosmótico); además los cambios de su concentración no alteran el potencial de membrana. No es una molécula esencial, lo cual evita la interferencia entre una función osmorreguladora y una demanda metabólica. Además, es mínima la energía gastada para su obtención y para mantener los gradientes de concentración transmembranales necesarios para responder a los cambios osmóticos. La importancia de la taurina en la regulación del volumen celular explica, en parte, su presencia ubicua en las células animales y su ausencia en las plantas; por lo cual, su función como osmolito es la más conocida, luego de la síntesis de sales biliares (Huxtable, 1992; Pasantes-Morales *et al.*, 1998; Pasantes-Morales *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2000).

La modulación de la homeostasis del calcio

La taurina se relaciona con muchos procesos dependientes de calcio; los ejemplos más evidentes ocurren en el corazón. El corazón funciona por eventos secuenciales de contracción y relajación, dependientes de la entrada o la salida de calcio citosólico, respectivamente. Hay evidencia de que la taurina actúa como un modulador positivo o negativo de la contracción, en función de la concentración de calcio disponible (subfisiológica o suprafisiológica) y permite la protección contra la paradoja del calcio, la cardiomiopatía por sobrecarga de calcio, la hipertensión y la arritmogénesis (Solaro, 2011; Xu *et al.*, 2008).

En otros tejidos, la taurina podría modular la señalización del calcio mediante una modificación de su disponibilidad, por ejemplo, por un incremento en la capacidad de almacenamiento de calcio en los organelos.

También podría cambiar la sensibilidad de la respuesta al calcio, es decir alterar la afinidad del calcio con sus sitios de unión, lo cual se puede relacionar con su efecto en la estabilización de membranas (Huxtable, 1987; Huxtable y Sebring, 1987).

El efecto estabilizador de membranas

La taurina forma un complejo de baja afinidad con los fosfolípidos neutros en las membranas y podría por lo tanto, modificar las propiedades de la membrana como la arquitectura y la fluidez. La afinidad de los fosfolípidos por la taurina está en el intervalo de sus concentraciones intracelulares, por lo que esos sitios son fisiológicamente relevantes al interior de la célula (Huxtable, 1992).

La interacción de la taurina con los fosfolípidos de la membrana puede relacionarse con su efecto en la modulación del calcio. El calcio se une con alta afinidad a los fosfolípidos ácidos de la membrana (fosfatidilserina y fosfatidilinositol). Así, el efecto de la taurina en la modulación del calcio podría ser consecuencia de las interacciones de la taurina y el calcio con los fosfolípidos neutros y los ácidos, donde la taurina modifica la disponibilidad y la afinidad de los sitios de unión del calcio. La unión de la taurina a los fosfolípidos no se afecta ni se reproduce por la β -alanina o el guanidinoetanosulfonato (moléculas de estructura similar a la taurina e inhibitoras de su transporte) (Huxtable y Sebring, 1987).

Los efectos directos de la taurina sobre la membrana podrían influir en otros fenómenos dependientes de lípidos, tales como: la operación de canales iónicos, la liberación de hormonas y neurotransmisores, la protección de las funciones celulares a bajas temperaturas, la función de las enzimas transmembranales, los efectos anti-agregantes en plaquetas o la resistencia al daño oxidativo (Lombardini, 1985; Schaffer *et al.*, 2009). Si las interacciones de los fosfolípidos y la taurina modifican algunos procesos celulares, se podría esperar una correlación entre la composición de fosfolípidos y la concentración citosólica de la taurina, lo cual podría ser una causa de la variación en las

concentraciones de la taurina entre los tejidos y las etapas de desarrollo (Huxtable, 1992).

Algunos trabajos muestran que la aplicación de taurina, en experimentos de *patch clamp*, en neuronas de ratón en cultivo o en ovocitos de *Xenopus* produce corrientes de cloro de corta duración, las cuales pueden ser inhibidas por estricnina (antagonista de glicina) o por bicuculina (antagonista de GABA). Aunque las corrientes son cortas, si se comparan con las producidas por los agonistas comunes, se propone que las acciones electrofisiológicas de la taurina ocurren a través de su acción sobre los receptores a GABA y glicina (Albrecht y Schousboe, 2005). Sin embargo, algunos autores concluyen que la taurina solo interactúa con el ambiente lipídico cercano a los receptores e incrementa la probabilidad de apertura de los canales. Así el efecto de la taurina en la conductancia del cloro podría ser una consecuencia de su unión a lípidos, más que de una interacción directa con el receptor (Conte Camerino *et al.*, 1989; Huxtable, 1992).

Las posibles interacciones de la taurina con las membranas celulares explicarían la multiplicidad de efectos débiles que tiene sobre las células animales, independientes de su función en la regulación del volumen celular.

La taurina como antioxidante

La oxidación de moléculas orgánicas ocurre a causa de los intermediarios producidos durante la reducción del oxígeno hacia el agua. Esta reacción genera secuencialmente: superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroxilo e hidróxido (conjuntamente llamadas especies reactivas del oxígeno o ROS, del inglés *reactive oxygen species*); los cuales son más reactivos que el oxígeno y son los responsables de su toxicidad (Birben *et al.*, 2012; Moslen, 1994). Los ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares son los componentes más susceptibles a la oxidación, la cual afecta a la fluidez y función de las membranas. Hay evidencia de que la taurina reduce la toxicidad causada por el

estrés oxidativo, pero en muchos casos se desconoce el mecanismo que subyace a la actividad antioxidante (Schaffer *et al.*, 2009).

La única acción antioxidante directa de la taurina es la detoxificación del ácido hipocloroso durante la inflamación (Marcinkiewicz y Kontny, 2012). Sin embargo, no todas las acciones antioxidantes de la taurina ocurren en sistemas dependientes de neutrófilos. De manera general, la taurina es incapaz de actuar directamente como secuestrador de las ROS (Aruoma *et al.*, 1988), por lo que la mayoría de estudios proponen que los efectos de la taurina son indirectos o secundarios a las funciones de la taurina descritas anteriormente (págs. 30-34).

Las posibles acciones indirectas de la taurina que provocarían un efecto antioxidante podrían ser por tres mecanismos: i) la regulación del sistema antioxidante propio de las células, ii) la reducción del daño causado por los oxidantes o iii) la reducción de la producción de los oxidantes. El primer mecanismo sobre la regulación positiva del sistema de defensa antioxidante es apoyado por pocos estudios (Vohra y Hui, 2001), la mayoría de investigaciones sugieren que las acciones de la taurina revierten el daño en lugar de regular las defensas antioxidantes (Rivas-Arancibia *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2004). La taurina podría reducir los efectos de los oxidantes y esta acción se relacionaría con su función en la estabilización de membranas; por ejemplo, los cambios en las membranas mediados por la taurina generarían la resistencia contra el óxido nítrico y la interleucina (Merezak *et al.*, 2001). Otra acción antioxidante posible es inhibir la producción de los oxidantes, algunos trabajos vinculan esta posibilidad con la función de la taurina en la modulación del calcio; por ejemplo, la activación prolongada del receptor NMDA daña a las mitocondrias, lo cual eleva los niveles de ROS (Vesce *et al.*, 2004), en este modelo se propone que la taurina evita la elevación de ROS al prevenir la sobrecarga de calcio (El Idrissi y Trenkner, 1999).

Independientemente del mecanismo de acción, son numerosos los reportes de la actividad antioxidante de la taurina en diversos tejidos donde previene el daño inducido por el ozono, el óxido nítrico, la bleomicina, el

arsénico, la amiradona y el ácido nitropropiónico, entre otros; y se mitiga la peroxidación lipídica inducida por tetracloruro de carbono en los pulmones y la causada por la luz en los segmentos externos de los fotorreceptores (Flora *et al.*, 2008; Giri *et al.*, 1994; Gordon *et al.*, 1986; Nakashima *et al.*, 1983; Pasantes-Morales *et al.*, 1985; Rivas-Arancibia *et al.*, 2000; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1992).

Las acciones de la taurina en el desarrollo del sistema nervioso

La alta concentración de la taurina en el cerebro embrionario, fetal y neonatal de los mamíferos sugiere su participación en el proceso de desarrollo. Sin embargo, hasta la fecha no hay un panorama claro de los mecanismos por los que la taurina ejerce sus acciones en ese proceso, independientemente de sus funciones en el cerebro maduro.

La importancia de la taurina en el desarrollo del sistema nervioso de los mamíferos se evidenció por las investigaciones iniciadas en los años 70's en gatos deficientes de taurina. Los primeros estudios mostraron que ante una reducción considerable del contenido de taurina a causa de una ingesta inadecuada, la retina de los gatos se degenera con la consecuente ceguera del animal (Hayes *et al.*, 1975). Después se demostró que el *tapetum lucidum*, una capa de células ubicada detrás de la retina, también sufría cambios degenerativos tras eliminar a la taurina de la dieta (Wen *et al.*, 1979). Otros estudios mostraron que esa degeneración era consecuencia del daño de las membranas de las células de la retina, con la pérdida subsecuente de la estructura celular (Pasantes-Morales, 1985; Pasantes-Morales y Cruz, 1985a; Pasantes Morales, 1986; Sturman *et al.*, 1981).

Algunos estudios posteriores mostraron que la taurina se requiere para el desarrollo normal del sistema nervioso de los gatos, pues los que nacen de madres alimentadas con dietas sin taurina, presentan defectos en el desarrollo cerebral, los cuales han sido estudiados principalmente a nivel del cerebelo y de la corteza visual (Palackal *et al.*, 1986; Sturman *et al.*, 1985; Sturman, 1993). En

el cerebelo de estos animales, los efectos más evidentes son la persistencia de las neuronas granulares en la capa celular externa, las cuales fracasan en su migración hacia la capa granular interna; así como la presencia de células mitóticas en etapas tardías del desarrollo (Sturman *et al.*, 1985; Sturman *et al.*, 1987). Asimismo, la ontogenia de la corteza visual es anormal debido al retraso en la migración y en la diferenciación de los neuroblastos y glioblastos, los cuales se agregan en las zonas piales y ventriculares (Palackal *et al.*, 1986). La corteza cerebral de estos gatos muestra un patrón de distribución de las neuronas alterado, una baja densidad de los astrocitos en las capas corticales y una arborización escasa de las neuronas piramidales (Sturman, 1993). También presentan una morfología alterada en la médula espinal debido a las conexiones inadecuadas con los nervios y a la reducida proporción de la materia blanca. El conjunto de estos signos patológicos en estos animales causan un cuadro de ataxia (Sturman *et al.*, 1987).

El requerimiento de niveles normales de taurina para el desarrollo cerebral también se documentó en los primates. Los monos *Rhesus* alimentados con una dieta deficiente de taurina mostraron un daño similar al reportado en los gatos en la maduración de la corteza visual (Hayes *et al.*, 1980; Neuringer *et al.*, 1990). La posibilidad de una acción semejante de la taurina en el desarrollo humano llevó a realizar estudios sobre la alimentación en infantes. La medida de los niveles del aminoácido en el plasma y en la orina de los humanos recién nacidos sugiere que tienen un alto contenido de taurina, la cual procede de la madre; mientras que durante la etapa de la lactancia, la concentración de taurina es menor en el plasma y la orina de los infantes alimentados con fórmulas sintéticas (sin taurina), comparada con la de los infantes alimentados con leche materna. A pesar de esto, los infantes no mostraron señales obvias de anormalidades a nivel de la retina, posiblemente a que el humano presenta un recambio muy bajo de la taurina ante una deficiencia y modifica el patrón de conjugación de ácidos biliares (dejan de formar ácido taurocólico y solo producen ácido glicocólico), lo que permite la regulación de las pozas de taurina (Gaulle *et al.*, 1977; Rassin *et al.*, 1977). Sin embargo, las investigaciones posteriores en monos alimentados con fórmulas lácteas sintéticas para humanos

sin taurina evidenciaron cambios degenerativos en los fotorreceptores de la retina, a diferencia de los alimentados con leche materna, lo que llevó a agregar taurina a las fórmulas lácteas para infantes desde finales de los años 80's (Heird, 2004; Neuringer y Sturman, 1987; Sturman *et al.*, 1988).

En experimentos *in vitro*, se ha reportado que las células cerebrales deficientes en taurina tienen defectos en la migración, asociados a cambios en la expresión de las moléculas de adhesión (Maar *et al.*, 1995; Moran *et al.*, 1996); mientras que en cultivos de neuronas fetales humanas suplementados con taurina se registró un efecto trófico que favoreció el crecimiento del cultivo (Chen *et al.*, 1998). Los efectos tróficos y protectores de la taurina se observan en una gran variedad de células y tejidos (Saransaari y Oja, 1994); no obstante, las acciones posibles de la taurina en el desarrollo del cerebro, más allá de la regulación del volumen celular, han sido poco estudiadas.

IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células troncales neurales (CTN) son actualmente un tema de atención en la biología y en la medicina. Su estudio contribuye al conocimiento de los procesos básicos del desarrollo del sistema nervioso central (SNC), así como de la regeneración de las células neurales en la etapa adulta. Aunque se desconocen muchos de los elementos que modulan los procesos biológicos básicos de este tipo de células, su versatilidad funcional *in vivo* y la posibilidad de cultivarlas y manipularlas *ex vivo*, crean expectativas sobre su uso en estrategias terapéuticas de reemplazo celular. A pesar de que una aplicación clínica de las CTN es aún una perspectiva lejana, es importante conocer los factores que las regulan. Una herramienta fundamental para el estudio de las características de las CTN, es la posibilidad de cultivarlas *in vitro*, lo que permite identificar los factores que intervienen en la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de esas células.

La proliferación y la diferenciación de las CTN se regulan por varios factores, en contextos fisiológicos (como ocurre durante el desarrollo) y patológicos (ya que las CTN pueden iniciar mecanismos de reparación ante algunos eventos de daño cerebral) (Sawada y Sawamoto, 2012). La identificación de las moléculas que controlan las actividades de las CTN contribuiría al entendimiento de la ontogenia del sistema nervioso y al desarrollo de propuestas terapéuticas (Sotthibundhu *et al.*, 2010). Los antecedentes sugieren que la taurina podría ser un agente interesante en el contexto de la neurogénesis. Sin embargo, el mecanismo de la acción de la taurina durante el desarrollo del sistema nervioso no está claro. Se sabe que la taurina es necesaria para el óptimo desarrollo del sistema nervioso e induce la proliferación de neuroblastos fetales (Chen *et al.*, 1998; Sturman, 1993); pero no existen datos del papel de la taurina en las células precursoras neurales de etapas tempranas o adultas. Pese a que las CTN embrionarias y adultas están ubicadas en nichos distintos, la taurina es abundante en el cerebro en desarrollo y puede interactuar con las CTN especialmente de la zona subventricular, al ser la taurina un componente del líquido cefalorraquídeo (Samuelsson *et al.*, 2009; Seki *et al.*,

2005; Zappaterra y Lehtinen, 2012). Además, como se mencionó, la neurogénesis en el adulto se puede estimular por condiciones de daño, mismas que incrementan la concentración de taurina en el líquido cefalorraquídeo (Sawada y Sawamoto, 2012; Seki *et al.*, 2005; Stover *et al.*, 1999), lo que hace que las CTN derivadas de la ZSV de adultos sean de interés para esta investigación, comparadas con las CTN de otras regiones neurogénicas.

Esta investigación plantea la posibilidad de conocer la razón del requerimiento de la taurina para el desarrollo óptimo del sistema nervioso, con base en sus efectos y propiedades descritas con detalle en los Antecedentes, mediante el uso de cultivos de células troncales y progenitoras neurales. Es posible que la taurina sea un elemento importante, para la supervivencia y proliferación de las CTN, a través de una acción trófica o indirectamente mediante un efecto protector frente a los elementos lesivos que se generan durante la manipulación de las CTN.

Los resultados del presente trabajo de investigación, pueden ser de interés no solo para el conocimiento básico de las características fundamentales de las células nerviosas durante el desarrollo del SNC, como son la proliferación y diferenciación, sino ante la posibilidad de favorecer un ambiente propicio en el nicho de las CTN endógenas durante la reparación fisiológica. En ese contexto, este estudio puede aportar elementos para conocer el papel de la taurina en el desarrollo del sistema nervioso a partir de los efectos observados en las CTN; pero también puede contribuir a establecer las condiciones óptimas para la expansión *in vitro* de las CTN para su utilización posterior y ayudar a la definición del nicho óptimo.

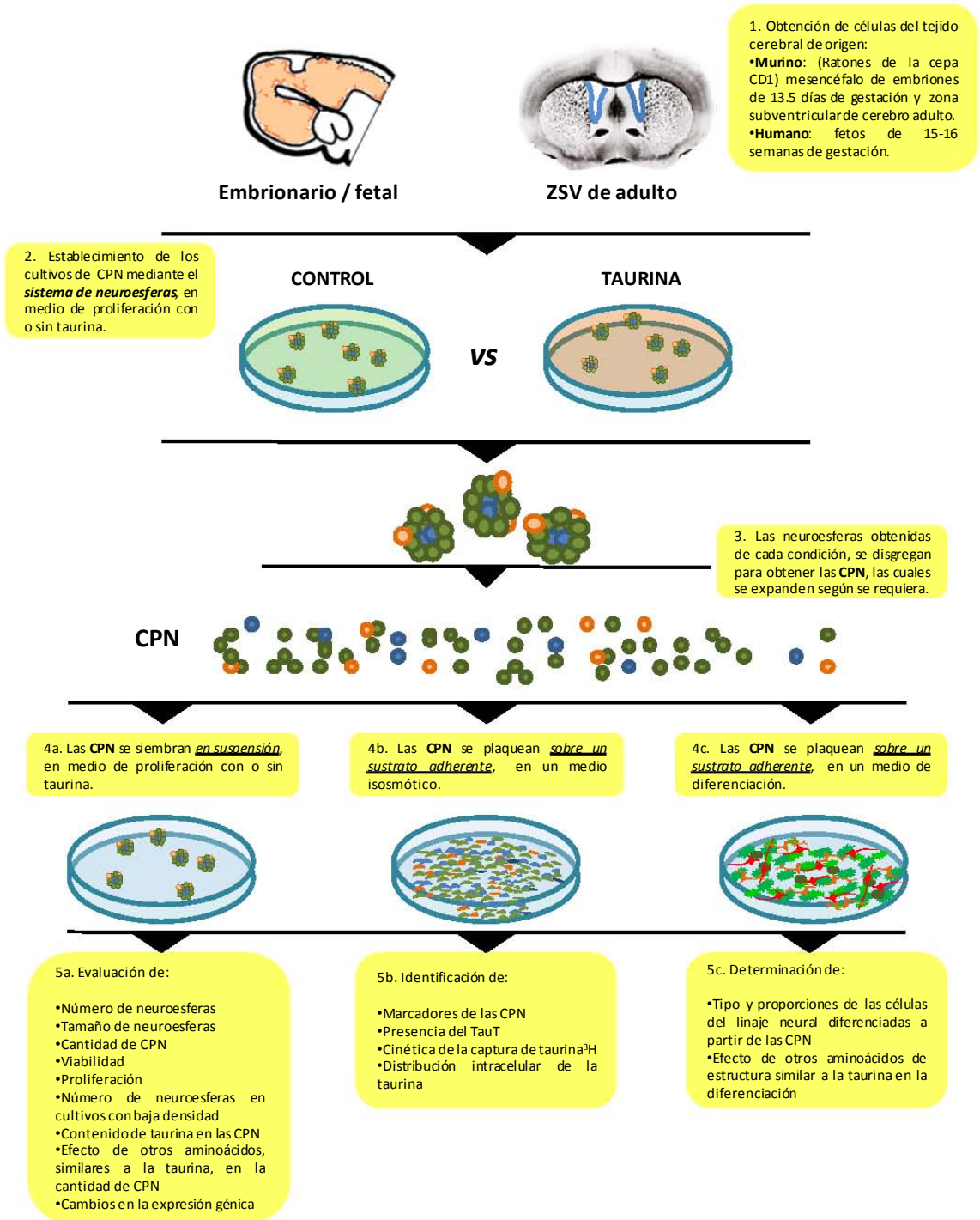
V. OBJETIVO

Investigar la influencia de la taurina en la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células troncales y progenitoras neurales de origen embrionario, fetal y adulto, con el propósito de explicar el requerimiento de la taurina para el desarrollo óptimo del cerebro y optimizar el manejo de esas células.

Objetivos Específicos

- Establecer los cultivos de CPN en la modalidad de neuroesferas, a partir de células aisladas de: i) el cerebro embrionario de ratones de 13.5 días, ii) la zona subventricular de cerebros de ratones adultos y iii) el cerebro fetal humano.
- Evaluar el efecto de la taurina sobre el número de CPN generadas en los cultivos.
- Determinar si la taurina modifica la viabilidad o la proliferación celular.
- Definir si la taurina ejerce su efecto en las células troncales o en las células progenitoras que conforman las neuroesferas.
- Medir el contenido de taurina en las CPN a través de las distintas etapas del cultivo. Comparar con el contenido de taurina en las células aisladas de los tejidos de los cuales derivan las CPN.
- Identificar la presencia, la funcionalidad y los componentes del mecanismo de acumulación de taurina en las CPN. Determinar si las células expresan el transportador TauT. Caracterizar el mecanismo de transporte de taurina en cuanto a sus propiedades cinéticas, su capacidad y su especificidad.
- Evaluar si la taurina afecta la multipotencialidad de las CPN o modifica las proporciones de linajes diferenciados de ellas.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



Los materiales y protocolos utilizados en esta investigación se detallan en las páginas 111-112, 120-121, 134-136 y 142-143.

VII. RESULTADOS

1. La taurina aumenta la proliferación de las células precursoras neurales del cerebro embrionario de ratón.

J Neurosci Res (2010) 88, 1673-1681

El cultivo de neuroesferas embrionarias y la caracterización de las CPN

Las células obtenidas del mesencéfalo de embriones de ratón CD1 de 13.5 días de gestación¹, se sembraron en un medio libre de suero con factores de crecimiento (20 ng/ mL) y taurina (10 mM) en las combinaciones: i) EGF+FGF2, ii) EGF, iii) EGF+FGF2+taurina y iv) EGF+taurina. Después de cinco días en cultivo se observaron los agregados de células en suspensión que caracterizan a las neuroesferas (fig. 1.1). A partir de las neuroesferas primarias, se cultivaron neuroesferas secundarias, las cuales se mantuvieron y utilizaron entre el segundo y sexto pase. Las células formadoras de neuroesferas en todas las condiciones fueron positivas al marcador nestina (entre un 94% y 97%) y por lo tanto consideradas como células precursoras neurales (CPN). La proporción de células positivas a nestina, no se afectó por la presencia de taurina.

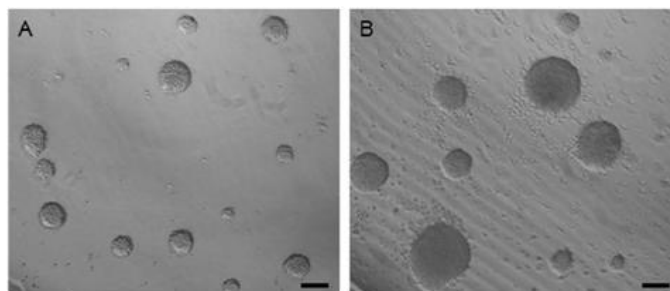


Figura 1.1. La morfología representativa de las neuroesferas embrionarias murinas. Las neuroesferas se derivaron de células aisladas del mesencéfalo de embriones de ratón CD1 de 13.5 días de gestación. **A.** Neuroesferas generadas en presencia de EGF y FGF2 (20ng/mL c/u). **B.** Neuroesferas formadas en presencia de los dos factores más taurina (10mM). Las fotografías se capturaron con un aumento 4x; barra de escala = 100µm.

¹ Todos los ratones utilizados en este estudio se adquirieron y manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana vigente: NOM-062-ZOO-1999.

El efecto de la taurina en los cultivos de neuroesferas primarias

En los cultivos control, el mayor número de neuroesferas se obtuvo con los dos factores de crecimiento (EGF+FGF2, 233 neuroesferas vs EFG, 195 neuroesferas) y la diferencia más evidente se observó en el volumen de las neuroesferas, pues las formadas con EGF solo alcanzaron $180 \mu\text{m}^3 \times 10^3$, mientras que las generadas con los dos factores tuvieron un volumen tres veces mayor ($653 \mu\text{m}^3 \times 10^3$) (fig. 1.2B). De acuerdo con estos resultados, la cantidad de CPN fue mayor en la condición con dos factores: EGF+FGF2, 3000×10^3 células vs EFG, 900×10^3 células (véanse barras blancas, fig. 1.2C). El efecto de añadir la taurina (10mM) al medio de cultivo fue evidente tanto en las neuroesferas crecidas con EGF+FGF2 o solo con EGF. La taurina aumentó el tamaño de las neuroesferas, lo cual se reflejó en el número de CPN que incrementó un 38% en la condición EGF+FGF2+taurina y un 43% en la condición EGF+taurina. El número de neuroesferas no aumentó en ninguna de las condiciones (véanse barras negras, fig. 1.2). En ausencia de los factores de crecimiento, la taurina no logró la formación de neuroesferas (datos no mostrados).

La viabilidad y proliferación de las CPN en respuesta a los factores de crecimiento

La viabilidad se evaluó por la exclusión de azul tripano y la proliferación celular se siguió por la incorporación de BrdU. Estos parámetros se determinaron diariamente (entre los días 1-5) en los cultivos primarios y secundarios. En los cultivos primarios, la viabilidad y la tasa proliferativa de las CPN fueron significativamente mayores cuando las neuroesferas crecieron en presencia de los dos factores de crecimiento, en comparación con las crecidas con solo el EGF. Los cultivos secundarios presentaron una viabilidad superior a la de los cultivos primarios; mientras que la tasa proliferativa no presentó diferencias independientemente del uso de uno o de ambos factores de crecimiento (fig. 1.3).

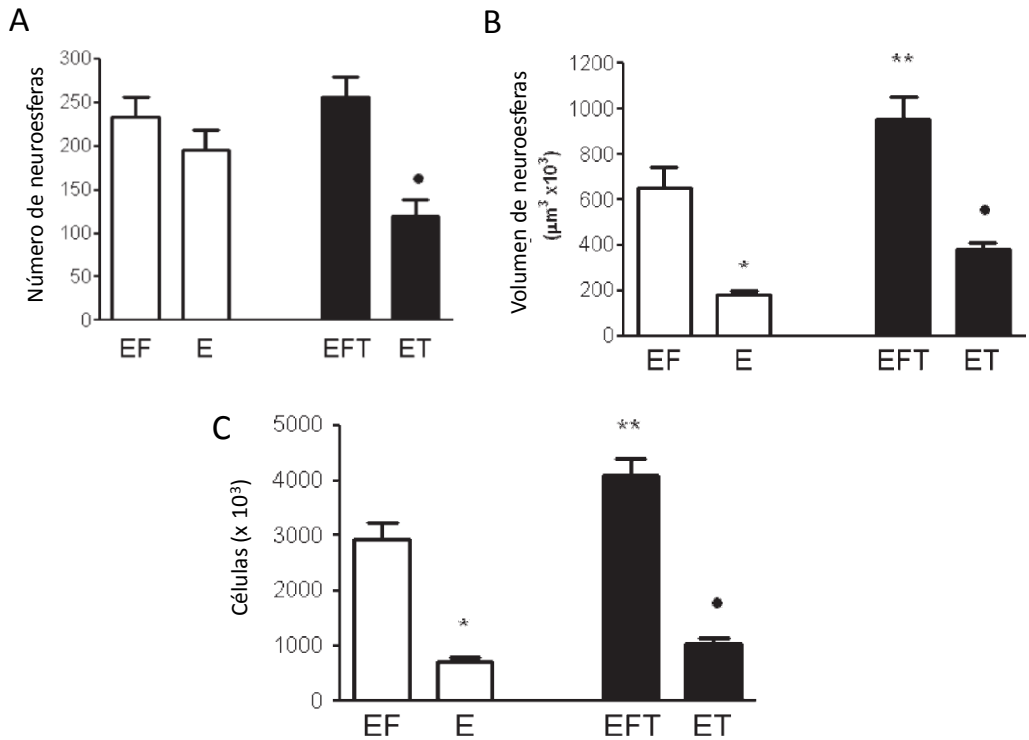


Figura 1.2. El efecto de la taurina en los cultivos primarios de las CPN embrionarias murinas. Las neuroesferas se formaron a partir de las células aisladas del mesencéfalo embrionario y sembradas en un medio de proliferación con los factores de crecimiento EGF+FGF2 (EF) o solo con EGF (E), en ausencia (barras blancas) o presencia de taurina (barras negras) **A.** Número de neuroesferas. **B.** Volumen de las neuroesferas. **C.** Número de las CPN. Los parámetros se determinaron tras cinco días en cultivo. El número de neuroesferas se contó en fotografías de cada una de las condiciones y el volumen de neuroesferas se midió con el programa ImageJ®. El número de CPN se evaluó, luego de la disgregación mecánica de las neuroesferas, en la cámara de Neubauer. Los valores son promedios \pm EE de 12 experimentos. Las diferencias significativas se determinaron con un ANDEVA de dos vías, $P < 0.05$ en EF vs E (*), EF vs EFT (**), y E vs ET (•).

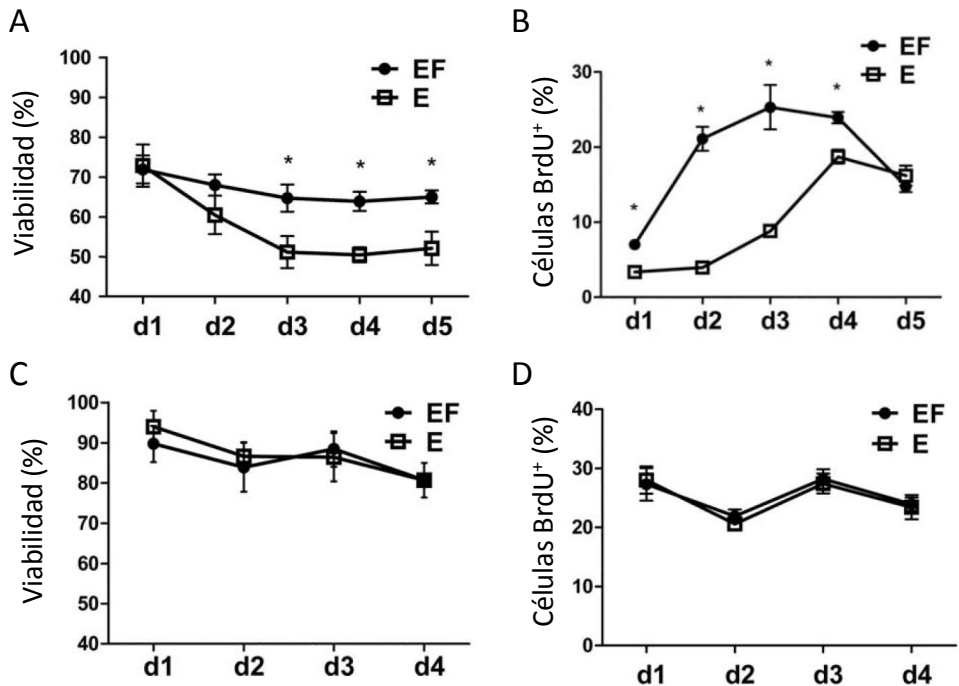


Figura 1.3. La viabilidad y la proliferación de las CPN embrionarias en los cultivos primarios y secundarios de neuroesferas. La viabilidad se determinó por el ensayo de exclusión de azul tripano, luego de disgregar las neuroesferas en los tiempos indicados (d=día). La proliferación celular se siguió por la incorporación de BrdU tras un pulso de 10 μ M por 2 horas, en los días señalados. La identificación de las células que incorporaron al nucleótido se realizó mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU [1:200]. En **A** y **B**, los cultivos primarios. En **C** y **D**, los cultivos secundarios. Los resultados de viabilidad se expresan como el porcentaje de células que excluyen el azul tripano y los de proliferación como el porcentaje de células positivas a BrdU. Los valores son promedios \pm EE de 4 – 12 experimentos. Las diferencias significativas respecto a los controles se determinaron con una prueba-T, *P<0.05.

Curva dosis-respuesta del efecto de la taurina en el número de las CPN embrionarias

Se cuantificó el número de CPN en los cultivos de neuroesferas generadas en presencia de dos factores más taurina 1, 5, 10, 20 y 30 mM, a los cinco días de cultivo. Esta curva de concentración reveló que la taurina provocó un aumento en el número de CPN cuando se adicionó en el intervalo de 1mM a 20mM; el

máximo efecto fue con la concentración de 10mM y no hubo efecto con la concentración de 30mM (fig. 1.4).

El efecto de la taurina sobre la viabilidad y proliferación de las CPN embrionarias

Se investigó si el incremento en el número de las CPN y en el tamaño de las neuroesferas en presencia de taurina, fue consecuencia de un aumento en la supervivencia o en la proliferación celular. La taurina aumentó la proliferación celular, sin modificar la viabilidad en los cultivos primarios y secundarios. En los cultivos primarios, ya sea con los dos factores de crecimiento o solo con el EGF, la taurina incrementó la incorporación de BrdU hacia los días finales del cultivo (en el cuarto y quinto día). El incremento en la proliferación fue similar en los cultivos secundarios generados con los dos factores; mientras que en los cultivos mantenidos solo por el EGF, la taurina aumentó la proliferación desde el segundo día de cultivo. En términos generales, la magnitud del incremento en la incorporación de BrdU provocado por la taurina fue cercana al 40% independientemente de la combinación de factores utilizada (fig. 1.5).

El efecto de la taurina en los cultivos de neuroesferas secundarias

Los cultivos secundarios derivaron de las neuroesferas primarias disociadas y subcultivadas en las mismas condiciones en cuanto a factores de crecimiento y en presencia o ausencia de taurina. En forma similar a los resultados obtenidos en los cultivos primarios, la adición de taurina a los cultivos secundarios no modificó el número de neuroesferas formadas (fig. 1.6A), pero el tamaño de las neuroesferas en presencia de taurina fue significativamente mayor (fig. 1.6B). El número de CPN en la condición con ambos factores o solo EGF fue prácticamente el mismo ($2000 - 2100 \times 10^3$ células) pero la adición de la taurina incrementó el número de CPN un 25% en EGF+FGF2 y un 62% en EGF (fig. 1.6C).

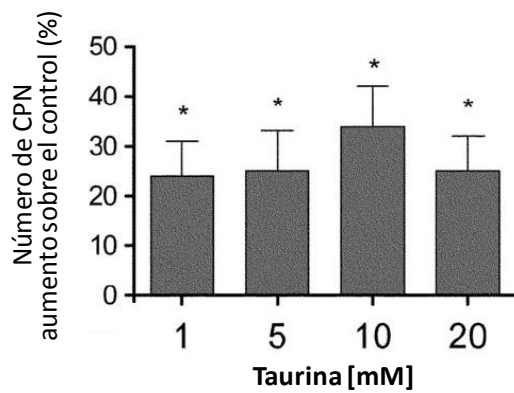


Figura 1.4. El efecto de la concentración de la taurina en el número de las CPN embrionarias. Las neuroesferas se formaron en medio suplementado con EGF+FGF2 más taurina a las concentraciones indicadas. Luego de 5 días de cultivo, las neuroesferas se disgregaron y se cuantificó la cantidad de CPN en la cámara de Neubauer. Las barras representan el porcentaje de incremento en el número de células sobre la condición control. Los valores son promedios \pm EE de 5 experimentos. Las diferencias significativas respecto al control se determinaron con $*P < 0.05$.

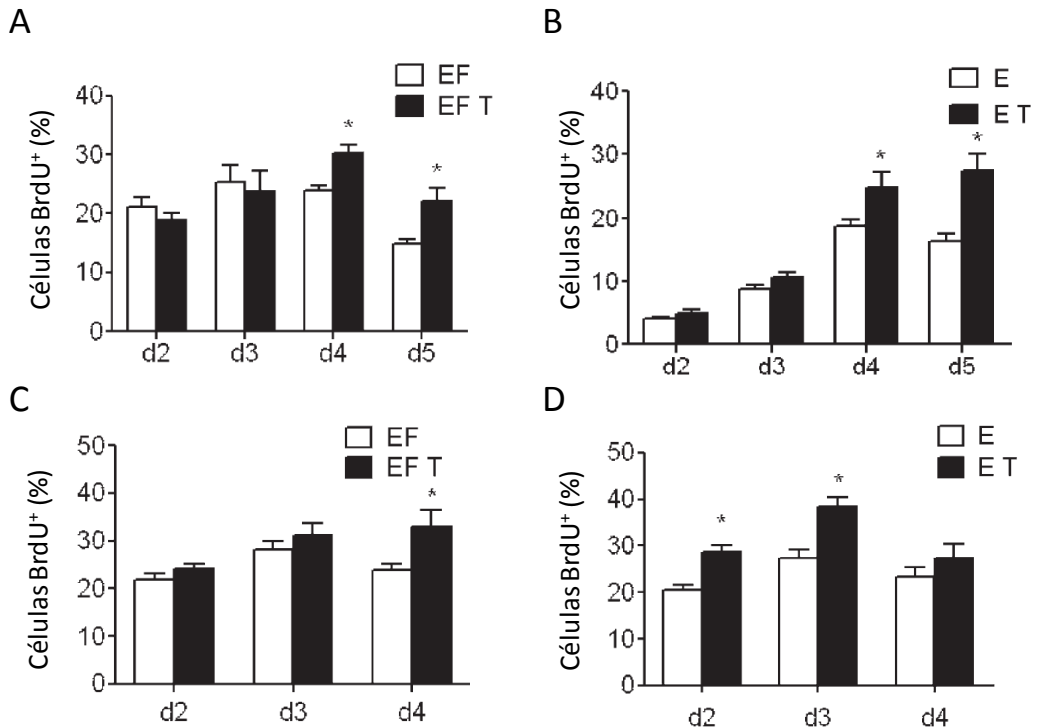


Figura 1.5. El efecto de la taurina en la proliferación de las CPN embrionarias. La incorporación de BrdU se realizó como se describió en la figura 1.3. En **A** y **B**, los porcentajes de células positivas a BrdU en los cultivos primarios generados con EGF+FGF2 o solo con el EGF, respectivamente. En **C** y **D**, los porcentajes de células positivas a BrdU en los cultivos secundarios generados con los dos factores o con el EGF. En todas las condiciones se determinó el efecto de la taurina (10mM) en la incorporación de BrdU (barras negras). Las barras representan los porcentajes de células positivas a BrdU, y son promedios \pm EE de 4 experimentos, d=día. Las diferencias significativas respecto a cada control se determinaron con una prueba-T, $*P < 0.05$.

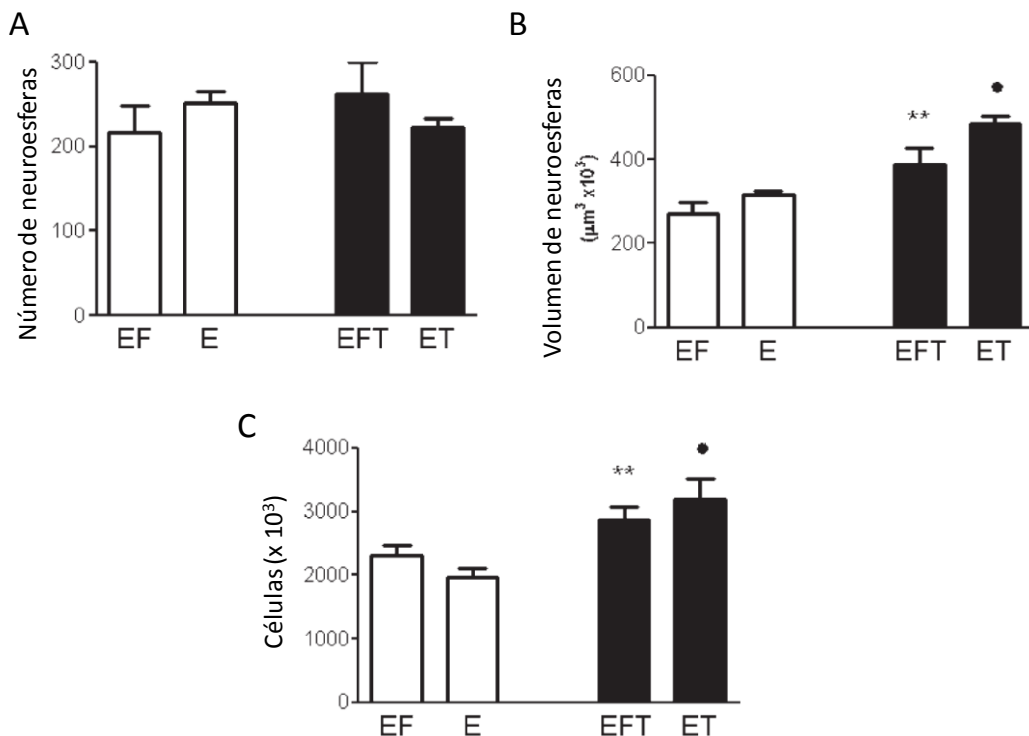


Figura 1.6. El efecto de la taurina en los cultivos secundarios de CPN embrionarias murinas. Los cultivos secundarios se generaron por la disociación de las neuroesferas primarias y su resiembra en medio suplementado con los dos factores de crecimiento o solo con el EGF, en ausencia (barras blancas) o presencia de taurina 10mM (barras negras). **A.** Número de neuroesferas. **B.** Volumen de las neuroesferas. **C.** Número de las CPN. Los parámetros se determinaron tras cuatro días en cultivo. El número de neuroesferas se contó en fotografías de cada una de las condiciones y el volumen de neuroesferas se midió con el programa ImageJ®. El número de CPN se evaluó, luego de la disgregación mecánica de las neuroesferas, en la cámara de Neubauer. Los valores son promedios \pm EE de 12 experimentos. Las diferencias significativas se determinaron con un ANDEVA de dos vías, $P < 0.05$ en EF vs EFT (**) y en E vs ET (•).

La concentración de taurina en el mesencéfalo y en las CPN embrionarias

Los niveles de taurina se cuantificaron por HPLC en las CPN provenientes de neuroesferas primarias y secundarias, así como en células del mesencéfalo embrionario de ratón. La concentración de taurina en el mesencéfalo fue de 349 $\mu\text{moles/g}$ de proteína. En las CPN de cultivos primarios (cultivadas sin taurina) la concentración de taurina disminuyó hasta 44.3 $\mu\text{moles/g}$ de proteína y los niveles cayeron en el siguiente pase del cultivo hasta 8.3 $\mu\text{moles/g}$ de proteína. En las neuroesferas generadas en los cultivos con taurina, las CPN mostraron una alta concentración de taurina similar a la encontrada en el tejido (390 - 486

$\mu\text{moles/g}$ de proteína). Estos niveles resultan de la taurina acumulada al interior de las células y no de la taurina adherida al exterior de las neuroesferas, ya que se midió el contenido en las neuroesferas expuestas a una solución de taurina durante pocos segundos, y éstas mostraron el mismo nivel de taurina que aquellas células que no la tuvieron durante su cultivo (fig. 1.7).

La caracterización de los linajes celulares derivados de las CPN en condiciones de diferenciación

Se verificó la multipotencialidad de las CPN y se indagó si la taurina modificaba la proporción de los linajes generados. Las neuroesferas se disociaron y las células se sembraron en un medio de cultivo con suero fetal bovino al 1%, en ausencia de los factores de crecimiento durante 7 días. Posteriormente, mediante inmunocitoquímica se identificó la expresión de los marcadores de diferenciación (β III-tubulina para las neuronas, GFAP para los astrocitos y MBP para los oligodendrocitos). Durante este proceso de diferenciación las CPN generaron una gran proporción de células positivas a GFAP (39 a 48 %) y en menor medida (entre 10 a 12 %) de células positivas a β III-tubulina. No se encontraron células positivas a MBP. La taurina no modificó significativamente la proporción de las células diferenciadas (fig. 1.8).

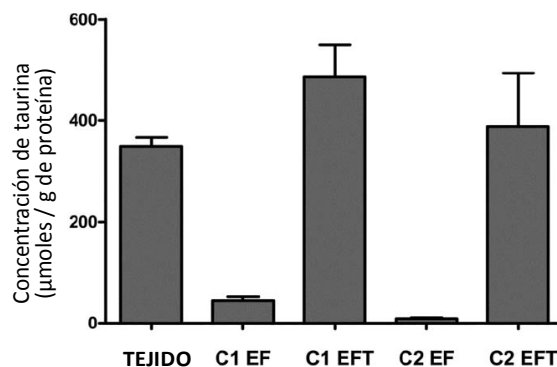


Figura 1.7. Los niveles de taurina en las células del tejido del mesencéfalo embrionario de ratón y en las CPN embrionarias murinas. La concentración de taurina se determinó mediante HPLC en las células aisladas del mesencéfalo embrionario de ratón de 13.5 de gestación, así como en las CPN de los cultivos primarios (C1) o secundarios (C2) generados en presencia o ausencia de taurina (10mM). Las células de cada condición se lavaron con PBS, se homogenizaron y las proteínas se precipitaron con etanol; cada muestra se derivatizó con OPA y se inyectó a una columna ODS. Las muestras se movilizaron con una tasa de 1.5mL/min, durante 15 minutos en un gradiente de metanol con acetato de potasio. Los resultados son promedios \pm EE de 4 experimentos.

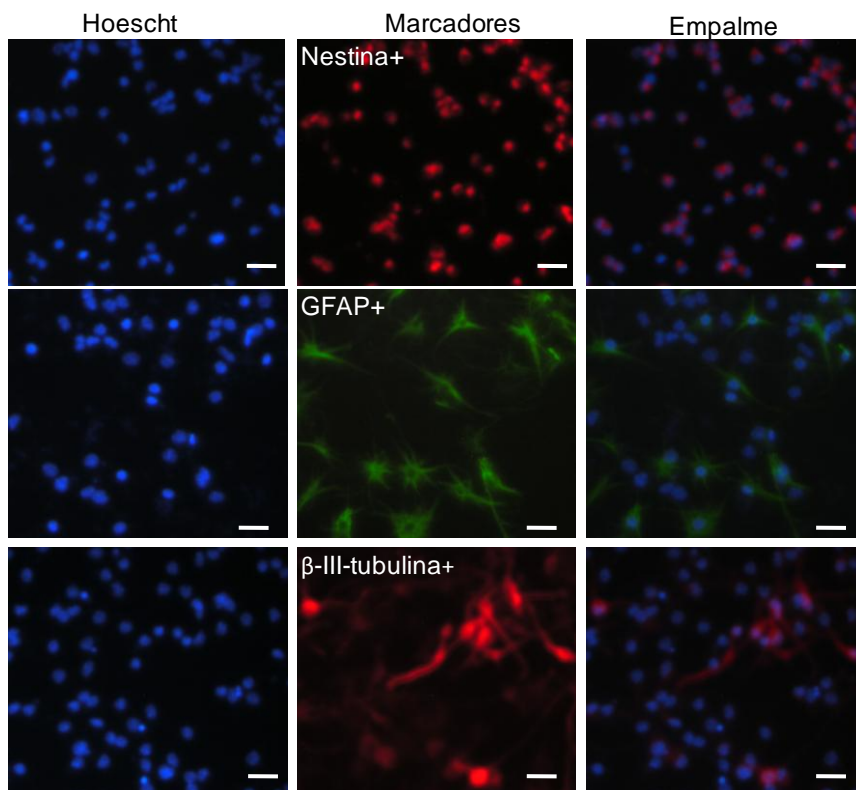


Figura 1.8. La identificación de marcadores neurales en las CPN embrionarias murinas antes y después de la diferenciación. Las neuroesferas se disgregaron y las células se cultivaron en un sustrato de poli-l-lisina, para su procesamiento por inmunocitoquímica. El panel superior muestra las células positivas a nestina (en rojo), antes de la inducción de la diferenciación. La diferenciación de las CPN se promovió con la adición de suero fetal bovino (1%) durante 7 días. Los paneles intermedio e inferior, muestran la identificación de células positivas a GFAP, marcador de células gliales (en verde), y a β III-tubulina, marcador de células neuronales (en rojo), respectivamente. Los núcleos se identificaron con Hoechst (en azul). Son imágenes representativas capturadas con un aumento 20 \times ; barra de escala = 40 μ m.

2. La expresión funcional y localización del transportador de taurina (TauT) en las células precursoras neurales

Dev Neurosci (2010) 32, 321-328

La caracterización del transporte de taurina en las CPN embrionarias

Se utilizaron las CPN derivadas del mesencéfalo embrionario de ratón. En estas células se siguió la entrada de taurina tritiada (^3H) para determinar la presencia, la eficiencia y la cinética del transporte de taurina. Se encontró una captura lineal de taurina en los primeros 30 minutos a partir de la incubación con taurina- ^3H (no se muestra figura), tiempo seleccionado para realizar los siguientes ensayos. Se cuantificó la cantidad de taurina- ^3H incorporada por las CPN expuestas a un medio isosmótico con concentraciones crecientes de taurina (no radiactiva); en estas condiciones se encontró un componente no saturable movilizado en ausencia de Na^+ y Cl^- , con valor del 25% de la captura total y otro mediado por el transportador, movilizado en presencia de Na^+ y Cl^- . Se calcularon las constantes del componente saturable, donde la V_{max} fue de 0.39 nmoles \times mg de proteína \times minuto y la $K_m = 19.8\mu\text{M}$ (fig. 2.1A-B).

El transporte activo de taurina depende de los gradientes de Na^+ y Cl^- presentes en la célula, por lo que se determinó la estequiometría del transportador. Se midió la captura de taurina- ^3H en las CPN en presencia de un medio isosmótico con concentraciones crecientes de Na^+ y Cl^- en un intervalo de 0 mM a 135 mM. Se encontró un comportamiento sigmoide en la captura de taurina- ^3H en concentraciones crecientes de sodio, con un coeficiente de Hill de 2.03. Respecto a la dependencia de Cl^- , se observó una curva de captura hiperbólica en relación a las concentraciones crecientes de cloro, con un coeficiente de Hill de 1.18. Estos coeficientes indican que en estas células, por cada molécula de taurina que se transporta, se movilizan 2 iones sodio y 1 ion cloro. Los valores de $K_{0.5}$ para el Na^+ y Cl^- fueron 90.2 mM y 12.8 mM, respectivamente (fig. 2.2).

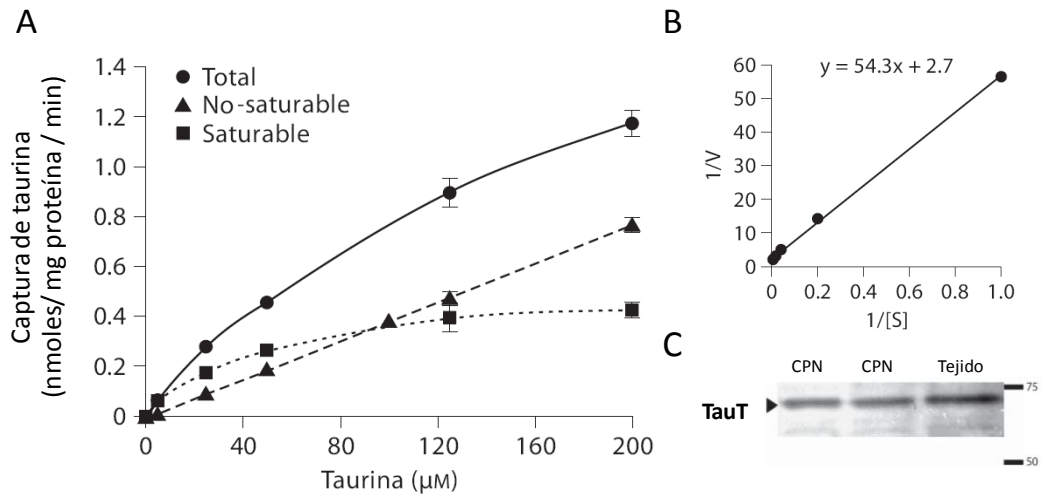


Figura 2.1. La presencia y funcionalidad del transportador de taurina en las CPN embrionarias murinas. **A.** Cinética de la captura de taurina en las CPN. Las CPN se incubaron por 30 minutos con taurina³H (0.8 $\mu\text{Ci/mL}$, 28nM) en un medio isosmótico con taurina no marcada en las concentraciones indicadas. Las líneas representan: la captura total de taurina (\bullet); la captura no saturable, donde el NaCl se reemplazó con KNO_3 (\blacktriangle); y la captura saturable, calculada a partir de la sustracción de los valores del componente no-saturable respecto de los valores de la captura total (\blacksquare). Las tasas de captura se calcularon a partir de la cantidad de radiactividad presente en las CPN en relación con la concentración de taurina no marcada del medio. **B.** Representación del comportamiento del componente saturable mediante la ecuación *Lineweaver-Burk*, de la cual se infieren los valores de V_{max} y K_m del transportador de taurina en las CPN, donde V = captura de taurina³H; S = concentración de taurina fría. Los resultados son promedios \pm EE de 6 – 20 experimentos. **C.** Expresión del TauT en las CPN. Los lisados de las CPN y de las células aisladas del mesencéfalo embrionario, se procesaron por electroforesis SDS-PAGE y se identificó por Western Blotting la presencia del transportador con el anticuerpo primario anti-TauT [1:750] y el anticuerpo secundario HRP-IgG [1:2000].

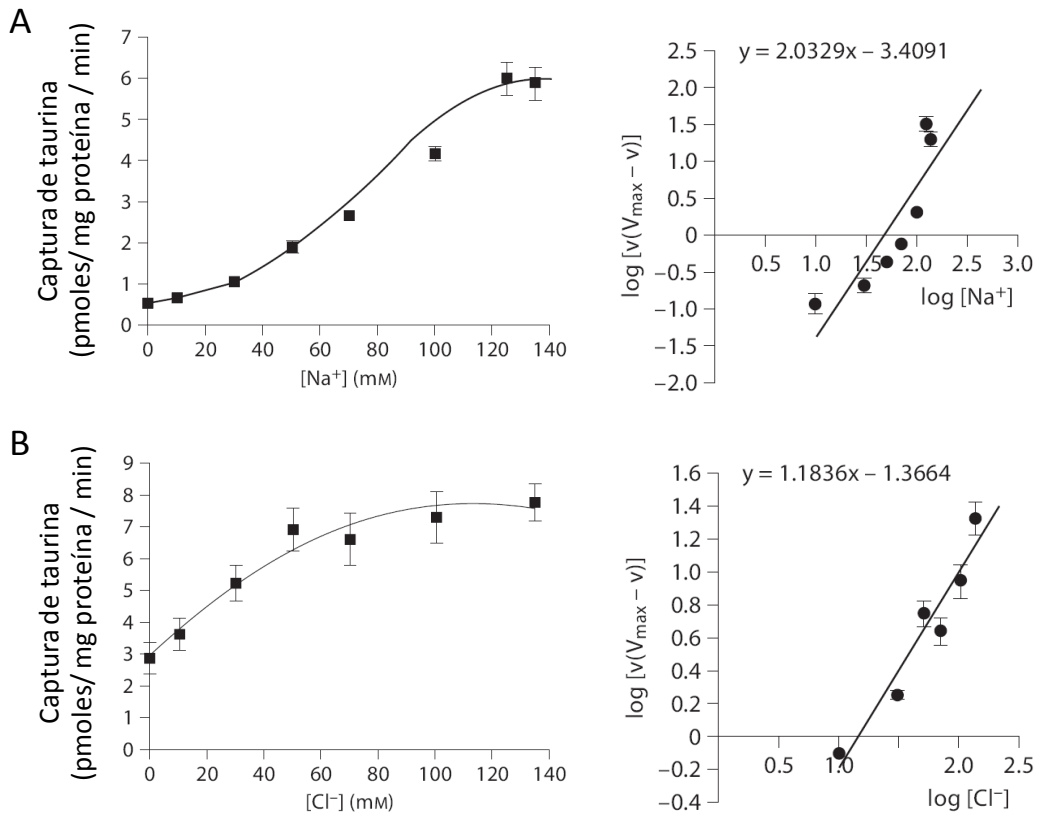


Figura 2.2. La cinética de la dependencia de la captura de la taurina respecto al Na⁺ y el Cl⁻ en las CPN embrionarias. **A.** Captura de la taurina³H en las CPN medida en presencia de concentraciones crecientes de Na⁺ (0-140 mM) y una concentración fija de Cl⁻; el NaCl se reemplazó con cloruro de colina en el medio de incubación. **B.** Captura de la taurina³H en las CPN medida en presencia de concentraciones crecientes de Cl⁻ (0-140 mM) y una concentración fija de Na⁺; el NaCl se reemplazó con gluconato de sodio en el medio de incubación. En el lado derecho de cada caso, el comportamiento del transporte de taurina en función de la concentración del NaCl se representa en gráficas de Hill. Los resultados son promedios ± EE de 6 experimentos.

La especificidad del transportador de taurina en las CPN

La especificidad del transporte de taurina se investigó midiendo la captura de taurina³H dependiente de Na⁺/Cl⁻ en ausencia (control) o presencia de aminoácidos no radiactivos (taurina, hipotaurina, β-alanina, GABA, glicina y creatina) a una concentración de 1mM. La fig. 2.3 muestra que la hipotaurina y la β-alanina, moléculas estructuralmente más parecidas a la taurina, inhibieron la captura de taurina³H en las CPN; el GABA y la glicina redujeron en menor medida la captura; mientras que la creatina (de estructura diferente a la taurina), no afectó el transporte de taurina³H.

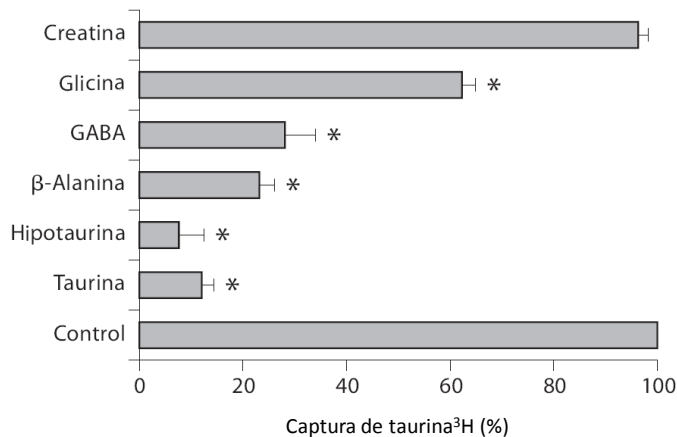


Figura 2.3. La especificidad de la captura de la taurina por las CPN embrionarias. La captura de taurina³H dependiente de NaCl se midió como se describe en la figura 2.1.A, en ausencia (control) o presencia de los aminoácidos no marcados (1mM): taurina, hipotaurina, β-alanina, GABA, glicina y creatina. Las barras representan el porcentaje de captura de la taurina³H en presencia de los aminoácidos no radiactivos. Los resultados son promedios ± EE de 12 experimentos. Las diferencias son significativas respecto al control con *P<0.01.

La expresión de la proteína TauT y su distribución celular en las CPN

La presencia del transportador TauT se evaluó mediante *western-blotting* en las células aisladas del mesencéfalo embrionario de ratón, así como en las CPN derivadas de los cultivos de neuroesferas. El anticuerpo anti-TauT reconoció una

banda de proteína ubicada en el peso correspondiente al transportador de taurina (67 kDa) (fig. 2.1C). Adicionalmente, se analizó la distribución subcelular del TauT en las CPN mediante microscopia de fluorescencia y confocal. El conteo de las células positivas al TauT, reveló que el 98.8 ± 1.3 % de las CPN expresan el transportador. La reactividad al TauT se observó principalmente en la membrana citoplasmática, en menor medida en el citoplasma y solo una ligera señal se detectó en el núcleo (fig. 2.4).

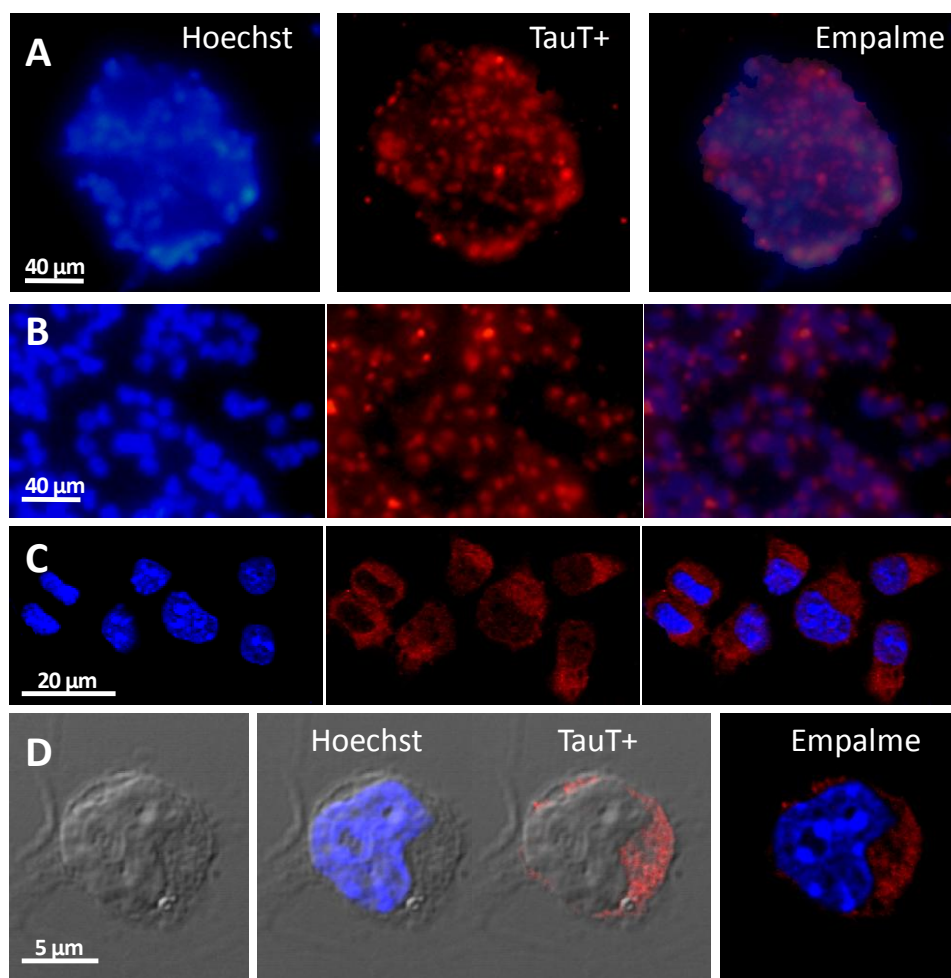


Figura 2.4. La distribución del TauT en las CPN embrionarias. Las neuroesferas se disgregaron y las CPN se cultivaron sobre un sustrato de poli-l-lisina por 2h. El TauT se detectó mediante inmunocitoquímica, para lo cual las células se lavaron, se bloquearon y se permeabilizaron con una solución de PBS+BSA (0.1%)+GS (10%)+ Tritón (0.3%), posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-TauT y el anticuerpo secundario AlexaFluor568 (en rojo); los núcleos se identificaron con Hoechst (en azul). Se muestran las imágenes representativas del TauT identificado en las neuroesferas (A); en las CPN, por microscopia de fluorescencia (B) o confocal (C); y a nivel subcelular, en el plano de un corte óptico en el eje Z realizado con microscopia confocal en las CPN (D).

3. La taurina estimula la proliferación y promueve la neurogénesis de las células precursoras neurales del cerebro adulto de ratón

Stem Cell Research (2012) 9, 24-34

El cultivo de neuroesferas adultas y la caracterización de las CPN

Las CPN se obtuvieron mediante cultivos de neuroesferas derivadas del tejido de la zona subventricular de cerebros de ratones CD1 adultos, en presencia de los factores de crecimiento EGF y FGF2. El porcentaje de células positivas a nestina fue entre 90.4 - 94.5 %. En estas células indiferenciadas solo se encontraron bajos porcentajes de células positivas a GFAP y a β III-tubulina (0.92 – 2.2 % y 1.2 – 2.3 %, respectivamente) (fig. suplem. 1, pág. 138).

El efecto de la taurina en el número de las CPN adultas

La adición de taurina a los cultivos de neuroesferas, aumentó significativamente el número de las CPN independientemente del pase de cultivo (fig. 3.1A). El número inicial de las células en los cultivos fue de 200×10^3 ; a partir de las 24 horas se observó un aumento en el número de células en presencia de taurina y luego de 96 horas, los cultivos suplementados con taurina presentaron 120% más de células que los controles (fig. 3.1B).

El efecto de la taurina en la viabilidad y en la proliferación de CPN adultas

El aumento en el número de CPN adultas en los cultivos con taurina, puede ser consecuencia de cambios en la supervivencia o en la proliferación de las células. Por ello, se evaluó la proliferación a diferentes tiempos durante el curso del cultivo y se encontró que la taurina aumentó significativamente la incorporación de BrdU entre las 1.5 y 48 h; no hubo efecto en tiempos posteriores. La viabilidad se determinó por el ensayo de exclusión de azul tripano y por la

cuantificación de la absorbancia de MTT; con ninguno de los dos métodos se observaron diferencias por la presencia de taurina en los cultivos (fig. 3.2).

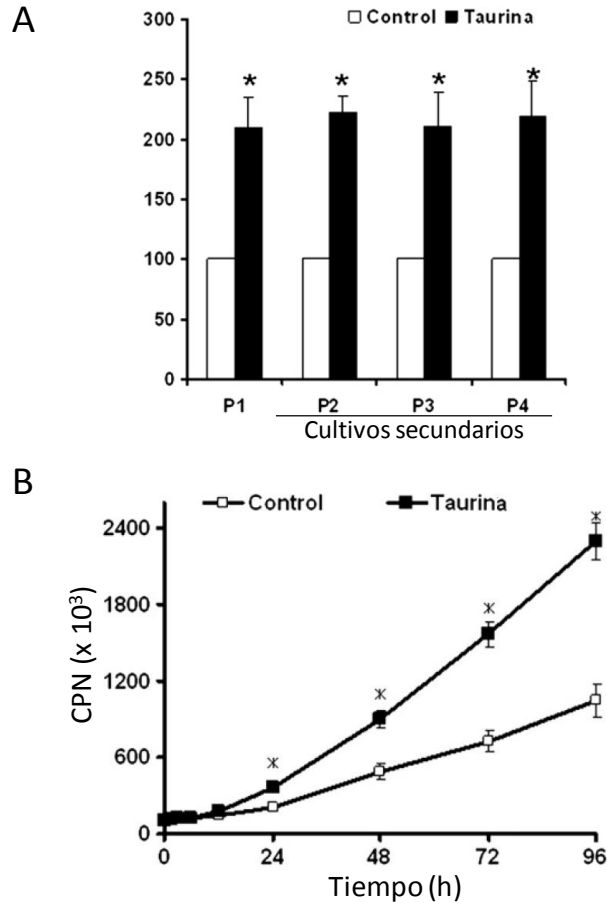


Figura 3.1. El efecto de la taurina en el número de las CPN adultas murinas. Las neuroesferas se generaron en un medio de proliferación con los factores de crecimiento EGF+FGF2, en presencia o ausencia de taurina (10mM). **A.** Número de CPN obtenidas en los cultivos primarios de neuroesferas (P1) y en los cultivos secundarios (P2-P4). Las neuroesferas generadas en cada pase (P), luego de 4 días en cultivo, se disgregaron mecánicamente y las CPN se contaron en la cámara de Neubauer. Las barras negras representan el porcentaje de aumento en el número de CPN en la condición con taurina (10mM) respecto a la condición control (barras blancas). **B.** El aumento en el número de CPN durante el curso del cultivo de neuroesferas en un medio control (□) o en un medio suplementado con taurina (■). Los valores son promedios \pm EE de al menos 5 experimentos. Las diferencias significativas respecto a cada control se determinaron con una prueba-T, * $P < 0.05$.

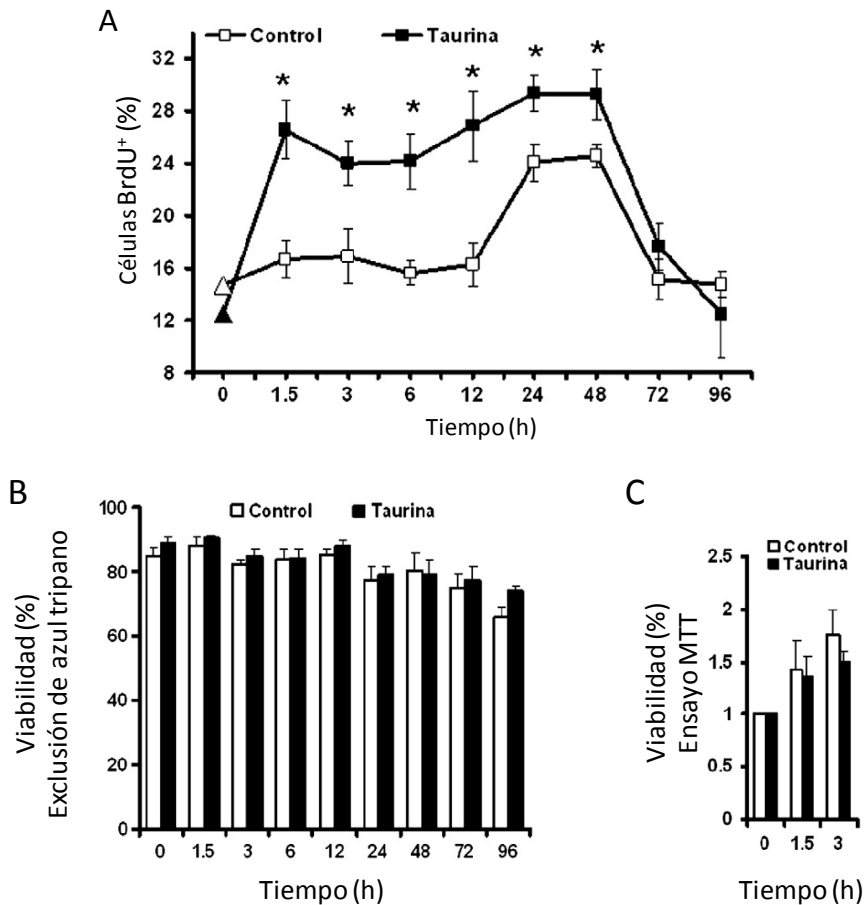


Figura 3.2. La viabilidad y la incorporación de BrdU en las CPN adultas murinas. **A.** Curso temporal de la incorporación del BrdU por las CPN. Las células positivas a BrdU se identificaron como se describe en la figura 1.3. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas a BrdU respecto al total de células en los cultivos control o en los que contienen taurina. Los puntos iniciales en las curvas (Δ , \blacktriangle) corresponden al porcentaje de células positivas a BrdU luego de 96 horas de cultivo, antes de la disgregación mecánica de las neuroesferas, requerida para resembrar las CPN. **B.** Viabilidad celular determinada por el ensayo de la exclusión del azul tripano y la cuantificación de las células en la cámara de Neubauer. **C.** Viabilidad celular determinada por el ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados son promedios \pm EE de 4 – 12 experimentos. Las diferencias son significativas respecto al control con $*P < 0.05$.

La especificidad del efecto de la taurina en las CPN adultas

La taurina incrementó la cantidad de CPN en cultivo cuando se utilizó en concentraciones ubicadas en el intervalo de 1 a 30 mM. El máximo efecto se observó a la concentración de 10mM. Las concentraciones menores a 1mM no tuvieron efecto. Se agregaron otros aminoácidos al medio de cultivo de las CPN para investigar la especificidad de los efectos de la taurina. Se eligieron aminoácidos de estructuras similares a la taurina, como la hipotaurina, la alanina, la glicina y el GABA. Tanto en condiciones de proliferación, como de diferenciación, ninguno de los aminoácidos reprodujo el efecto de la taurina (fig. 3.3).

La eficiencia de la formación de neuroesferas en cultivos a baja densidad

Para comprobar si el efecto de la taurina ocurre en células progenitoras o en células troncales neurales, se sembraron cultivos de CPN a baja densidad (25 células/pozo en placas de 96) y se evaluó el número de neuroesferas formadas en presencia o ausencia de taurina luego de 7 días en cultivo. Los cultivos control presentaron 31 ± 4 neuroesferas por placa, mientras que con taurina se contaron 86 ± 14 neuroesferas; es decir la taurina provocó un aumento de 177% en el número de neuroesferas por placa. La eficiencia en la formación de neuroesferas, calculada como la proporción del número de neuroesferas generadas respecto a la cantidad inicial de células sembradas por placa, fue de 1.29% en control y de 3.58% en taurina (fig. 3.4).

Determinación del contenido de taurina en el cerebro adulto y en los cultivos de neuroesferas

Mediante HPLC se midió el contenido de taurina en algunas regiones del cerebro adulto de ratón, así como en las CPN derivadas de la zona subventricular y expandidas como neuroesferas. El contenido de taurina en la corteza cerebral, la zona subventricular y los bulbos olfatorios fue de 50, 20 y 125 $\mu\text{mol/g}$ de proteína, respectivamente. Las CPN derivadas de la zona subventricular

presentaron únicamente 2 $\mu\text{mol/g}$ de proteína, pero la presencia de taurina en los cultivos incrementó el contenido de taurina en las CPN hasta 240 $\mu\text{mol/g}$ de proteína (fig. 3.5).

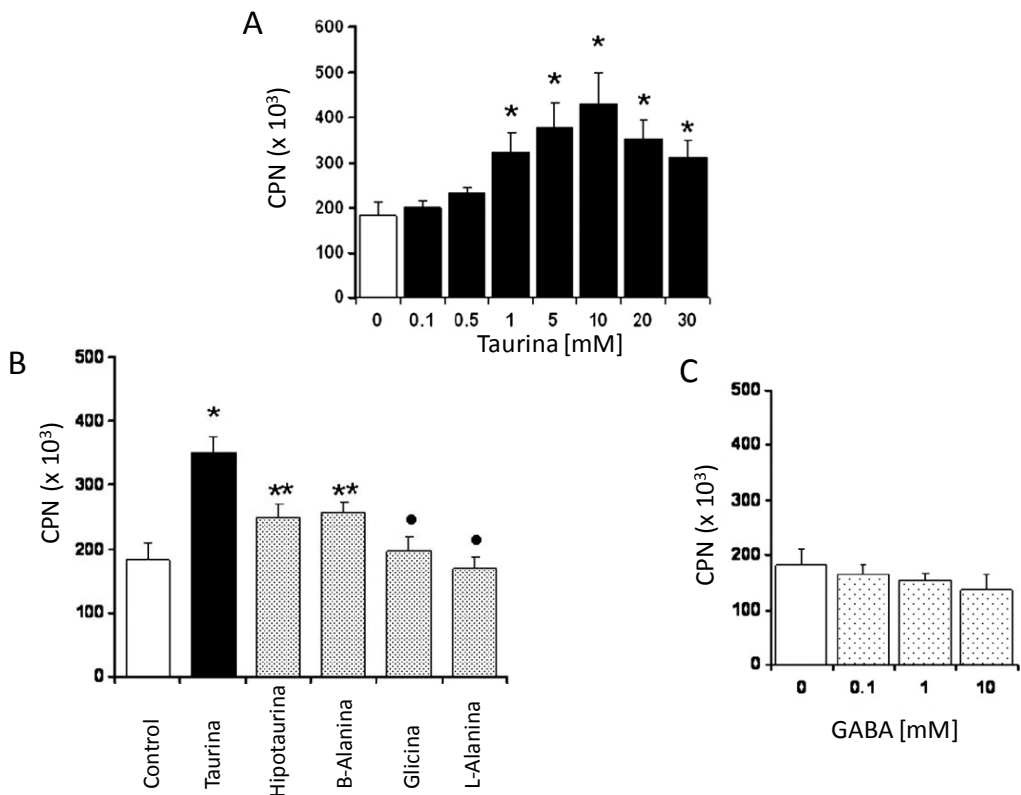


Figura 3.3. La especificidad del efecto de la taurina en las CPN adultas murinas. Las neuroesferas se generaron en un medio control (barras blancas), en un medio suplementado con taurina (barras negras) o con otros aminoácidos (barras grises) en las concentraciones indicadas. Luego de 5 días en cultivo, las neuroesferas se disgregaron y el número de CPN se cuantificó en la cámara de Neubauer. **A.** Curva del efecto de la concentración de la taurina en el número de las CPN. **B.** Efecto de los aminoácidos: hipotaurina, B-alanina, glicina y L-alanina (1mM) en el número de las CPN. **C.** Curva del efecto del GABA en el número de las CPN. Los resultados son promedios \pm EE de por lo menos 4 experimentos. Las diferencias significativas se determinaron con un ANDEVA de una vía, respecto al control con $P < 0.05$ (*) y respecto a taurina con $P < 0.05$ (**) y $P < 0.01$ (•).

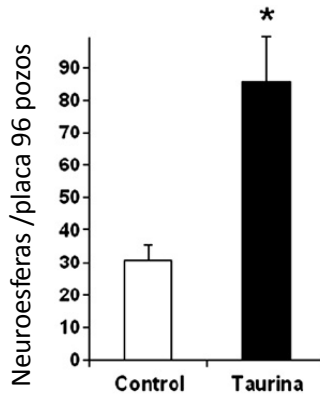


Figura 3.4. La eficiencia de la generación clonal de neuroesferas en los cultivos con baja densidad. Las neuroesferas de cultivos secundarios se disgregaron y se cultivaron con una densidad de 25 células por cada 100 μ L de medio de proliferación con o sin taurina (10mM), en los pozos de placas de 96. Luego de 7 días de incubación, se contó el número de neuroesferas formadas y se calculó la eficiencia de generación clonal. Las barras representan la cantidad de neuroesferas formadas en cada placa de 96 pozos, en las condiciones indicadas. Los valores son promedios \pm EE de 6 experimentos. La diferencia significativa se determinó con una prueba-T, *P<0.05.

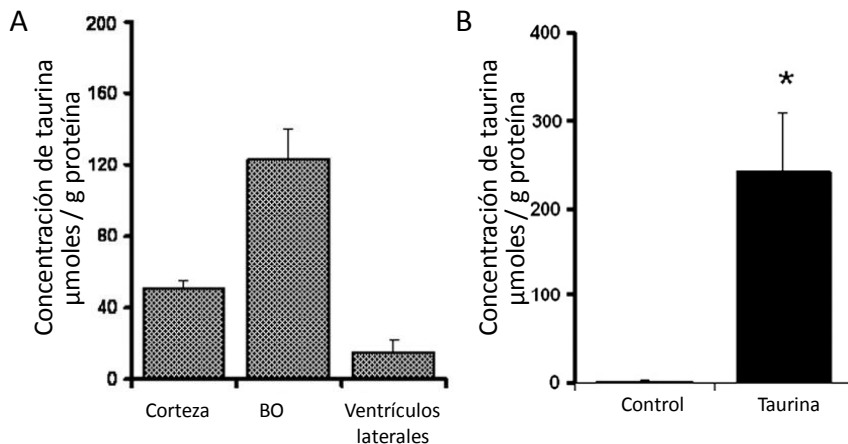


Figura 3.5. Los niveles de taurina en el tejido cerebral de ratones adultos y en las CPN adultas murinas. Los niveles de taurina se cuantificaron mediante HPLC, como se describe en la figura 1.7. **A.** Contenido de taurina en células aisladas de la corteza cerebral, de los bulbos olfatorios (BO) y de los ventrículos laterales del cerebro de ratones adultos. **B.** Contenido de taurina en las CPN generadas en cultivos con un medio control o suplementado con taurina (10mM). Las barras representan la concentración de taurina en las células. Los valores son promedios \pm EE de 3 – 4 experimentos. La diferencia significativa en B se determinó con una prueba-T, *P<0.05.

La caracterización del mecanismo de incorporación de la taurina en las CPN adultas

El TauT se ubicó en las CPN adultas mediante inmunocitoquímica y microscopia de fluorescencia. El TauT se expresó en el 92.8 ± 2.6 % de las células. La funcionalidad del TauT se evaluó a través de la captura de taurina³H en un medio isosmótico. Se encontró un componente difusional y otro saturable. El componente saturable fue dependiente de Na⁺ y Cl⁻, las constantes de la cinética del transporte de taurina fueron: Vmax = 493 pmol × mg de proteína × min y Km = 41.7 μM (fig. 3.6).

El efecto de la taurina en la proporción de los linajes derivados de las CPN adultas

La diferenciación de las CPN se indujo cuando se cultivaron en un medio suplementado con suero fetal bovino (1%) en presencia o ausencia de taurina. En estas condiciones se diferenciaron las CPN, y se identificó el porcentaje de astrocitos y neuronas presentes en los cultivos. En las condiciones control se contabilizaron: 89.6 ± 1.3 % de astrocitos, positivos al marcador GFAP; 3.1 ± 0.5 % de neuronas positivas a βIII-tubulina y 1.8 ± 0.4 % de células positivas a MAP2, marcador de neuronas maduras. En presencia de taurina se contó un 85.6 ± 1.0 % de células positivas a GFAP, mientras que se incrementó la cantidad de células positivas a βIII-tubulina y a MAP2 hasta 10.2 ± 0.8 % y 5.1 ± 0.5 %, respectivamente (fig. 3.7 y fig. suplem. 2, pág. 139).

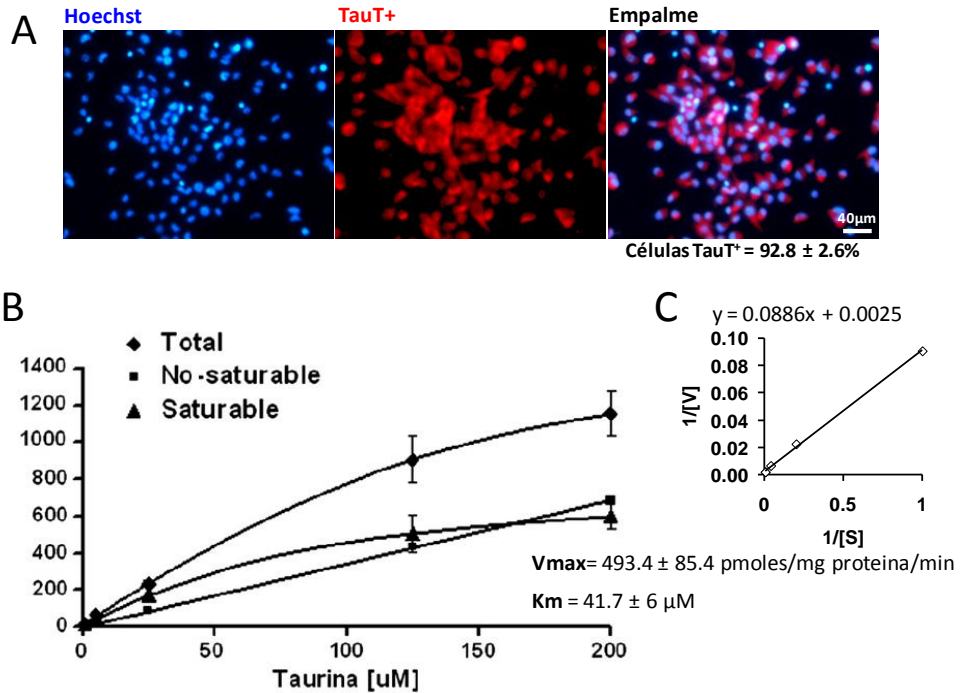


Figura 3.6. La identificación de la presencia y la funcionalidad del TauT en las CPN adultas murinas. **A.** Expresión del TauT en las CPN. El TauT se identificó mediante inmunocitoquímica como se describe en la figura 2.4. Se muestran las imágenes representativas, visualizadas con microscopía de fluorescencia, de la reactividad al anticuerpo anti-TauT (en rojo) y los núcleos teñidos con Hoechst (en azul). Barra de escala = $40\mu\text{m}$. **B.** La cinética de captura de taurina en las CPN. Las CPN se incubaron por 30 minutos con taurina³H (29nM) y con taurina no marcada en las concentraciones indicadas. Las líneas representan: la captura total de taurina (◆); la captura no saturable, donde el NaCl se reemplazó con KNO₃ (■); y la captura saturable, calculada a partir de la sustracción de los valores del componente no-saturable respecto de los valores de la captura total (▲). Las tasas de captura se calcularon como se describe en la figura 2.1. **C.** Representación del comportamiento del componente saturable con la ecuación *Lineweaver-Burk*, de la cual se infieren los valores de Vmax y Km del transportador de taurina en las CPN, donde V= captura de taurina³H; S= concentración de taurina fría. Los valores son promedios \pm EE de 13 experimentos.

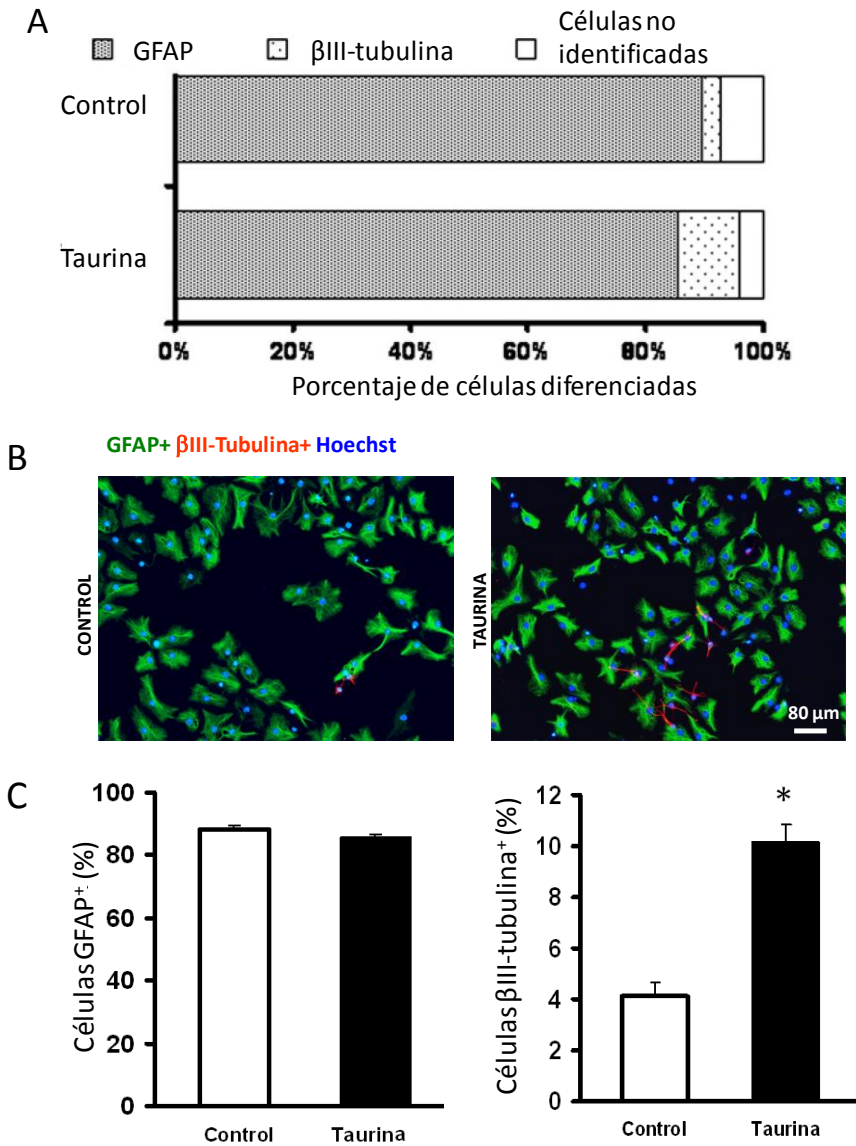


Figura 3.7. El efecto de la taurina en la proporción de los tipos celulares diferenciados a partir de las CPN adultas murinas. Las neuroesferas se disociaron y las células se plaquearon sobre poli-l-lisina en un medio suplementado con suero fetal bovino (1%) en presencia o ausencia de taurina (10mM). Luego de 7 días en incubación, las células se fijaron y se procesaron mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-GFAP (en verde) y anti-βIII-tubulina (en rojo); los núcleos se visualizaron con Hoechst (en azul). **A.** Distribución de los tipos celulares diferenciados a partir de las CPN. **B.** Imágenes representativas de las células diferenciadas, visualizadas con microscopia de fluorescencia y un aumento 20×; barra de escala= 80μm. **C.** Efecto de la taurina en la cantidad de los astrocitos (izquierda) y las neuronas (derecha) diferenciadas a partir de las CPN. Las barras representan los porcentajes de células positivas al marcador indicado. Los valores son promedios ± EE de al menos 12 experimentos. Las diferencias significativas respecto a cada control se determinaron con una prueba-T, *P<0.05.

4. La taurina potencia la proliferación y promueve la diferenciación neuronal de las células precursoras neurales del cerebro fetal humano

Dev Neurosci (2013) 35, 40-49.

El cultivo de neuroesferas fetales humanas y la caracterización de las CPN

El efecto de la taurina sobre las CPN se examinó en el tejido de tres cerebros fetales humanos de entre 15 y 16 semanas de gestación. El manejo del tejido se realizó de acuerdo a las normas institucionales del Comité de ética de la Universidad del Estado de Wayne, de Michigan EEUU. Los fetos se obtuvieron de los abortos electivos en los embarazos normales de mujeres sanas y no se reportaron anomalías en los fetos. Las células aisladas del tejido cerebral se cultivaron en un medio de proliferación con los factores de crecimiento EGF y FGF (12ng/ μ L) para obtener neuroesferas. Las células formadoras de neuroesferas fueron 76.3% positivas a nestina y 60.5% positivas a CD133, por lo tanto se consideraron como células precursoras neurales humanas (CPNh). Los porcentajes anteriores indicaron que al menos un 36.8 % de las CPNh fueron simultáneamente positivas a ambos marcadores, lo cual indicó la presencia de células troncales y progenitoras (fig. 4.1).

El efecto de la taurina en los cultivos de CPN humanas

El número de CPNh en los cultivos aumentó significativamente con la taurina (fig. 4.2A). Este efecto fue independiente de las diferencias observadas en los cultivos controles derivados de cada cerebro, como se comprobó por un análisis de varianza de dos vías (fig. 4.2A-B). El mayor efecto se encontró con la concentración de 10 mM y luego de 4 días de cultivo. Las microfotografías (4 \times) de los cultivos de neuroesferas donde se midió la superficie cubierta por neuroesferas, registraron un aumento de 21% en el área en presencia de la taurina (fig. 4.2C-D).

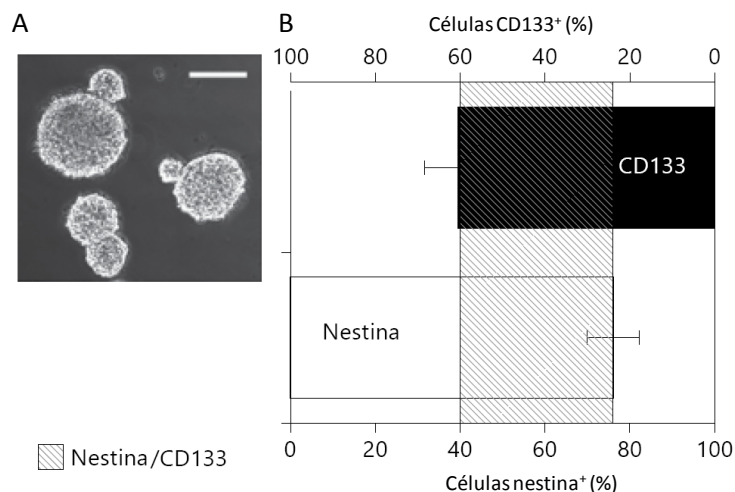


Figura 4.1. La caracterización inmunofenotípica de las células formadoras de neuroesferas humanas. Las neuroesferas se generaron de las células aisladas del tejido fresco de 3 cerebros fetales humanos de 15 – 16 semanas de gestación, las cuales se cultivaron en un medio de proliferación con los factores de crecimiento EGF+FGF2. **A.** Morfología de las neuroesferas formadas en el medio de proliferación luego de 4 días en cultivo; barra de escala =100 μ m. **B.** Identificación de las células formadoras de neuroesferas con los anticuerpos anti-nestina y anti-CD133 mediante citometría de flujo. El área sombreada indica el número mínimo de células que son positivas para ambos marcadores. Los valores son promedios \pm EE de los cultivos derivados de 3 tejidos diferentes.

La viabilidad se evaluó mediante ensayos de exclusión de azul tripano y por ioduro de propidio. La viabilidad registrada por azul tripano en los cultivos control fue de 75.1%; en los cultivos con taurina 5, 10 y 20 mM, fue de 76.2, 71.4 y 70.5 %, respectivamente. Los porcentajes de células apoptóticas identificadas con ioduro de propidio para los controles fueron de 23.9%; para los cultivos con taurina 5, 10 y 20 mM, fue de 20.7, 20.9 y 21.6 %, respectivamente. Ninguna diferencia fue significativa.

El efecto de la taurina en la proporción de neuronas derivadas de CPN humanas

Las neuroesferas se disgregaron y las CPN se sembraron con un medio de diferenciación en ausencia o presencia de taurina (5-20 mM). Luego de 5, 8 y 12 días en condiciones de diferenciación, se determinó la cantidad de células positivas a β III-tubulina mediante inmunocitoquímica. Se observaron importantes aumentos en la cantidad de neuronas en presencia de taurina. El máximo efecto se observó a los 8 días en cultivo, cuando el aumento en las

células con el marcador neuronal fue de 119%, 307% y 238%, con las concentraciones de 5, 10 y 20 mM de taurina (fig. 4.3).

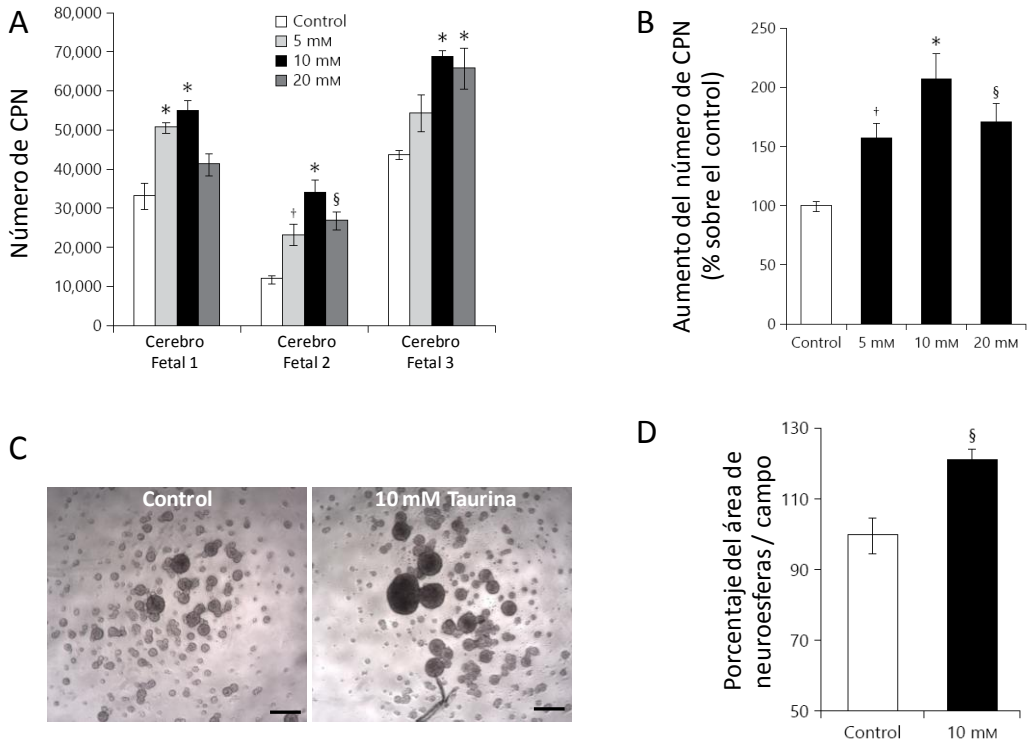


Figura 4.2. El efecto de la taurina en los cultivos de las CPN humanas. Las CPNh se obtuvieron por el cultivo de neuroesferas como se describe en la figura 4.1, en presencia o ausencia de taurina a las concentraciones indicadas. Luego de 4 días de cultivo, las neuroesferas se disociaron y se determinó el número de CPNh de los cultivos en cada condición. **A.** Número de CPNh obtenidas en los cultivos de cada uno de los cerebros fetales humanos. Los resultados son promedios \pm EE de al menos 4 cultivos derivados de cada cerebro. La significancia de la interacción entre la taurina y el feto se descartó por un ANDEVA de dos vías; luego de la prueba Bonferroni se determinaron las diferencias significativas con los respectivos controles, * $P < 0.001$, § $P < 0.01$, † $P < 0.05$. **B.** Efecto de la taurina en el número de CPNh, expresado como el porcentaje de aumento sobre el control. Los resultados son promedios \pm EE del total de experimentos, incluidos los tres cerebros ($n=12$). Las diferencias significativas se determinaron por un ANDEVA de una vía, seguido por la prueba Tukey, * $P < 0.001$, § $P < 0.01$, † $P < 0.05$. **C.** Imágenes representativas de las neuroesferas formadas en un medio de proliferación control o suplementado con taurina, capturadas con un aumento 4x; barra de escala = 300 μ m. **D.** Área total de las neuroesferas por campo. La superficie de la caja de cultivo cubierta por neuroesferas se midió con el programa ImageJ® en fotografías capturadas con un aumento 4x, en los cultivos control o con taurina. Los valores son promedios \pm EE de al menos dos cultivos de neuroesferas derivados de cada cerebro fetal ($n=8$). La diferencia significativa se determinó con una prueba-T, § $P < 0.01$.

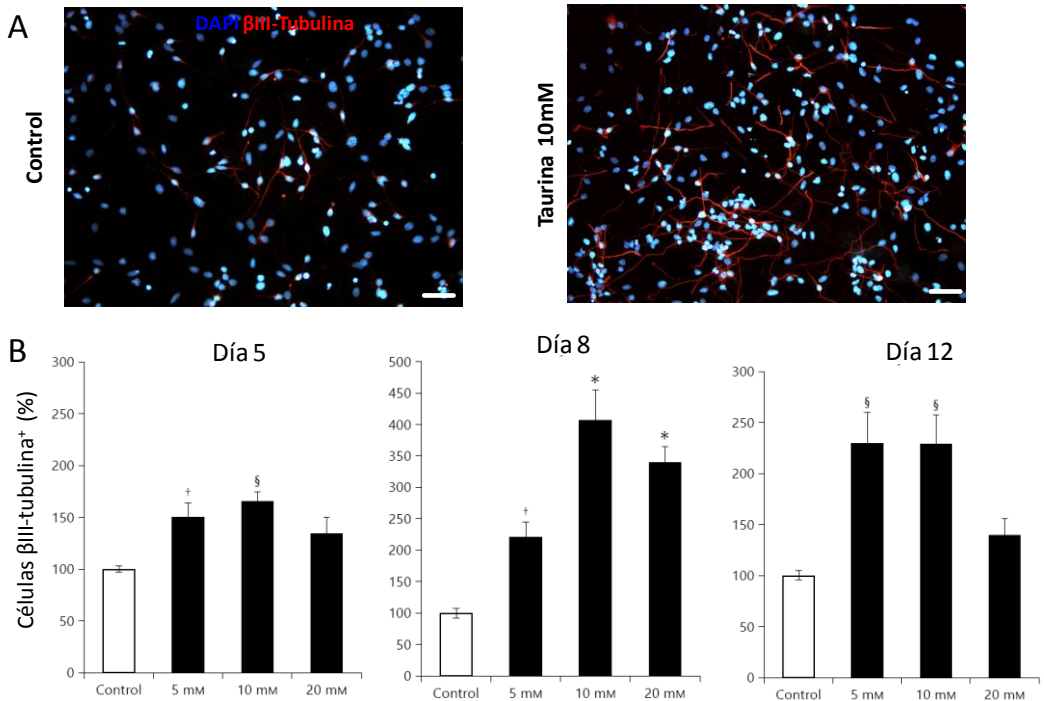


Figura 4.3. El efecto de la taurina en la proporción de las neuronas diferenciadas a partir de las CPN fetales humanas. Las neuroesferas se disociaron y las CPNh se plaquearon en un medio de diferenciación en ausencia o presencia de taurina (0, 5, 10 o 20 mM). Luego de los tiempos indicados, las células diferenciadas se fijaron y se procesaron por inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-βIII-tubulina y AlexaFluor546. **A.** Imágenes representativas de las células diferenciadas positivas a βIII-tubulina (en rojo) con los núcleos teñidos con DAPI (en azul). Las imágenes se obtuvieron por microscopia de fluorescencia con un aumento 20x; barra de escala = 40μm. **B.** Cantidad de neuronas diferenciadas a partir de las CPNh en presencia de taurina luego de 5, 8 y 12 días de cultivo. Las barras representan el porcentaje de incremento de células positivas sobre el control, los valores son promedios ± EE de al menos 2 cultivos derivados de cada cerebro fetal (n=7). Las diferencias significativas respecto los controles se determinaron por un ANDEVA de una vía, seguido por la prueba Tukey, *P<0.001, §P<0.01, †P<0.05.

La especificidad del efecto de la taurina en los cultivos de CPN humanas

Se agregaron otros aminoácidos al medio de cultivo de las CPNh para investigar la especificidad de los efectos de la taurina. Se eligieron aminoácidos de estructuras similares a la taurina, como la glicina y el GABA. Tanto en condiciones de proliferación, como de diferenciación, ninguno de los aminoácidos presentó el efecto producido por la taurina (fig. 4.4).

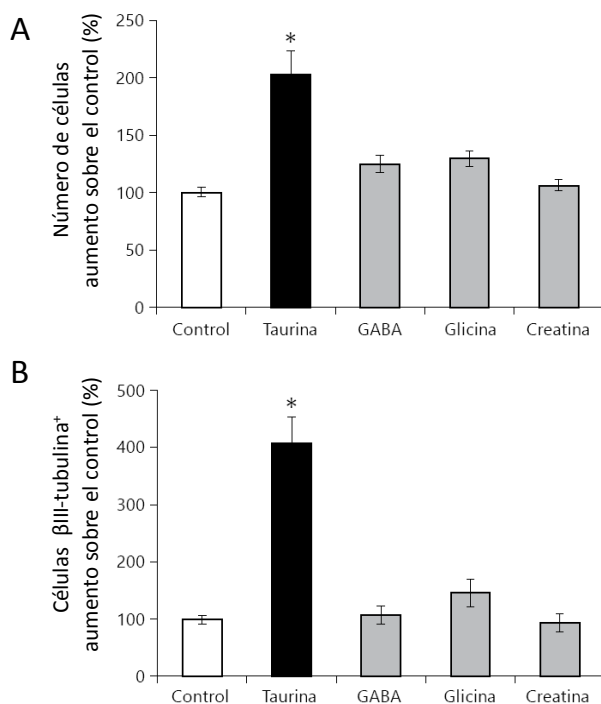


Figura 4.4. La especificidad del efecto de la taurina en el crecimiento de los cultivos de CPN fetales humanas y en su diferenciación hacia neuronas. **A.** Número de CPNh generadas en los cultivos de neuroesferas en el medio de proliferación suplementado con los aminoácidos taurina, GABA, glicina y creatina (10mM). El número de CPNh se contó en la cámara de Neubauer, en el día 4 de cultivo. **B.** Número de neuronas generadas a partir de las CPN en un medio de diferenciación suplementado con los aminoácidos taurina, GABA, glicina y creatina (10mM), en el día 8 de cultivo. Las células se procesaron por inmunocitoquímica con anti-βIII-tubulina como se describe en la figura 4.3. Los valores son promedios ± EE de al menos dos cultivos derivados de cada cerebro fetal (n=7). Las diferencias significativas respecto al control se determinaron por un ANDEVA de una vía, seguido por la prueba Tukey, *P<0.001.

El efecto de la taurina en el cultivo de células de la línea ReNcellVM y en su posterior diferenciación

Las células ReNcellVM son una línea de células progenitoras neurales, inmortalizadas por la transfección del oncogen v-Myc. Se indagó si los efectos de la taurina en esta línea eran similares a los que se registraron en las CPNh derivadas de cerebros fetales frescos. El crecimiento de la población celular en los cultivos aumentó con la presencia de 5 y 10 mM de taurina. El aumento con la concentración de 20mM no fue significativo. Por otro lado, en condiciones de diferenciación, con todas las concentraciones de taurina, se registró un incremento importante en la cantidad de neuronas generadas y el efecto máximo fue en presencia de 10mM de taurina (fig. 4.5).

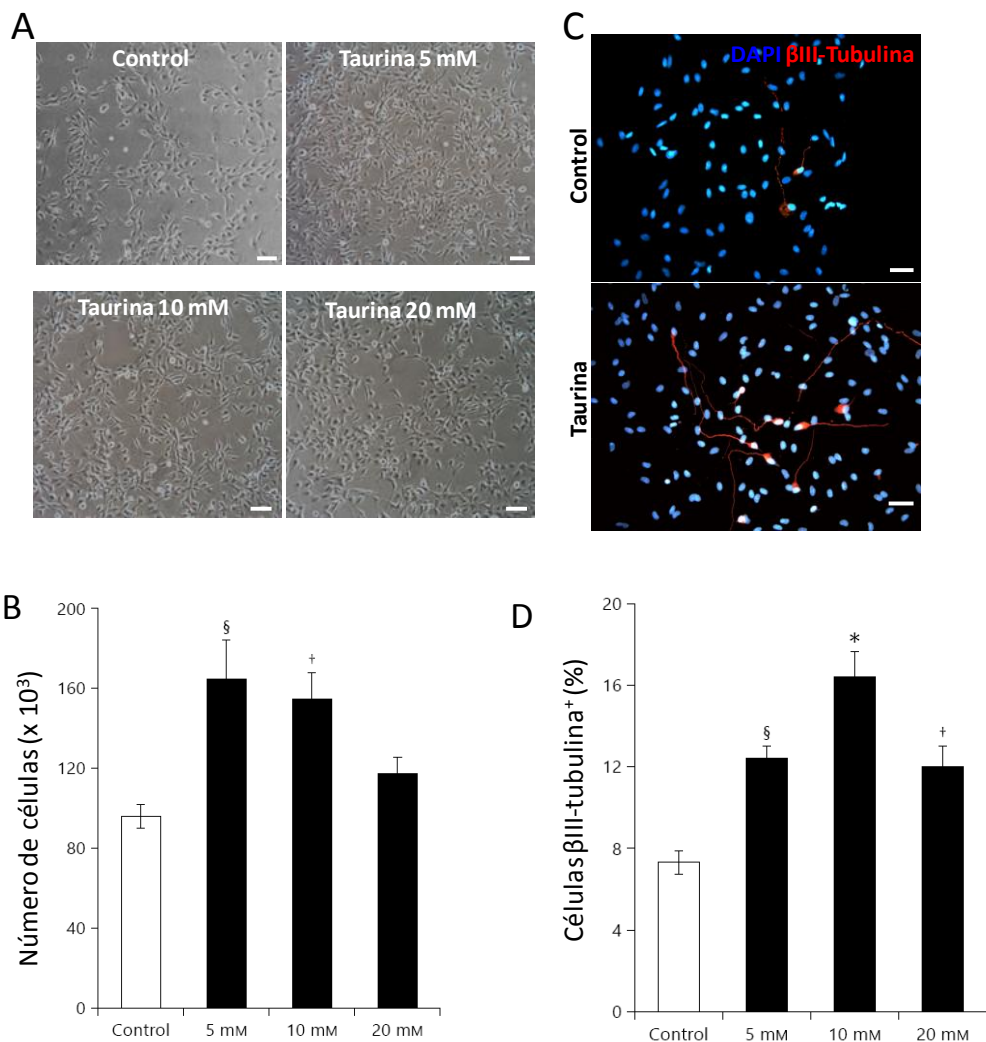


Figura 4.5. El efecto de la taurina en el número de las células progenitoras y en el número de las neuronas diferenciadas a partir de la línea ReNcellIVM. **A.** Imágenes representativas de las células progenitoras neurales de la línea ReNcellIVM crecidas en las condiciones indicadas. **B.** Efecto de la taurina en el número de células ReNcellIVM. Las células se cultivaron en medio de proliferación en ausencia o presencia de taurina (5, 10 y 20 mM) y luego de 3 días de cultivo las células se separaron con una solución de acutasa y se cuantificaron en la cámara de Neubauer. Los resultados se presentan como el porcentaje de incremento de las condiciones con taurina (barras negras) sobre el control (barra blanca). Los valores son promedios \pm EE de 6 experimentos. **C.** Imágenes representativas de las células ReNcellIVM diferenciadas hacia neuronas en las condiciones indicadas. Las fotografías se capturaron con un aumento 20 \times con microscopía de fluorescencia; barra de escala = 40 μ m. **D.** Efecto de la taurina en el número de neuronas diferenciadas de las células ReNcellIVM. Las células se plaquearon en presencia de un medio de diferenciación con las concentraciones de taurina indicadas. Luego de 8 días, las células se procesaron mediante inmunocitoquímica como se describe en la figura 4.3. Las barras representan los porcentajes de las células positivas a β III-tubulina. Los valores son promedios \pm EE de 4 experimentos. Las diferencias significativas respecto a sus controles se determinaron por un ANDEVA de una vía, seguido por la prueba Tukey, * $P < 0.001$, $\S P < 0.01$, $\dagger P < 0.05$.

Los niveles de taurina en el tejido fetal humano y en las CPN humanas

Las concentraciones de taurina se midieron en las CPNh, tanto en las obtenidas de los cultivos de neuroesferas, como en las de la línea celular, y en las células del tejido de cerebros fetales frescos. Las mediciones se llevaron a cabo por HPLC. El contenido promedio de taurina de los tres cerebros fetales humanos fue de 135.2 $\mu\text{mol/g}$ de proteína. Las CPNh obtenidas en cultivos control de neuroesferas tuvieron únicamente 1.9 $\mu\text{mol/g}$ de proteína, pero en medio suplementado con taurina el contenido alcanzó 158.5 $\mu\text{mol/g}$ de proteína. El contenido de taurina en las células de la línea ReNcellIVM fue bajo en los cultivos control (13.5 $\mu\text{mol/g}$ de proteína) y se incrementó hasta 241 $\mu\text{mol/g}$ de proteína cuando las células proliferaron en medio con taurina (fig. 4.6).

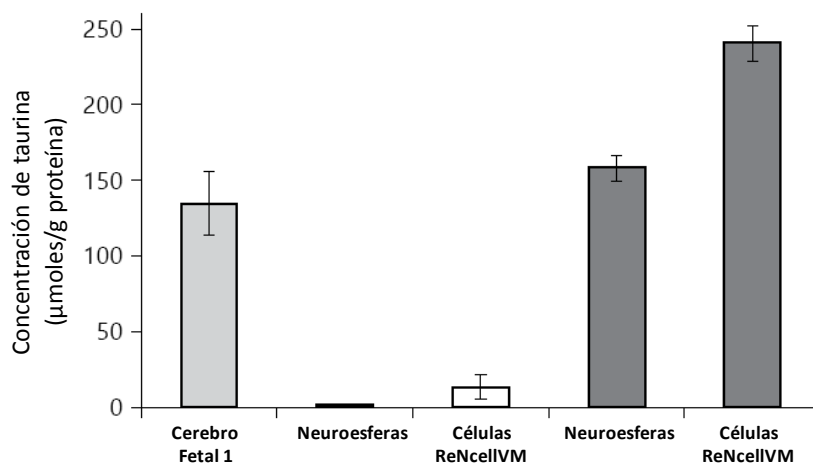


Figura 4.6. Los niveles de taurina en las células del tejido cerebral fetal humano y en las CPN fetales humanas derivadas de cultivos de primarios o de la línea celular ReNcellIVM. Las barras representan el contenido de taurina en las células disociadas de tejido cerebral fetal fresco (barra gris), en las CPNh crecidas en un medio de proliferación control (barras blancas) y en las CPNh crecidas en un medio de proliferación suplementado con taurina 10mM (barras oscuras). Al menos 400,000 células se colectaron de cada condición y el contenido de taurina se determinó por HPLC como se describe en la figura 1.7. Los valores son promedios \pm EE de 3 experimentos.

5. Las evidencias sobre el mecanismo de acción de la taurina en las CPN

Artículo en preparación

La modificación del ciclo celular de las CPN adultas en presencia de taurina

El efecto de la taurina en la proliferación descrito en los resultados previos, se basa en la cuantificación de la incorporación de BrdU, la cual evidencia únicamente la existencia de síntesis de DNA en las CPN. Con el propósito de determinar la cantidad de células en cada fase del ciclo celular, incluida la fase de síntesis, se procesaron las células con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. En los cultivos con taurina se encontró que la cantidad de células mantenidas en la fase G0/G1 disminuyó en 7%; mientras que el número de las células que avanzan hacia las fases S y G2/M incrementó en 66.7 y 79.2%, respectivamente (fig. 5.1).

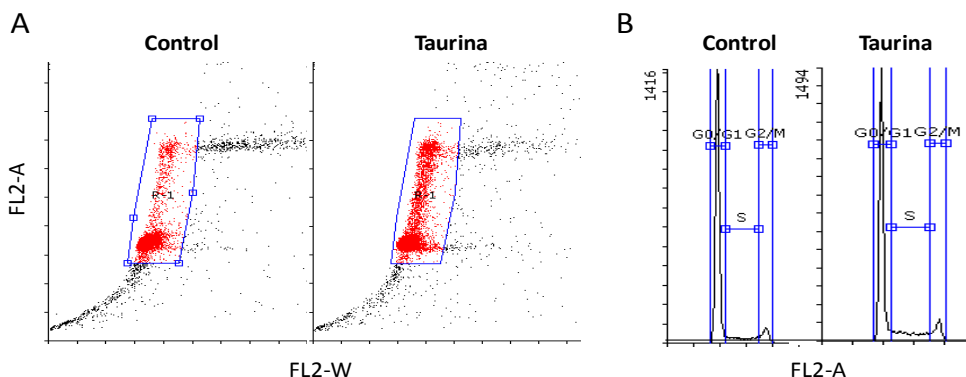


Figura 5.1. La taurina modifica la distribución de las CPN en las fases del ciclo celular. El ciclo celular de las CPN se evaluó por citometría de flujo. Brevemente, las CPN cultivadas en presencia o ausencia de taurina se disgregaron con una solución de tripsina-verseno y se lavaron con PBS. Las muestras (800,000 células por condición) se fijaron con etanol a -20°C en agitación constante; posteriormente se centrifugaron, el *pellet* se rehidrató con PBS+BSA (0.2%) y se transfirieron a una solución de yoduro de propidio. Las muestras se procesaron en un FACScan, el cual colectó 20,000 eventos por condición. Los resultados se analizaron con el programa FlowingVersion2.5.0. **A.** Total de eventos capturados y la población seleccionada (en rojo) para el análisis del ciclo celular. **B.** Distribución de las CPN en las fases del ciclo celular, donde se distinguen tres poblaciones: G0/G1 (control $87.6 \pm 2.7\%$; taurina $81.4 \pm 3.1\%$), S (control $7.7 \pm 1.9\%$; taurina $11.8 \pm 2\%$) y G2/M (control $4.3 \pm 0.9\%$; taurina $6.5 \pm 0.6\%$).

El tiempo y espacio de acción de la taurina en las CPN

El efecto más evidente de la taurina en las CPN es sobre la proliferación. Para indagar el mecanismo que favorece la proliferación, se buscó el tiempo y lugar requerido por la taurina para lograr su efecto, lo cual se realizó mediante el cultivo de las CPN con pulsos de taurina de diferente duración (fig. 5.2) y la ubicación subcelular que la taurina adquiere en las CPN (fig. 5.3).

Los cultivos tradicionales de CPN, en ausencia de taurina, mostraron un porcentaje de incorporación de BrdU de 5.8% a las 3 horas, luego de sembrar las células (figura 5.2A protocolo a y fig. 5.2B barra blanca). La suplementación de taurina en el medio de cultivo, aumentó la incorporación de BrdU hasta 13.8% (fig. 5.2A protocolo b y 5.2B barra negra); dicho porcentaje no se modificó significativamente por la adición de la taurina durante el tiempo de disgregación para la resiembra (fig. 5.2A protocolo c; 5.2B barra gris). Cuando la taurina se adicionó solo durante el periodo de disgregación o durante las primeras horas del cultivo (fig. 5.2A protocolo d y e; 5.2B barra punteada) el porcentaje de incorporación de BrdU fue similar al obtenido en la condición control. Mientras que las células crecidas en el pase anterior en presencia de taurina, aunque se disgreguen y resiembrén en un medio control, muestran un aumento en la incorporación de BrdU (fig. 5.2A, protocolo f; 5.2B barra rayada).

Existe la posibilidad de que la síntesis del DNA se modifique por interacciones directas de la taurina en el núcleo de las CPN o bien, que actúe desde el citoplasma. Para determinar a qué nivel subcelular se sitúa la taurina, se identificó el espacio en el que se distribuye tras incorporarse a las CPN. En las células disociadas de las neuroesferas cultivadas con o sin taurina, se realizó una secuencia de cortes con microscopia confocal para observar la ubicación de la taurina detectada por inmunocitoquímica en planos tridimensionales. En las CPN cultivadas en un medio con taurina, ésta se ubicó en el citosol, pero no en el núcleo; las CPN generadas en un medio control fueron negativas al anticuerpo anti-taurina (fig. 5.3).

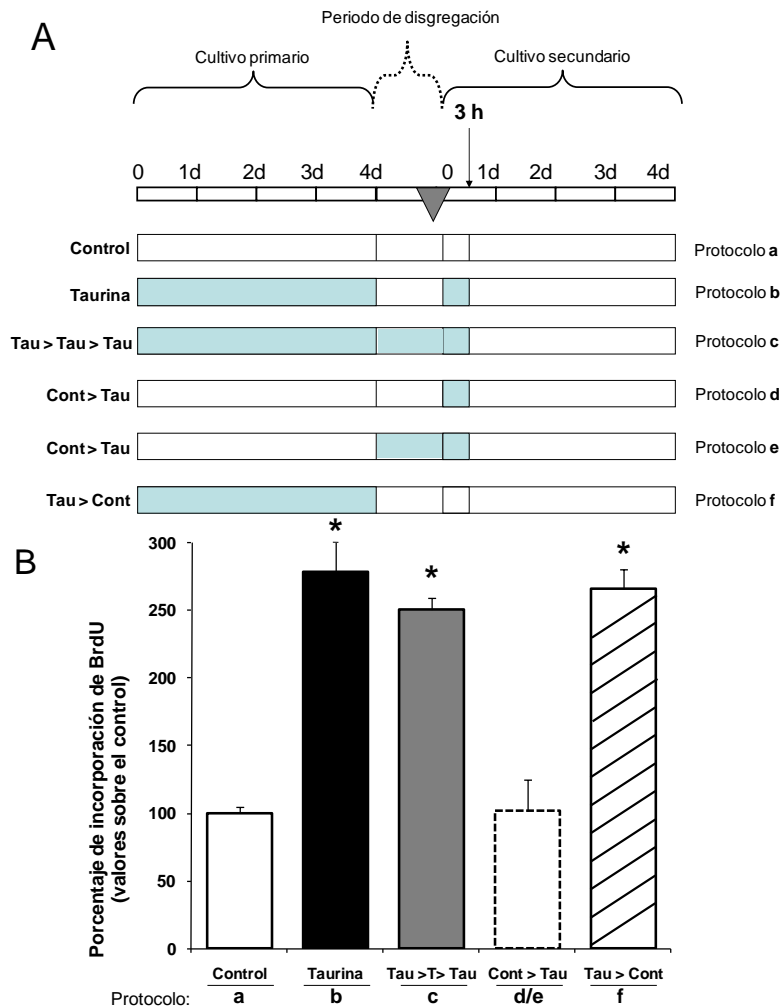


Figura 5.2. Localización temporal de la acción de la taurina en la proliferación de las CPN. **A.** Protocolos de suplementación de taurina en los cultivos de neuroesferas. El análisis se realizó en dos cultivos consecutivos, para considerar la etapa de disgregación de neuroesferas y resiembra. Las barras horizontales en azul indican los tiempos de exposición de las células al medio con taurina, mientras que los espacios en blanco, la condición control. Donde d= días en cultivo; la punta de flecha gris, indica el inicio del nuevo cultivo (tiempo de 0h); la flecha negra, señala el momento de evaluación de la incorporación de BrdU (tiempo de 3h). **B.** Porcentaje de incorporación de BrdU de los cultivos con taurina suplementada en diferentes tiempos. Se aplicó un pulso de $10\mu\text{M}$ de BrdU de 1.5h previo al tiempo de evaluación de 3h. Las células se procesaron mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-BrdU y AlexaFluor 488. Se evaluó el número de células positivas a BrdU, respecto al total de núcleos identificados por Hoechst, en fotografías capturadas con un aumento 10x. Las barras representan el porcentaje de aumento sobre el control, y son promedios \pm EE de 6 experimentos. Las diferencias son significativas respecto al control con $*P<0.05$.

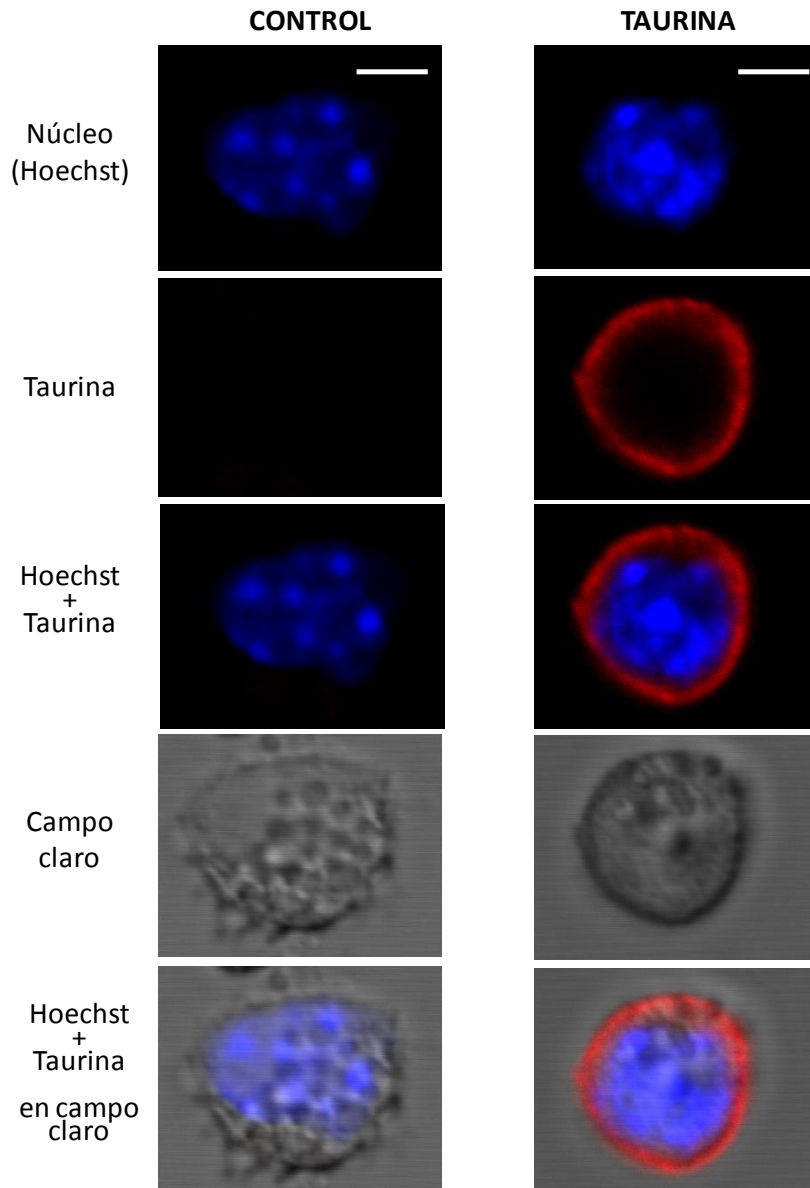


Figura 5.3. La localización subcelular de la taurina en las CPN adultas. Las neuroesferas derivadas de la zona subventricular de ratones adultos crecidas en ausencia o presencia de taurina, se disociaron mecánicamente y se incubaron sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina durante una hora. Las células se fijaron con paraformaldehído (al 4%), posteriormente se bloquearon y permeabilizaron con una solución de PBS+BSA (0.1%)+GS (10%) a temperatura ambiente (1h). Las CPN se incubaron por 24h con el anticuerpo anti-taurina [1:200] a 4°C, seguido por la incubación con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 [1:200]. Los núcleos se identificaron con Hoechst [1:500]. Las células se observaron en un microscopio confocal Olympus IX71 y se fotografiaron los planos del eje Z a una distancia de 0.75µm entre ellos. Se observan las imágenes representativas del plano ubicado en el centro de la célula en los canales indicados: azul, hoechst; rojo, taurina; escala de grises, campo claro. La columna izquierda muestra las imágenes de las CPN crecidas en medio de proliferación control y la columna derecha son las CPN crecidas en medio de proliferación suplementado con taurina. Barra de escala = 5µM.

La influencia de la taurina en la expresión génica en las CPN adultas

El efecto de la taurina en la proliferación, no es una respuesta inmediata (fig. 5.2A protocolo d y e), sino que requiere de un tiempo largo en el medio de cultivo (fig. 5.2A protocolo b y f) y además se sitúa a nivel del citoplasma de las CPN (fig.5.3); por ello se realizó un microarreglo para identificar las posibles vías de señalización celular modificadas por la taurina en las CPN. El microarreglo consideró los genes de la especie *Mus musculus* y se realizó con muestras de células derivadas de neuroesferas crecidas en un medio control o suplementado con taurina. Los resultados se filtraron por el valor Z obtenido con la herramienta *Gen Arise*; para el análisis se consideraron los genes con valores absolutos superiores a 1.5. Los genes seleccionados con este criterio fueron 2177, de los cuales 1218 disminuyeron su expresión y 959 la aumentaron en presencia de taurina. Estos dos grupos se analizaron con el programa bioinformático DAVID 6.7, el cual selecciona y relaciona los genes dentro de grupos funcionales, y se obtuvieron cambios significativos con la taurina en cinco grupos de genes relacionados con los procesos de: proliferación (20 genes), supervivencia (3 genes), apoptosis (4 genes), adhesión o migración (6 genes) y metabolismo mitocondrial (6 genes) (Tabla 5.1).

Genes de las CPN regulados en presencia de taurina

Proliferación		Supervivencia/Muerte		Metabolismo mitocondrial		Moléculas de adhesión/migración	
▲	▼	▲	▼	▲	▼	▲	▼
PKCα NM011101	IGFR1 AK020732	DAPK AK013153	UBE1 AF288694	PEPCK NM_011044	NOX NM007807	ICAM M31585	
PKCϵ NM011104	FGFR1 NM_010206	TRADD AK018592	UBE2B AK011961	CxIV BC017818		CAM23 AK009330	
IGFR AF056187	SOS Z11664	Bcl-2 NM_009743	UBE3B AF244362	CxI BC002163		CAM9 NM_020293	
FAK NM_007982	RAS NM_010937		HIP2 NM_016786	Cyto-oxidasa NM_007747		JAM2 AF255911	
WNT2 NM_023653	Rac/Rho X57277			Cyto-reductasa BC003423		PCAM1 NM008816	
WNT5b NM_009525	WNT16 NM_053116					P120CTN NM_007615	
SHH X76290	WNT3 NM_009521						
Sufu NM_015752	βCatenina NM_007614						
GLI1 NM_010296	Miz1 NM_018812						
JAK NM_008413	APC NM_007462						

Tabla 5.1. Los genes se obtuvieron mediante un análisis con el programa DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), en el que se utilizaron las herramientas de agrupación funcional y las bases de datos Biocarta y KEGG (de las vías de señalización). Se consideró un nivel de confianza estadística de $P \leq 0.05$ (con Fisher) y $P \leq 0.09$ (con EASE), para la selección de los genes relacionados dentro de una vía de señalización. Finalmente se realizó un filtro de los genes relevantes para las células troncales neurales. Se indican los genes con regulación positiva (▲) o negativa (▼) y el número de identificación (indicado bajo el nombre de cada gen) de la base de datos GENBANK.

VIII. DISCUSIÓN

Esta investigación utilizó las células precursoras neurales (CPN) de tejido cerebral de diferente origen: i) del mesencéfalo embrionario de ratón de 13.5 días de gestación, ii) de la zona subventricular de cerebros de ratones adultos y iii) del cerebro fetal humano de 15 a 16 semanas de gestación. El cerebro embrionario y fetal contiene CPN en gran número; mientras que en el cerebro adulto, solo se ubican en dos regiones: la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo. Las CPN extraídas y cultivadas en el medio apropiado, proliferan y generan neuroesferas (Rietze y Reynolds, 2006). Independientemente del origen de las CPN, las neuroesferas obtenidas en este estudio fueron similares en su morfología y comportamiento en el cultivo; así mismo, la mayoría de las células formadoras de las neuroesferas fueron positivas a nestina y por lo tanto consideradas como CPN. Las neuroesferas se integran por células troncales y progenitoras, y aunque su identidad no se determina por marcadores únicos, la presencia de nestina es ampliamente aceptada como un marcador general de las CPN (Lowell *et al.*, 2006). Adicionalmente, la capacidad de autorrenovación y la multipotencialidad, otras de las características de la troncalidad, se demostraron por la disociación, resiembra y producción de varias generaciones de neuroesferas secundarias similares a las neuroesferas del cultivo primario, así como por la obtención de células de origen glial y neuronal cuando se sembraron en un medio de diferenciación (Hernández-Benítez *et al.*, 2010b; 2012; 2013).

El efecto de la taurina en el aumento del número de CPN

El presente estudio mostró que la taurina aumenta el número de las CPN en los cultivos de neuroesferas. El efecto se observó independientemente del origen de las células (cerebro embrionario murino, adulto murino y fetal humano). El mayor incremento se registró en las CPN de la zona subventricular del cerebro adulto (120%) (Hernández-Benítez *et al.*, 2012). Este efecto es uno de los mayores reportados ante la adición de cualquier otra molécula al medio

tradicional de cultivo, incluidas la melatonina, la dopamina o los neuropéptidos (O'Keefe *et al.*, 2009; Sotthibundhu *et al.*, 2010; Thiriet *et al.*, 2001).

En el modelo murino, es interesante notar que el efecto de la taurina en el número de las CPN adultas superó por mucho al efecto en las CPN embrionarias (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a; 2012); la razón de esta diferencia se podría relacionar con el ambiente fisiológico rico en taurina en el crecen las células embrionarias, mientras que en el cerebro adulto los niveles de taurina son bajos (Miranda-Contreras *et al.*, 2000; Sturman, 1993). En apoyo a esta consideración, un estudio con neuroesferas derivadas de la zona subventricular de cerebros de rata, muestra que si se cultivan con explantes de corteza de cerebro embrionario, aumenta el número de CPN debido a la liberación de factores difusibles del tejido embrionario (Agasse *et al.*, 2006). La taurina podría ser uno de esos factores, ya que el contenido de taurina es muy alto en el tejido embrionario y el efecto proliferativo se observa únicamente cuando las células se exponen a la corteza embrionaria y no con los explantes de corteza adulta (Miller *et al.*, 2000).

Un estudio reciente de Shivaraj *et al.* (2012) que utiliza las CPN embrionarias del hipocampo de ratón confirmó el efecto de la taurina en las CPN embrionarias murinas reportado por primera vez en esta investigación (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a); en ambos casos, la taurina aumentó el número de CPN con una magnitud similar. Los estudios realizados en las CPN de roedores son interesantes y muestran un efecto claro de la taurina. Sin embargo, al considerar el potencial uso de la taurina como un factor enriquecedor del medio de trasplante en las estrategias de reemplazo neural, era importante corroborar su efecto en células de origen humano. Hasta la fecha, este es el único estudio del efecto de la taurina en las CPN aisladas de cerebros fetales humanos (Hernández-Benítez *et al.*, 2013); los resultados mostraron que la taurina aumentó el número de células en una proporción similar a la observada en el modelo murino.

La taurina en la proliferación y supervivencia de las CPN

La mayor cantidad de CPN observada en los cultivos con taurina puede ser consecuencia del aumento en la supervivencia o en la proliferación celular. La taurina tiene diversas acciones biológicas, entre ellas la osmorregulación, la modulación de la homeostasis del calcio, la estabilización de membranas y las acciones antioxidantes, algunas de las cuales podrían proteger a las CPN de las condiciones adversas que se presentan en las distintas etapas del cultivo (El Idrissi, 2008; Pasantes-Morales y Cruz, 1985a; Pasantes-Morales y Cruz, 1985b; Schaffer *et al.*, 2009; Sebring y Huxtable, 1986).

Los resultados de esta investigación mostraron que el incremento en el número de las CPN en los cultivos con taurina derivó de una acción sobre la proliferación celular, sin que se hayan detectado cambios en la viabilidad. Sin embargo, la taurina por sí sola no es un agente mitógeno ya que no indujo la proliferación ni la formación de neuroesferas en ausencia de los factores de crecimiento. Así, la taurina solo estimula la proliferación una vez que los factores han iniciado el proceso.

El efecto de la taurina sobre la proliferación se observó en los dos modelos murinos analizados, en los que la taurina aumentó significativamente el número de células positivas a BrdU (Hernández-Benítez *et al.*, 2010b; 2012); pero ya que un aumento en la incorporación de BrdU puede resultar de una mayor tasa tanto en la reparación como en la replicación del DNA, fue necesario evaluar las otras fases del ciclo celular. La cuantificación del porcentaje de células en las fases G0/G1, S y G2/M, mediante citometría de flujo, corroboró un aumento en la cantidad de las CPN que replican el DNA en la fase S en presencia de la taurina (Hernández-Benítez *et al.*, en preparación).

En las CPN de mesencéfalo embrionario de ratón, el aumento en la proliferación inducido por la taurina se registró hacia los últimos días del cultivo. Las CPN cuantificadas al finalizar el cultivo aumentaron un 39% (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a). Este resultado corresponde con los datos de Shivaraj *et*

al., (2012) los cuales muestran que la taurina induce un aumento en la incorporación de EdU (un análogo funcional del BrdU) y provoca un aumento del 28% en las CPN derivadas del hipocampo murino (Shivaraj *et al.*, 2012).

En las CPN de ratones adultos, a diferencia de los cultivos de las CPN embrionarias, el aumento en la cantidad de células positivas a BrdU no se registró en los días finales del cultivo sino durante las primeras horas (1.5 - 12h). En este corto tiempo, la presencia de taurina provocó que más células alcanzaran una máxima actividad replicativa y en pocas horas, en comparación con los controles. Este efecto generó un incremento en el número celular en los cultivos desde las 24 horas. Luego de este tiempo, pese a que disminuyó la diferencia en la incorporación de BrdU (hasta desaparecer a partir de las 72h) entre los cultivos control y taurina, la divergencia establecida en las horas iniciales marcó la ventaja en el número de células en los cultivos con taurina, la cual se mantuvo hasta finalizar el cultivo. Es decir, pese a la similitud de las tasas de incorporación de BrdU entre las 72 y 96 h del cultivo, los cultivos con taurina contienen más células que los controles a todos los tiempos luego de las 24 h iniciales (Hernández-Benítez *et al.*, 2012).

En los estudios con las CPN de cerebro fetal humano, no se midió la proliferación celular. Sin embargo, los resultados mostraron que la taurina no tuvo una acción directa en la viabilidad celular, lo que indirectamente sugiere un efecto en la regulación positiva de la proliferación, similar al que ocurre en las CPN murinas.

El mecanismo por el cual la taurina incrementa la proliferación de las CPN aún no se conoce con detalle. Las evidencias sobre los posibles efectos de la taurina en la proliferación celular son conflictivas, pues se reportan efectos proliferativos y antiproliferativos en distintos tipos celulares (Jeon *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2013; Yoshimura *et al.*, 2005). Por un lado, los efectos antiproliferativos de la taurina generalmente se presentan en células que tienen un ciclo alterado, como en las células causantes de la fibrosis hepática, en las células de cáncer cervical humano y en las células vasculares anormales que

provocan la arterosclerosis; en estas células cancerosas la taurina disminuye la proliferación de manera dosis dependiente. Se propone que este efecto es debido a una acción que ayuda a detener a las células en la fase G0 o a aumentar su apoptosis (Kim y Kim, 2013; Liang *et al.*, 2013; Yoshimura *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1999). Por otro lado, el efecto proliferativo es consistente entre los estudios que añaden taurina a los cultivos de células inmaduras o con característica de célula troncal fisiológicamente normal; por ejemplo, un estudio realizado por Chen *et al.*, (1998) en cultivos de neuroblastos fetales humanos encontró que la taurina incrementa la proliferación celular; otras investigaciones concluyen que la taurina regula positivamente la proliferación por la activación de la cinasa ERK1/2 en los cultivos de CPN de hipocampo y en osteoblastos (Jeon *et al.*, 2007; Shivaraj *et al.*, 2012); mientras que un estudio *in vivo* señala que la taurina es un factor neurotrófico que promueve la proliferación de las células del cerebro fetal de ratas con crecimiento intrauterino restringido, mediante la activación de la vía PKCa-CREB (Liu *et al.*, 2013). Es necesario aclarar que los trabajos descritos anteriormente sobre el efecto de la taurina en la proliferación, solo correlacionan la presencia de la taurina con el aumento o reducción de la actividad de algunas proteínas pertenecientes a las vías generales de la proliferación como ERK o CREB, pero hasta la fecha ninguno de los trabajos ha descrito la vía por cual la taurina conduce a la modulación de esas proteínas. Aunque no se detectó una acción de la taurina que mejorara la viabilidad celular, el presente trabajo no excluye por completo una acción citoprotectora de la taurina en las CPN, por medio de la cual se pudiera favorecer el progreso de la proliferación celular, como consecuencia de una mejor preservación de la estructura y función de las membranas o de los elementos nucleares y mitocondriales. Diversas posibilidades pueden ser contempladas, al considerar las funciones conocidas de la taurina. Podría ser que la taurina: i) participe como antioxidante, ii) interaccione con la cromatina nuclear iii) module la migración de las CPN o sus moléculas de adhesión o iv) interactúe con determinadas proteínas (incluidos receptores membranales) relacionadas con algunas vías de proliferación.

La primera posibilidad, basada en el curso temporal de la actividad proliferativa de las CPN de cerebro adulto, es que la disgregación mecánica de las neuroesferas (requisito durante las resiembras) genere radicales libres debido a las células que mueren. Estas condiciones adversas afectarían los procesos involucrados en la síntesis del DNA, lo cual se podría prevenir o reducir por la taurina. La actividad antioxidante de la taurina está bien documentada aunque su mecanismo aún se desconoce. La taurina podría influir en la proliferación vía un efecto en el estado redox de las células, el cual se sabe que regula la síntesis del DNA y la proliferación en varios tipos celulares, incluso en las CPN (Sharma *et al.*, 2008). Las propiedades antioxidantes de la taurina reflejadas en la prevención del desbalance redox se han reportado en diversos tipos celulares (Kim y Wong, 2009); así en presencia de taurina, las CPN podrían conservar o alcanzar condiciones favorables para la proliferación desde las primeras horas del cultivo. Sin embargo, algunos datos preliminares con otros antioxidantes generales (trolox, n-acetilcisteína, ácido ascórbico, ácido pirúvico) no aumentan el número de las CPN, a diferencia de lo que se observa con el uso de la taurina (datos no mostrados).

Otra posibilidad es que la taurina ejerza su acción sobre la proliferación al interactuar con la estructura de la cromatina en el núcleo de las CPN. Existe evidencia de la presencia de taurina en los núcleos de determinados tipos celulares (Lobo *et al.*, 2000a; Lobo *et al.*, 2000b). Así la taurina podría, mediante interacciones electrostáticas o hidrofóbicas con el DNA, favorecer condiciones más propicias en la configuración de la cromatina para la replicación (Buche *et al.*, 1989). Sin embargo, este mecanismo se descarta (al menos en las CPN adultas) ante las observaciones del presente estudio acerca de la distribución subcelular de la taurina que la ubican solo en el citoplasma y no en el núcleo de las CPN (Hernández-Benítez *et al.*, en preparación).

La tercera posibilidad considerada deriva de la observación de neuroesferas más grandes en los cultivos con taurina (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a; 2013). La taurina podría afectar los contactos entre las células formadoras de neuroesferas y a través de este mecanismo acelerar la

proliferación celular y formar neuroesferas más grandes. Un estudio con CPN humanas, describe una correlación lineal entre el tamaño de las neuroesferas y la tasa de proliferación (Mori *et al.*, 2006). El mecanismo molecular propuesto para esta acción es la activación de la señalización de Notch inducida por el contacto célula-célula durante la agregación. La taurina podría incrementar la adhesión celular o acelerar la migración de las CPN, pues está reportado que la taurina modula la expresión de algunas moléculas de adhesión en cultivos de neuronas y favorece la migración (Moran *et al.*, 1996), asimismo los resultados del análisis del microarreglo señalan una regulación de la expresión de moléculas relacionadas con procesos de adhesión (Hernández-Benítez *et al.*, en preparación). La taurina contribuiría a que las CPN se acerquen más rápido, entren en contacto y en consecuencia inicie la proliferación más temprano.

Finalmente, otra de las posibilidades propuestas, es que la taurina active directamente alguna vía de señalización que regule la proliferación. Se sabe que otros aminoácidos, particularmente el glutamato y el GABA, incrementan la proliferación de las CPN por un mecanismo mediado por sus respectivos receptores (Haydar *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2011). Existe la posibilidad de que el efecto de la taurina en el aumento de la proliferación de las CPN estuviera mediado por una interacción con esos receptores, ya que hay evidencia que muestra que la taurina a concentraciones altas, como las utilizadas en esta investigación, puede actuar como agonista de los receptores de GABA_A o de glicina y producir corrientes de cloro (Albrecht y Schousboe, 2005; Wang *et al.*, 1998; Wu y Xu, 2003). Sin embargo, este no fue el caso en las CPN adultas de ratón, ni en las CPN fetales humanas; mientras que en las CPN embrionarias no se analizó esa posibilidad (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a; 2012). Un estudio señala que el GABA interacciona con los receptores a los factores de crecimiento durante una fase temprana del desarrollo, lo cual provoca que el GABA estimule la proliferación solo en las CPN embrionarias obtenidas de etapas muy tempranas y no en las CPN derivadas de la etapa adulta, por lo cual queda por demostrar si existe una interacción de la taurina con esos receptores en las CPN embrionarias (Fukui *et al.*, 2008).

Los resultados más recientes sobre el mecanismo de acción de la taurina en las CPN indican que no se trata de una acción inmediata producto de la activación de un receptor en particular que conduzca a un aumento en la proliferación, pues se requiere un largo periodo de incubación de las CPN en un medio suplementado con taurina para lograr su efecto. Además una vez que la taurina es incorporada por las células, se distribuye en el citoplasma sin alcanzar el compartimiento nuclear, lo que permite ubicar espacial y temporalmente su mecanismo de acción. De acuerdo al análisis bioinformático de los resultados del microarreglo, las CPN cultivadas en presencia de taurina regulan la expresión de cuatro categorías funcionales de genes (Hernández-Benítez *et al.*, en preparación). En presencia de taurina, las CPN regulan positivamente algunas proteínas del metabolismo mitocondrial; en este respecto hay un trabajo reciente que indica que la taurina podría desempeñar una función determinante en las mitocondrias, pues la deficiencia de taurina se correlaciona con una enfermedad mitocondrial causada por la disminución en la transcripción de proteínas de la cadena transportadora de electrones (Schaffer *et al.*, 2013). Si este fuera el caso, la presencia de la taurina podría mejorar el potencial de mitocondrial de las CPN y con ello favorecería un estado óptimo para el progreso del ciclo celular. Además, esta hipótesis se apoya con los resultados que indican una regulación negativa de la expresión de un grupo de ubiquitinas, en las CPN con taurina, lo que sugeriría un efecto sobre la viabilidad, que sin embargo no se visualizó con la técnica de exclusión de azul tripano utilizada en los estudios iniciales. Por ello será necesario reevaluar los efectos de la taurina en la viabilidad mediante técnicas más precisas. El análisis del microarreglo también reveló un aumento en los niveles del RNA mensajero de al menos 15 proteínas relacionadas con la proliferación de células troncales neurales, de las cuales la más relevante (en función del aumento en sus niveles) fue Sonic Hedgehog (Shh). El mensajero de Shh aumentó junto con otras proteínas de su vía (incluidas: Sufu, GLI1 y Wnt), lo que la convierte en un buen candidato para explicar el aumento en la proliferación. Actualmente se siguen estas vertientes de la investigación, para comprobar, con ensayos funcionales, el mecanismo de acción de la taurina en las CPN.

La acción de la taurina sobre las células troncales del cultivo de neuroesferas

El efecto de la taurina en la proliferación celular de las CPN podría ocurrir en las células troncales o en las progenitoras neurales, ya que las neuroesferas son agregados heterogéneos que contienen ambos tipos de células, en su mayoría progenitoras y en menor medida troncales. Los cultivos de CPN a una baja densidad permiten abordar ese cuestionamiento, al minimizar las posibilidades de coalescencia entre las células progenitoras e incrementar la posibilidad de la formación de neuroesferas derivadas de las células troncales. Aunque esta aproximación no proporciona una evidencia rigurosa de clonalidad, un cultivo a baja densidad (de entre 5-50 células/ μL) se considera una condición en la que cada una de las neuroesferas tiene una alta probabilidad de formarse a partir de una célula troncal (Campos, 2004). La densidad celular que se usó en este estudio fue de 25 células/pozo (o 0.25 células/ μL , en 100 μL) y es de las más bajas utilizadas entre los estudios actuales. La eficiencia clonal obtenida (número de neuroesferas formadas respecto al total de células iniciales) fue de 1.3% y es cercana a la eficiencia de 2% calculada por Engstrom *et al.*, (2002) con el ensayo de célula única (Engstrom *et al.*, 2002). Los resultados que mostraron que la taurina aumenta el número de neuroesferas formadas a baja densidad, hasta una eficiencia clonal de 3.6%, sustentan la propuesta de que el efecto de la taurina ocurra en las células troncales neurales, además de su efecto en las progenitoras. Aunque este ensayo solo se exploró con el modelo de las CPN subventriculares de cerebro adulto (Hernández-Benítez *et al.*, 2012), es posible suponer que ocurra de manera similar en las CPN embrionarias y fetales.

Los niveles de taurina en las CPN

Las células disociadas del tejido fresco de cerebros embrionarios murinos y fetales humanos, presentaron altos niveles de taurina (cerca de 12 y 5 mM, respectivamente), un resultado que concuerda con las elevadas concentraciones típicas de los cerebros en desarrollo (Agrawal *et al.*, 1971; Sturman y Gaull,

1975). En las células obtenidas de la corteza y de la zona subventricular de cerebros de ratones adultos el contenido de taurina fue notablemente menor, en concordancia con los reportes del contenido de taurina en el cerebro adulto (Miller *et al.*, 2000). Cuando las CPN se aíslan de su entorno y se cultivan en ausencia de suero fetal o de otra fuente externa de taurina, como es el caso de los cultivos de neuroesferas, incluso las CPN que derivaron de tejido cerebral en desarrollo, perdieron todo su contenido de taurina a los pocos días de cultivo. Esos datos sugieren que las CPN carecen de la maquinaria endógena para la biosíntesis de taurina. Sin embargo, al añadir taurina al medio de cultivo, las CPN la incorporaron y el contenido de taurina en las CPN alcanzó niveles muy altos, comparables con los que se encuentran fisiológicamente durante el desarrollo. Esto ocurrió con todas las CPN independientemente de su origen, embrionario, fetal o adulto (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a; 2012; 2013). Esta observación indica la existencia de un mecanismo de captura de taurina en las CPN, el cual se exploró en las CPN murinas.

El transportador de taurina en las CPN

Este estudio presenta el primer reporte detallado sobre la expresión y la caracterización funcional del transportador de taurina (TauT) en las CPN obtenidas del mesencéfalo embrionario y de la zona subventricular del cerebro adulto (Hernández-Benítez *et al.*, 2010b; 2012). Se encontró que todas las CPN expresan el TauT, el cual es funcionalmente activo, lo que explica que las CPN incorporen ávidamente la taurina del medio e indica la importancia de este mecanismo para mantener la poza intracelular de taurina en las CPN. El TauT es esencial para regular los niveles de taurina en las células cerebrales, particularmente en el cerebro embrionario, donde la síntesis endógena está ausente (Rassin *et al.*, 1981).

En general, las características del TauT en las CPN, detalladas en este estudio (Hernández-Benítez *et al.*, 2010b), son similares a aquellas reportadas para el TauT de otras células cerebrales y no cerebrales (Fujita *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1992; Voss *et al.*, 2004). La captura de taurina en las CPN muestra un

componente saturable dependiente de Na^+/Cl^- y otro no saturable, independiente de Na^+/Cl^- . Los valores calculados de las constantes cinéticas (V_{max} y K_m) del transportador coincidieron en el rango reportado para otras células cerebrales, incluidas las neuronas en desarrollo, las células granulares de cerebelo, las neuronas corticales y los astrocitos de roedores (Fujita *et al.*, 2006; Sanchez-Olea *et al.*, 1991; Schousboe *et al.*, 1991). El TauT mantiene la poza citosólica de taurina en todas las células, lo cual es de particular importancia en el caso del papel de la taurina como osmolito, ya que las reducciones en la osmolaridad externa evocan una salida inmediata de taurina, de una magnitud proporcional a un estímulo, que puede llegar a vaciar la poza celular. La salida de taurina junto con otros osmolitos orgánicos, contribuye a restablecer el equilibrio osmótico. Tras la corrección de la osmolaridad, el TauT restaura el almacén de taurina intracelular (Sanchez-Olea *et al.*, 1991; Schousboe *et al.*, 1991). Las similitudes de las características del TauT en una variedad de células, incluidas las CPN analizadas aquí, resaltan la importancia de este mecanismo para la homeostasis celular.

Una posibilidad relacionada con la captura de taurina que podría explicar su efecto en la proliferación, es el aumento en volumen posiblemente provocado por la entrada de taurina en las CPN. Hay evidencia de que el crecimiento celular regula la proliferación (Stutzin y Hoffmann, 2006). La taurina acumulada por las CPN podría llevar a un aumento en el volumen celular y por este mecanismo, podría afectar la proliferación. Sin embargo, los otros aminoácidos que se adicionaron a altas concentraciones (tales como la glicina, el gaba, la alanina), se podrían acumular al interior de las células e inducir un aumento en volumen similar, no obstante no mostraron el mismo efecto de la taurina en la proliferación (Hernández-Benítez *et al.*, 2012; 2013).

La influencia de la taurina en la diferenciación de las CPN

La multipotencialidad es una característica funcional importante de las CPN. En las condiciones apropiadas, estas células se diferencian en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos. Los astrocitos se obtienen en mayor cantidad, mientras que el

número de neuronas es bajo (Chojnacki y Weiss, 2008). La distribución de los tipos celulares encontrados en las condiciones control de este estudio, no es diferente de la reportada en los estudios previos sobre la diferenciación de las CPN (Ciccolini y Svendsen, 1998; Tropepe *et al.*, 1999).

En este trabajo se encontró que la taurina aumenta considerablemente el número de neuronas derivadas de la diferenciación de las CPN. En las CPN murinas de adulto (Hernández-Benítez *et al.*, 2012) y especialmente en las CPN fetales humanas (Hernández-Benítez *et al.*, 2013) cultivadas en un medio de diferenciación suplementado con taurina, el aumento observado fue de casi 4 veces en la cantidad de las células positivas a β III-tubulina (marcador de neuronas). Este efecto no se observó en las CPN embrionarias de ratón derivadas del mesencéfalo (Hernández-Benítez *et al.*, 2010a), lo cual concuerda con los resultados descritos posteriormente en las CPN embrionarias derivadas del hipocampo (Shivaraj *et al.*, 2012). La explicación de esta diferencia no es clara, aunque podría ser consecuencia de la etapa de la cual se aíslan las células. Como se describió antes, la concentración de taurina en el cerebro fetal es mucho más alta que en el cerebro adulto, por lo que las CPN adultas crecen y se diferencian en una condición con menos taurina que las embrionarias. El mecanismo a través del cual la taurina produce este efecto en la diferenciación de las CPN no se conoce. Tomando en cuenta el gran número de evidencia que muestra un efecto protector de la taurina ante el estrés oxidativo, una posibilidad que se considera es que la taurina regule el estado redox de las células, ya que las especies reactivas del oxígeno desempeñan un papel crítico en la diferenciación de las CPN hacia el fenotipo neural (Ostrakhovitch y Semenikhin, 2012).

Un estudio reciente indica la importancia de la taurina en la diferenciación de las células troncales de etapas muy tempranas del desarrollo. La restricción del crecimiento fetal es una complicación de la gestación relacionada con el funcionamiento inadecuado de los transportadores de aminoácidos en el trofoblasto (la capa celular que origina a la placenta); en este modelo, la interferencia del TauT induce una reducción del contenido de taurina

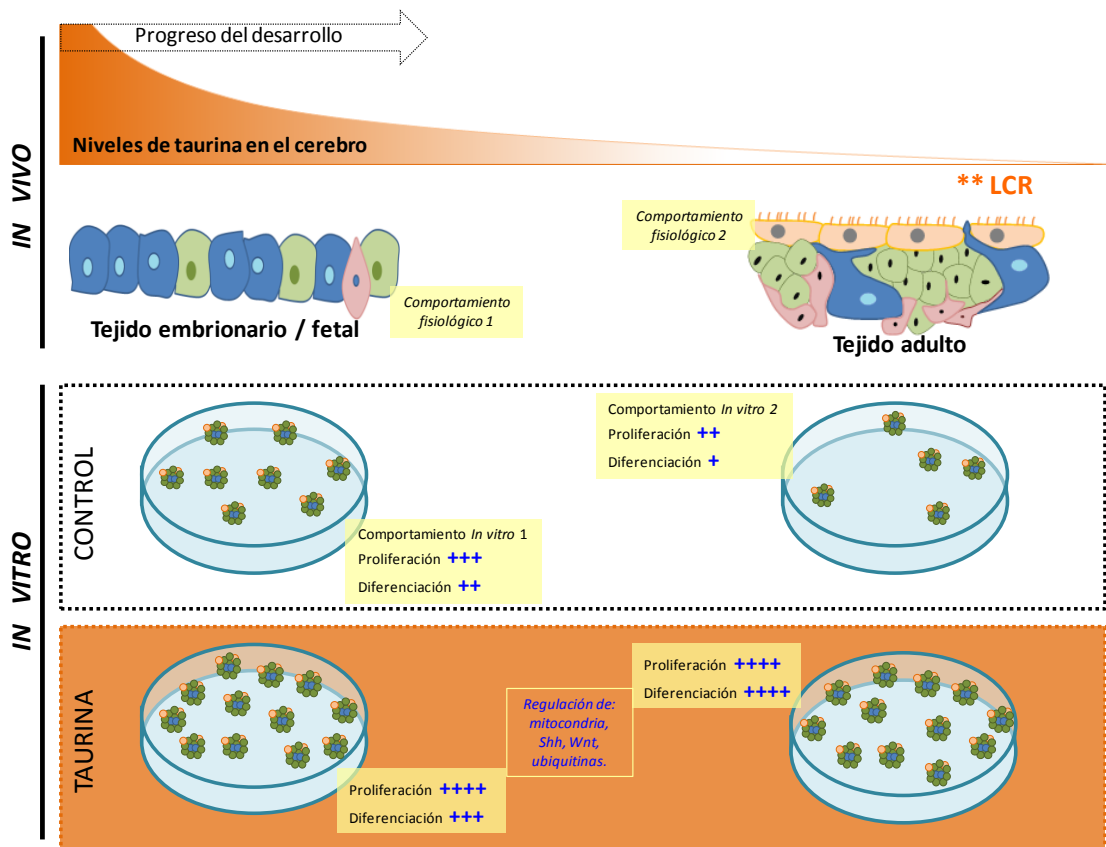
(en condiciones normales es de 10mM) que compromete la diferenciación de las células, incrementa la apoptosis y acentúa los signos de la restricción del crecimiento fetal (Desforgues *et al.*, 2013). Otro estudio con células troncales mesenquimales derivadas del cordón umbilical describe que la taurina favorece la diferenciación hacia células neurales de retina positivas a rodopsina (Jin *et al.*, 2009). En ninguno de estos estudios se propone el mecanismo por el cual la taurina induce sus efectos.

Los estudios iniciales de Sturman *et al.*, muestran que la deficiencia de taurina afecta la diferenciación y la migración de las células del cerebro en desarrollo (Sturman *et al.*, 1980; Sturman *et al.*, 1985; Sturman *et al.*, 1987); luego de tres décadas, la razón del requerimiento de la taurina para el desarrollo óptimo del cerebro es poco conocida. El presente estudio ofrece un sistema experimental útil para clarificar el papel de la taurina en las células cerebrales en desarrollo, pero también evidencia su posible requerimiento en la neurogénesis del cerebro adulto. A este respecto, es interesante mencionar que una de las pocas regiones donde la neurogénesis persiste en el cerebro adulto es la zona subventricular de los ventrículos laterales, la cual provee nuevas neuronas al bulbo olfatorio durante la adultez. Las células de la zona subventricular proliferan y viajan por la vía rostral migratoria hacia los bulbos olfatorios, donde se diferencian y se integran al circuito como neuronas granulares (Lledo *et al.*, 2008). Será importante que futuros estudios evalúen la relación de la taurina en la neurogénesis de adultos, pues el bulbo olfatorio contiene los niveles más altos de taurina en el cerebro maduro y en contraste con la mayoría de las regiones del cerebro, la taurina no disminuye durante la etapa adulta (Miller *et al.*, 2000; Miranda-Contreras *et al.*, 2000). Es posible entonces que los altos niveles de taurina en el bulbo olfatorio respondan a un requerimiento para la óptima migración y diferenciación de las CPN en el cerebro adulto.

Actualmente, algunos estudios utilizan las CPN en experimentos de trasplante en el cerebro en diferentes organismos modelo. Para lograr esos procedimientos, las células requieren señales o factores que favorezcan su supervivencia y su integración funcional al sistema (Fallon *et al.*, 2000; Lepore *et*

al., 2004). La taurina podría ser uno de esos factores. En el caso del cerebro adulto, la zona subventricular contiene células troncales neurales que pueden responder a señales presentes en el líquido cefalorraquídeo de la cavidad ventricular (Zappaterra y Lehtinen, 2012). Además, se sabe que luego de algunos episodios de daño cerebral, como la isquemia, el edema o los traumatismos, hay un aumento en la proliferación de las troncales neurales en el cerebro adulto (Bellenchi *et al.*, 2013; Richardson *et al.*, 2007). La taurina está presente en el líquido cefalorraquídeo y su concentración aumenta considerablemente luego de los mismos episodios de daño cerebral (Seki *et al.*, 2005), por lo cual podría ser una de las señales ligadas a la inducción de la neurogénesis. Adicionalmente, los resultados mostraron que la taurina incrementa la diferenciación hacia las neuronas en el modelo de CPN de la ZSV, un aumento que no ha sido igualado por la adición de ningún otro factor trófico, y que fue corroborado en las CPN derivadas de tejido fetal humano (Hernández-Benítez *et al.*, 2012; 2013). Por lo anterior, los resultados de este estudio pueden ser usados para optimizar el ambiente de la expansión y mantenimiento de las CPN, así como para su aplicación en las estrategias que busquen la diferenciación de las CPN hacia neuronas. En las investigaciones sobre el reemplazo celular que utilizan las CPN en enfermedades o daños cerebrales, la presencia de taurina durante la propagación y el trasplante de CPN podría ser prometedora para superar las dificultades de baja supervivencia e insuficiente diferenciación. También es factible considerar a la taurina como un factor que enriquezca los nichos de la neurogénesis endógena, pues podría proveer un beneficio adicional al suplementar un efecto trófico tanto a las CTN como a las células remanentes del sitio lesionado del SNC, por lo que este estudio abre las puertas a futuras investigaciones que confirmen el papel de la taurina en modelos de trasplante *in vivo*.

IX. RESUMEN GRÁFICO



La influencia de la taurina en las células precursoras neurales. Las células troncales neurales (en azul) se presentan en mayor proporción en la etapa embrionaria y en la fetal; mientras que en el adulto se restringen a algunas regiones, como la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales, en donde reciben señales del líquido cefalorraquídeo (LCR). Las células troncales neurales coexisten con las células progenitoras neurales (en verde), en conjunto llamadas células precursoras neurales (CPN). La taurina, es un aminoácido muy abundante en el cerebro en desarrollo y su concentración declina rápidamente hacia la etapa adulta (gradiente naranja); se conoce poco sobre la razón de su requerimiento, pero su deficiencia causa una ontogenia anormal en el cerebro. Mientras que en el cerebro adulto, cuando ocurren algunos daños cerebrales, como la isquemia o los traumatismos, los niveles de taurina aumentan en el líquido cefalorraquídeo (**LCR); esos daños también son capaces de promover neurogénesis en la ZSV. Para explorar el papel de la taurina, las CPN obtenidas del cerebro embrionario, fetal y de la ZSV de adulto, se aislaron *in vitro* mediante el sistema de neuroesferas en un medio de proliferación en ausencia o presencia de taurina (recuadro blanco vs recuadro naranja). Las CPN dependiendo de su origen, tienen un comportamiento fisiológico que está influenciado por su nicho, en el cual hay una concentración de taurina determinada. Cuando las CPN se aíslan (con medios tradicionales sin taurina) pierden el contenido de taurina, pero la incorporan si ésta es suplementada al medio. La adición de taurina al medio induce un aumento respecto al control, en la proliferación de las CPN y en la proporción de neuronas que se obtienen al diferenciar (comportamiento indicado por los símbolos "+"). Estos efectos se relacionan con una regulación de proteínas como Shh, Wnt, ubiquitinas y proteínas del metabolismo mitocondrial. Por lo tanto, la taurina podría favorecer las condiciones óptimas para el adecuado progreso de la proliferación y la diferenciación de las células precursoras neurales, durante el desarrollo del cerebro y podría ser un factor de relevancia en la neurogénesis de la ZSV de adulto en el entorno fisiológico.

X. CONCLUSIONES

Esta investigación demuestra que la taurina aumenta el número de células troncales y progenitoras neurales obtenidas mediante el sistema de neuroesferas, debido a un aumento en la proliferación celular; mientras que durante la diferenciación, aumenta la cantidad de neuronas. Pese a no observar diferencias en los porcentajes de viabilidad en los cultivos, no se descarta que la taurina ejerza una acción protectora que favorezca la proliferación de las CPN y la sobrevivencia de las neuronas en los cultivos diferenciados. Los resultados sobre el efecto de la taurina en la proliferación y la diferenciación de las CPN, proveen una idea de la razón del requerimiento de la taurina para el desarrollo óptimo del cerebro.

Esta investigación presenta el primer estudio del efecto de la taurina realizado con CPN derivadas de tejido fetal humano. Asimismo, es el primer reporte detallado de la caracterización funcional del transportador de taurina en las CPN. La presencia activa y ubicua del TauT en las CPN, sugiere la importancia para estas células de poseer un mecanismo de incorporación de taurina.

El conjunto de los resultados aquí documentados sobre: i) los efectos de la taurina en la proliferación y en la diferenciación neuronal en las CPN de ratones, ii) la demostración de la presencia funcional del TauT, que les asegura un mecanismo para aumentar los niveles intracelulares de taurina y finalmente, iii) la ratificación de sus efectos en las CPN de cerebros fetales humanos, avalan los beneficios potenciales de la inclusión de la taurina en la manipulación de las CPN. Asimismo abren las posibilidades a futuras investigaciones sobre su uso en los nichos de la neurogénesis como un factor de soporte.

XI. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, donde se realizó la presente investigación.

A la Dra. Herminia Pasantes, la directora de esta tesis.

A los Doctores:

Velasco-Velázquez I., Covarrubias-Robles L. y Ramos-Mandujano G., por su contribución en la realización de esta investigación.

Al jurado evaluador de la tesis, integrado por:

Dra. Selva Rivas Arancibia, Dr. Manuel Salas Alvarado, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dr. Ernesto Maldonado Olvera y Dra. Herminia Pasantes Ordóñez.

La realización de este trabajo contó con el apoyo de los proyectos: PAPIIT IN203410-DGAPA, PAPIIT IN202313-DGAPA (UNAM), CONACyT 98952; así como de la “Beca Nacional para estudios de posgrado de calidad”, CONACyT en el periodo 2009-1 al 2013-2.

XII. REFERENCIAS

- Agasse, F., Benzakour, O., Berjeaud, J. M., Roger, M. y Coronas, V. (2006) Endogenous factors derived from embryonic cortex regulate proliferation and neuronal differentiation of postnatal subventricular zone cell cultures. *Eur J Neurosci*, 23, 1970-1976.
- Agrawal, H. C., Davison, A. N. y Kaczmarek, L. K. (1971) Subcellular distribution of taurine and cysteinesulphinatase decarboxylase in developing rat brain. *Biochem J*, 122, 759-763.
- Ahmed, S. (2009) The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem*, 106, 1-6.
- Albrecht, J. y Schousboe, A. (2005) Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res*, 30, 1615-1621.
- Almarghini, K., Remy, A. y Tappaz, M. (1991) Immunocytochemistry of the taurine biosynthesis enzyme, cysteine sulfinatase decarboxylase, in the cerebellum: evidence for a glial localization. *Neuroscience*, 43, 111-119.
- Altman, J. (1962) Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp Neurol*, 5, 302-318.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. y Butler, J. (1988) The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J*, 256, 251-255.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. y Lindvall, O. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 8, 963-970.
- Baizabal, J. M., Furlan-Magaril, M., Santa-Olalla, J. y Covarrubias, L. (2003) Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res*, 34, 572-588.
- Basak, O. y Taylor, V. (2009) Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1057-1072.
- Bedard, A. y Parent, A. (2004) Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res*, 151, 159-168.
- Beetsch, J. W. y Olson, J. E. (1998) Taurine synthesis and cysteine metabolism in cultured rat astrocytes: effects of hyperosmotic exposure. *Am J Physiol*, 274, C866-874.
- Bella, D. L., Hirschberger, L. L., Kwon, Y. H. y Stipanuk, M. H. (2002) Cysteine metabolism in periportal and perivenous hepatocytes: perivenous cells have greater capacity for glutathione production and taurine synthesis but not for cysteine catabolism. *Amino Acids*, 23, 453-458.
- Bellenchi, G. C., Volpicelli, F., Piscopo, V., Perrone-Capano, C. y di Porzio, U. (2013) Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? *J Neurochem*, 124, 159-167.
- Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R. F., Pagano, S. F. y Parati, E. A. (2003) Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res*, 993, 18-29.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. y Kalayci, O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5, 9-19.
- Bondolfi, L., Ermini, F., Long, J. M., Ingram, D. K. y Jucker, M. (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging*, 25, 333-340.
- Brand, A., Leibfritz, D., Hamprecht, B. y Dringen, R. (1998) Metabolism of cysteine in astroglial cells: synthesis of hypotaurine and taurine. *J Neurochem*, 71, 827-832.

Buche, A., Ouassaidi, A., Hacha, R., Delpire, E., Gilles, R. y Houssier, C. (1989) Glycine and other amino compounds prevent chromatin precipitation at physiological ionic strength. *FEBS Lett*, 247, 367-370.

Cameron, H. A., Hazel, T. G. y McKay, R. D. (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol*, 36, 287-306.

Campos, L. S. (2004) Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res*, 78, 761-769.

Cao, Q. L., Zhang, Y. P., Howard, R. M., Walters, W. M., Tsoulfas, P. y Whittemore, S. R. (2001) Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol*, 167, 48-58.

Ciccolini, F. y Svendsen, C. N. (1998) Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci*, 18, 7869-7880.

Ciccolini, F. (2001) Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development. *Mol Cell Neurosci*, 17, 895-907.

Colas, J. F. y Schoenwolf, G. C. (2001) Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn*, 221, 117-145.

Conte Camerino, D., De Luca, A., Mambrini, M., Ferrannini, E., Franconi, F., Giotti, A. y Bryant, S. H. (1989) The effects of taurine on pharmacologically induced myotonia. *Muscle Nerve*, 12, 898-904.

Crabai, F., Sitzia, A. y Pepeu, G. (1974) Taurine concentration in the neurohypophysis of different animal species. *J Neurochem*, 23, 1091-1092.

Chaichana, K., Zamora-Berridi, G., Camara-Quintana, J. y Quinones-Hinojosa, A. (2006) Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. *Stem Cells*, 24, 2851-2857.

Chanda, R. y Himwich, W. A. (1970) Taurine levels in developing rabbit brain and other organs. *Dev Psychobiol*, 3, 191-196.

Chen, H. I., Bakshi, A., Royo, N. C., Magge, S. N. y Watson, D. J. (2007) Neural stem cells as biological minipumps: a faster route to cell therapy for the CNS? *Curr Stem Cell Res Ther*, 2, 13-22.

Chen, W., Guo, J. X. y Chang, P. (2012) The effect of taurine on cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res*, 56, 681-690.

Chen, X. C., Pan, Z. L., Liu, D. S. y Han, X. (1998) Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol*, 442, 397-403.

Chirumamilla, S., Sun, D., Bullock, M. R. y Colello, R. J. (2002) Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J Neurotrauma*, 19, 693-703.

Chojnacki, A. y Weiss, S. (2008) Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc*, 3, 935-940.

Dayer, A. G., Cleaver, K. M., Abouantoun, T. y Cameron, H. A. (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*, 168, 415-427.

- Deleyrolle, L. P. y Reynolds, B. A. (2009) Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods Mol Biol*, 549, 91-101.
- Desforges, M., Parsons, L., Westwood, M., Sibley, C. P. y Greenwood, S. L. (2013) Taurine transport in human placental trophoblast is important for regulation of cell differentiation and survival. *Cell Death Dis*, 4, e559.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. y Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97, 703-716.
- Dominy, J., Eller, S. y Dawson, R., Jr. (2004) Building biosynthetic schools: reviewing compartmentation of CNS taurine synthesis. *Neurochem Res*, 29, 97-103.
- Dutton, R., Yamada, T., Turnley, A., Bartlett, P. F. y Murphy, M. (1999) Sonic hedgehog promotes neuronal differentiation of murine spinal cord precursors and collaborates with neurotrophin 3 to induce Islet-1. *J Neurosci*, 19, 2601-2608.
- El Idrissi, A. y Trenkner, E. (1999) Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci*, 19, 9459-9468.
- El Idrissi, A. (2008) Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. *Amino Acids*, 34, 321-328.
- Engstrom, C. M., Demers, D., Dooner, M., McAuliffe, C., Benoit, B. O., Stencel, K., Joly, M., Hulsas, R., Reilly, J. L., Savarese, T., Recht, L. D., Ross, A. H. y Quesenberry, P. J. (2002) A method for clonal analysis of epidermal growth factor-responsive neural progenitors. *J Neurosci Methods*, 117, 111-121.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. y Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, 1313-1317.
- Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Opole, R., Baratta, J., Korc, M., Endo, T. L., Duong, A., Nguyen, G., Karkehabadi, M., Twardzik, D., Patel, S. y Loughlin, S. (2000) *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14686-14691.
- Flora, S. J., Chouhan, S., Kannan, G. M., Mittal, M. y Swarnkar, H. (2008) Combined administration of taurine and monoisoamyl DMSA protects arsenic induced oxidative injury in rats. *Oxid Med Cell Longev*, 1, 39-45.
- Fujita, T., Shimada, A., Wada, M., Miyakawa, S. y Yamamoto, A. (2006) Functional expression of taurine transporter and its up-regulation in developing neurons from mouse cerebral cortex. *Pharm Res*, 23, 689-696.
- Fukui, M., Nakamichi, N., Yoneyama, M., Ozawa, S., Fujimori, S., Takahata, Y., Nakamura, N., Taniura, H. y Yoneda, Y. (2008) Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain. *J Cell Physiol*, 216, 507-519.
- Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-1438.
- Gaull, G. E., Rassin, D. K., Raiha, N. C. y Heinonen, K. (1977) Milk protein quantity and quality in low-birth-weight infants. III. Effects on sulfur amino acids in plasma and urine. *J Pediatr*, 90, 348-355.
- Geminard, C., de Gassart, A. y Vidal, M. (2002) Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell*, 26, 205-215.

Giri, S. N., Blaisdell, R., Rucker, R. B., Wang, Q. y Hyde, D. M. (1994) Amelioration of bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters by dietary supplementation with taurine and niacin: biochemical mechanisms. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 10, 137-147.

Goldman, S. (2005) Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol*, 23, 862-871.

Goldman, S. A. y Nottebohm, F. (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 2390-2394.

Gordon, R. E., Shaked, A. A. y Solano, D. F. (1986) Taurine protects hamster bronchioles from acute NO₂-induced alterations. A histologic, ultrastructural, and freeze-fracture study. *Am J Pathol*, 125, 585-600.

Gould, E. (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*, 8, 481-488.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. y Pevny, L. (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39, 749-765.

Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L. y Rakic, P. (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci*, 20, 5764-5774.

Hayes, K. C., Carey, R. E. y Schmidt, S. Y. (1975) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science*, 188, 949-951.

Hayes, K. C., Stephan, Z. F. y Sturman, J. A. (1980) Growth depression in taurine-depleted infant monkeys. *J Nutr*, 110, 2058-2064.

Heird, W. C. (2004) Taurine in neonatal nutrition--revisited. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 89, F473-474.

Hernández-Benítez, R., Pasantes-Morales, H., P Saldana, I. T. y Ramos-Mandujano, G. (2010a) Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J Neurosci Res*, 88, 1673-1681.

Hernández-Benítez, R., Pasantes-Morales, H., Pinzon-Estrada, E. y Ramos-Mandujano, G. (2010b) Functional expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in murine neural precursors. *Dev Neurosci*, 32, 321-328.

Hernández-Benítez, R., Ramos-Mandujano, G. y Pasantes-Morales, H. (2012) Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Res*, 9, 24-34.

Hernández-Benítez, R., Vangipuram, S. D., Ramos-Mandujano, G., Lyman, W. D. y Pasantes-Morales, H. (2013) Taurine enhances the growth of neural precursors derived from fetal human brain and promotes neuronal specification. *Dev Neurosci*, 35, 40-49.

Huxtable, R. J. (1987) From heart to hypothesis: a mechanism for the calcium modulatory actions of taurine. *Adv Exp Med Biol*, 217, 371-387.

Huxtable, R. J. y Sebring, L. A. (1987) Modulation by taurine of calcium binding to phospholipid vesicles and cardiac sarcolemma. *Proc West Pharmacol Soc*, 30, 153-155.

Huxtable, R. J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*, 72, 101-163.

Jacobsen, J. G. y Smith, L. H. (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev*, 48, 424-511.

Jeon, S. H., Lee, M. Y., Kim, S. J., Joe, S. G., Kim, G. B., Kim, I. S., Kim, N. S., Hong, C. U., Kim, S. Z., Kim, J. S. y Kang, H. S. (2007) Taurine increases cell proliferation and generates an increase in [Mg²⁺]_i accompanied by ERK 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett*, 581, 5929-5934.

Jin, W., Xing, Y. Q. y Yang, A. H. (2009) Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 45, 321-327.

Kang, Y. S., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Tomi, M., Hosoya, K. y Terasaki, T. (2002) Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha, taurine and hypertonicity. *J Neurochem*, 83, 1188-1195.

Kataoka, H. y Ohnishi, N. (1986) Occurrence of Taurine in Plants. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 1887-1888.

Kempermann, G., van Praag, H. y Gage, F. H. (2000) Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. *Prog Brain Res*, 127, 35-48.

Kernie, S. G. y Parent, J. M. (2010) Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*, 37, 267-274.

Kim, H. J. y Sun, W. (2012) Adult neurogenesis in the central and peripheral nervous systems. *Int Neurourol J*, 16, 57-61.

Kim, J. y Wong, P. K. (2009) Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes. *J Biol Chem*, 284, 14396-14404.

Kim, T. y Kim, A. K. (2013) Taurine enhances anticancer activity of cisplatin in human cervical cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 776, 189-198.

Lang, F. (2007) Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*, 26, 613S-623S.

Larsson, O. M., Griffiths, R., Allen, I. C. y Schousboe, A. (1986) Mutual inhibition kinetic analysis of gamma-aminobutyric acid, taurine, and beta-alanine high-affinity transport into neurons and astrocytes: evidence for similarity between the taurine and beta-alanine carriers in both cell types. *J Neurochem*, 47, 426-432.

Lee, D. A. y Blackshaw, S. (2012) Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *Int J Dev Neurosci*, 30, 615-621.

Lee, N. Y. y Kang, Y. S. (2004) The brain-to-blood efflux transport of taurine and changes in the blood-brain barrier transport system by tumor necrosis factor-alpha. *Brain Res*, 1023, 141-147.

Lehmann, A. y Hansson, E. (1987) Amino acid content in astroglial primary cultures from different brain regions during cultivation. *Neurochem Res*, 12, 797-800.

Lendahl, U., Zimmerman, L. B. y McKay, R. D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60, 585-595.

Lepore, A. C., Han, S. S., Tyler-Polsz, C. J., Cai, J., Rao, M. S. y Fischer, I. (2004) Differential fate of multipotent and lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult CNS. *Neuron Glia Biol*, 1, 113-126.

Levenson, C. W. y Rich, N. J. (2007) Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. *Nutr Rev*, 65, 412-415.

- Liang, J., Deng, X., Wu, F. S. y Tang, Y. F. (2013) Transcriptomic and proteomic analysis of human hepatic stellate cells treated with natural taurine. *Mol Med Rep*, 7, 1442-1452.
- Liard, O., Segura, S., Pascual, A., Gaudreau, P., Fusai, T. y Moyse, E. (2009) *In vitro* isolation of neural precursor cells from the adult pig subventricular zone. *J Neurosci Methods*, 182, 172-179.
- Lieberwirth, C. y Wang, Z. The social environment and neurogenesis in the adult Mammalian brain. *Front Hum Neurosci*, 6, 118.
- Liu, J., Liu, Y., Wang, X. F., Chen, H. y Yang, N. (2013) Antenatal taurine supplementation improves cerebral neurogenesis in fetal rats with intrauterine growth restriction through the PKA-CREB signal pathway. *Nutr Neurosci*, DOI: 10.1179/1476830513Y.0000000057.
- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Nelson, H., Mandiyan, S. y Nelson, N. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12145-12149.
- Lobo, M. V., Alonso, F. J. y del Rio, R. M. (2000a) Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *J Histochem Cytochem*, 48, 313-320.
- Lobo, M. V., Alonso, F. J. y Martin del Rio, R. (2000b) Immunocytochemical localization of taurine in different muscle cell types of the dog and rat. *Histochem J*, 32, 53-61.
- Lois, C. y Alvarez-Buylla, A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2074-2077.
- Lombardini, J. B. (1976) Regional and subcellular studies on taurine in the rat central nervous system, p. 311-326. IN: *Taurine*, Raven Press Ed., New York.
- Lombardini, J. B. (1985) Taurine effects on the transition temperature in Arrhenius plots of ATP-dependent calcium ion uptake in rat retinal membrane preparations. *Biochem Pharmacol*, 34, 3741-3745.
- Louis, S. A., Rietze, R. L., Deleyrolle, L., Wagey, R. E., Thomas, T. E., Eaves, A. C. y Reynolds, B. A. (2008) Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells*, 26, 988-996.
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. y Smith, A. G. (2006) Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol*, 4, e121.
- Lu, H., Li, M., Song, T., Qian, Y., Xiao, X., Chen, X., Zhang, P., Feng, X., Parker, T. y Liu, Y. (2008) Retrovirus delivered neurotrophin-3 promotes survival, proliferation and neuronal differentiation of human fetal neural stem cells *in vitro*. *Brain Res Bull*, 77, 158-164.
- Lledo, P. M., Merkle, F. T. y Alvarez-Buylla, A. (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*, 31, 392-400.
- Maar, T., Moran, J., Schousboe, A. y Pasantes-Morales, H. (1995) Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int J Dev Neurosci*, 13, 491-502.
- Magnusson, K. R. (1996) Distributions of taurine, glutamate, and glutamate receptors during post-natal development and plasticity in the rat brain. *Adv Exp Med Biol*, 403, 435-444.
- Marcinkiewicz, J. y Kontny, E. (2012) Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*, DOI: 10.1007/s00726-012-1361-4.

- Merezak, S., Hardikar, A. A., Yajnik, C. S., Remacle, C. y Reusens, B. (2001) Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. *J Endocrinol*, 171, 299-308.
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I. y Pillon, D. (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci*, 32, 2042-2052.
- Miller, T. J., Hanson, R. D. y Yancey, P. H. (2000) Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 125, 45-56.
- Ming, G. L. y Song, H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28, 223-250.
- Miranda-Contreras, L., Ramirez-Martens, L. M., Benitez-Diaz, P. R., Pena-Contreras, Z. C., Mendoza-Briceno, R. V. y Palacios-Pru, E. L. (2000) Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Dev Neurosci*, 18, 83-91.
- Moran, J., Maar, T., Gegelashvili, G., Bock, E., Schousboe, A. y Pasantes-Morales, H. (1996) Taurine deficiency and neuronal migration. *Adv Exp Med Biol*, 403, 519-526.
- Mori, H., Ninomiya, K., Kino-oka, M., Shofuda, T., Islam, M. O., Yamasaki, M., Okano, H., Taya, M. y Kanemura, Y. (2006) Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J Neurosci Res*, 84, 1682-1691.
- Moslen, M. T. (1994) Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Adv Exp Med Biol*, 366, 17-27.
- Nagelhus, E. A., Lehmann, A. y Ottersen, O. P. (1993) Neuronal-glia exchange of taurine during hypo-osmotic stress: a combined immunocytochemical and biochemical analysis in rat cerebellar cortex. *Neuroscience*, 54, 615-631.
- Nakashima, T., Takino, T. y Kuriyama, K. (1983) Pretreatment with taurine facilitates hepatic lipid peroxide formation associated with carbon tetrachloride intoxication. *Jpn J Pharmacol*, 33, 515-523.
- Nelson, A. D. y Svendsen, C. N. (2006) Low concentrations of extracellular FGF-2 are sufficient but not essential for neurogenesis from human neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 33, 29-35.
- Nelson, A. D., Suzuki, M. y Svendsen, C. N. (2008) A high concentration of epidermal growth factor increases the growth and survival of neurogenic radial glial cells within human neurosphere cultures. *Stem Cells*, 26, 348-355.
- Neuringer, M. y Sturman, J. (1987) Visual acuity loss in rhesus monkey infants fed a taurine-free human infant formula. *J Neurosci Res*, 18, 597-601.
- Neuringer, M., Palackal, T., Kujawa, M., Moretz, R. C. y Sturman, J. A. (1990) Visual cortex development in rhesus monkeys deprived of dietary taurine. *Prog Clin Biol Res*, 351, 415-422.
- O'Keefe, G. C., Tyers, P., Aarsland, D., Dalley, J. W., Barker, R. A. y Caldwell, M. A. (2009) Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8754-8759.
- Oja, S. S., Uusitalo, A. J., Vahvelainen, M. L. y Piha, R. S. (1968) Changes in cerebral and hepatic amino acids in the rat and guinea pig during development. *Brain Res*, 11, 655-661.

- Oja, S. S., Karvonen, M. L. y Lahdesmaki, P. (1973) Biosynthesis of taurine and enhancement of decarboxylation of cysteine sulphinate and glutamate by the electrical stimulation of rat brain slices. *Brain Res*, 55, 173-178.
- Oja, S. S. y Kontro, P. (1981) Oxidation of hypotaurine *in vitro* by mouse liver and brain tissues. *Biochim Biophys Acta*, 677, 350-357.
- Okuda, H., Tatsumi, K., Makinodan, M., Yamauchi, T., Kishimoto, T. y Wanaka, A. (2009) Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. *J Neurosci Res*, 87, 3546-3553.
- Okumura, N., Otsuki, S. y Kameyama, A. (1960) Studies on Free Amino Acids in Human Brain. *Journal of Biochemistry*, 47, 315-320.
- Olson, J. E. y Li, G. Z. (2000) Osmotic sensitivity of taurine release from hippocampal neuronal and glial cells. *Adv Exp Med Biol*, 483, 213-218.
- Ornitz, D. M. y Leder, P. (1992) Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem*, 267, 16305-16311.
- Ostrakhovitch, E. A. y Semenikhin, O. A. (2012) The role of redox environment in neurogenic development. *Arch Biochem Biophys*.
- Palackal, T., Moretz, R., Wisniewski, H. y Sturman, J. (1986) Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J Neurosci Res*, 15, 223-239.
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F. y Gage, F. H. (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, 19, 8487-8497.
- Parsons, R. B., Waring, R. H., Williams, A. C. y Ramsden, D. B. (2001) Cysteine dioxygenase: regional localization of protein and mRNA in rat brain. *J Neurosci Res*, 65, 78-84.
- Pasantes-Morales, H. (1985) Taurine function in excitable tissues: the retina as a model, p. 33-62. IN: *Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain*, Morgan Editors, Boca Raton FL.
- Pasantes-Morales, H. y Cruz, C. (1985a) Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain Res*, 330, 154-157.
- Pasantes-Morales, H. y Cruz, C. (1985b) Taurine: a physiological stabilizer of photoreceptor membranes. *Prog Clin Biol Res*, 179, 371-381.
- Pasantes-Morales, H., Wright, C. E. y Gaull, G. E. (1985) Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol*, 34, 2205-2207.
- Pasantes-Morales, H., Quesada, O. y Moran, J. (1998) Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol*, 442, 209-217.
- Pasantes-Morales, H., Franco, R., Torres-Marquez, M. E., Hernandez-Fonseca, K. y Ortega, A. (2000) Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem*, 10, 361-370.
- Pasantes-Morales, H., Lezama, R. A., Ramos-Mandujano, G. y Tuz, K. L. (2006) Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med*, 119, S4-11.
- Pasantes-Morales, H. y Cruz-Rangel, S. (2010) Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience*, 168, 871-884.

- Pasantes-Morales, H. y Hernández-Benítez, R. (2010) Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? *Neurochem Res*, 35, 1939-1943.
- Pasantes Morales, H. (1986) Current concepts on the role of taurine in the retina, p. 207-230. IN: *Progress in Retinal Research*, Pergamon Ed., Oxford UK.
- Peck, E. J., Jr. y Awapara, J. (1967) Formation of taurine and isethionic acid in rat brain. *Biochim Biophys Acta*, 141, 499-506.
- Pow, D. V., Sullivan, R., Reye, P. y Hermanussen, S. (2002) Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. *Glia*, 37, 153-168.
- Ramasamy, S., Narayanan, G., Sankaran, S., Yu, Y. H. y Ahmed, S. (2013) Neural stem cell survival factors. *Arch Biochem Biophys*, 534, 71-87.
- Rassin, D. K., Gaull, G. E., Heinonen, K. y Raih, N. C. (1977) Milk protein quantity and quality in low-birth-weight infants: II. Effects on selected aliphatic amino acids in plasma and urine. *Pediatrics*, 59, 407-422.
- Rassin, D. K., Sturman, J. A. y Gaull, G. E. (1981) Sulfur amino acid metabolism in the developing rhesus monkey brain: subcellular studies of taurine, cysteinesulfinic acid decarboxylase, gamma-aminobutyric acid, and glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem*, 37, 740-748.
- Reymond, I., Almarghini, K. y Tappaz, M. (1996) Immunocytochemical localization of cysteine sulfinate decarboxylase in astrocytes in the cerebellum and hippocampus: a quantitative double immunofluorescence study with glial fibrillary acidic protein and S-100 protein. *Neuroscience*, 75, 619-633.
- Reynolds, B. A. y Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-1710.
- Reynolds, B. A. y Weiss, S. (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*, 175, 1-13.
- Reynolds, B. A. y Rietze, R. L. (2005) Neural stem cells and neurospheres re-evaluating the relationship. *Nat Methods*, 2, 333-336.
- Richardson, R. M., Sun, D. y Bullock, M. R. (2007) Neurogenesis after traumatic brain injury. *Neurosurg Clin N Am*, 18, 169-181, xi.
- Rietze, R. L. y Reynolds, B. A. (2006) Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol*, 419, 3-23.
- Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martínez, C., Borgonio-Perez, G., Hiriart-Urdanivia, M., Verdugo-Diaz, L., Duran-Vazquez, A., Colin-Baranque, L. y Avila-Costa, M. R. (2000) Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res*, 82, 7-17.
- Rivas-Arancibia, S., Rodríguez, A. I., Zigova, T., Willing, A. E., Brown, W. D., Cahill, D. W. y Sanberg, P. R. (2001) Taurine increases rat survival and reduces striatal damage caused by 3-nitropropionic acid. *Int J Neurosci*, 108, 55-67.
- Rodríguez-Martínez, E., Rugerio-Vargas, C., Rodríguez, A. I., Borgonio-Perez, G. y Rivas-Arancibia, S. (2004) Antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on oxidative damage in hippocampus caused by the administration of 3-nitropropionic acid in rats. *Int J Neurosci*, 114, 1133-1145.

- Rossant, J. (1976) Investigation of inner cell mass determination by aggregation of isolated rat inner cell masses with mouse morulae. *J Embryol Exp Morphol*, 36, 163-174.
- Rossant, J. y Tam, P. P. (2009) Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*, 136, 701-713.
- Samuelsson, M., Dahl, M. L., Gupta, R. C. y Nordin, C. (2009) Taurine in plasma and CSF: a study in healthy male volunteers. *Amino Acids*, 36, 529-533.
- Sanchez-Olea, R., Moran, J., Schousboe, A. y Pasantes-Morales, H. (1991) Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett*, 130, 233-236.
- Saransaari, P. y Oja, S. S. (1994) Taurine in the developing cat: uptake and release in different brain areas. *Neurochem Res*, 19, 77-82.
- Sawada, M. y Sawamoto, K. (2012) Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J Med*, 62, 13-28.
- Schafer, S., Bicker, G., Ottersen, O. P. y Storm-Mathisen, J. (1988) Taurine-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol*, 268, 60-70.
- Schaffer, S., Takahashi, K. y Azuma, J. (2000) Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids*, 19, 527-546.
- Schaffer, S. W., Azuma, J. y Mozaffari, M. (2009) Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 87, 91-99.
- Schaffer, S. W., Jong, C. J., Warner, D., Ito, T. y Azuma, J. (2013) Taurine deficiency and MELAS are closely related syndromes. *Adv Exp Med Biol*, 776, 153-165.
- Schoenwolf, G. C. y Smith, J. L. (1990) Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development*, 109, 243-270.
- Schousboe, A., Sanchez Olea, R., Moran, J. y Pasantes-Morales, H. (1991) Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res*, 30, 661-665.
- Schwindt, T. T., Motta, F. L., Gabriela, F. B., Cristina, G. M., Guimaraes, A. O., Calcagnotto, M. E., Pesquero, J. B. y Mello, L. E. (2009) Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. *An Acad Bras Cienc*, 81, 443-452.
- Sebring, L. A. y Huxtable, R. J. (1986) Low affinity binding of taurine to phospholiposomes and cardiac sarcolemma. *Biochim Biophys Acta*, 884, 559-566.
- Seki, Y., Kimura, M., Mizutani, N., Fujita, M., Aimi, Y. y Suzuki, Y. (2005) Cerebrospinal fluid taurine after traumatic brain injury. *Neurochem Res*, 30, 123-128.
- Sgubin, D., Aztiria, E., Perin, A., Longatti, P. y Leanza, G. (2007) Activation of endogenous neural stem cells in the adult human brain following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Res*, 85, 1647-1655.
- Sharma, R. K., Zhou, Q. y Netland, P. A. (2008) Effect of oxidative preconditioning on neural progenitor cells. *Brain Res*, 1243, 19-26.
- Shivaraj, M. C., Marcy, G., Low, G., Ryu, J. R., Zhao, X., Rosales, F. J. y Goh, E. L. (2012) Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. *PLoS One*, 7, e42935.

- Singec, I., Knoth, R., Meyer, R. P., Maciaczyk, J., Volk, B., Nikkhah, G., Frotscher, M. y Snyder, E. Y. (2006) Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods*, 3, 801-806.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Wang, C. H., Hartig, P. R., Branchek, T. A. y Weinschank, R. L. (1992) Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol*, 42, 563-569.
- Solaro, R. J. (2011) Regulation of cardiac contractility, MORGAN & Claypool Life Sciences, ID: NBK54079, San Rafael CA.
- Sotthibundhu, A., Phansuwan-Pujito, P. y Govitrapong, P. (2010) Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res*, 49, 291-300.
- Spitze, A. R., Wong, D. L., Rogers, Q. R. y Fascetti, A. J. (2003) Taurine concentrations in animal feed ingredients; cooking influences taurine content. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 87, 251-262.
- Steiner, B., Wolf, S. y Kempermann, G. (2006) Adult neurogenesis and neurodegenerative disease. *Regen Med*, 1, 15-28.
- Stemple, D. L. y Anderson, D. J. (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71, 973-985.
- Stipanuk, M. H. (2004) Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. *Neurochem Res*, 29, 105-110.
- Stover, J. F., Morganti-Kosmann, M. C., Lenzlinger, P. M., Stocker, R., Kempfski, O. S. y Kossmann, T. (1999) Glutamate and taurine are increased in ventricular cerebrospinal fluid of severely brain-injured patients. *J Neurotrauma*, 16, 135-142.
- Sturman, J. A. y Gaull, G. E. (1975) Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *J Neurochem*, 25, 831-835.
- Sturman, J. A., Hepner, G. W., Hofmann, A. F. y Thomas, P. J. (1975) Metabolism of [35S]taurine in man. *J Nutr*, 105, 1206-1214.
- Sturman, J. A., Rassin, D. K. y Gaull, G. E. (1977) Taurine in developing rat brain: transfer of [35S] taurine to pups via the milk. *Pediatr Res*, 11, 28-33.
- Sturman, J. A., Rassin, D. K., Gaull, G. E. y Cote, L. J. (1980) Taurine in developing rhesus monkey brain. *J Neurochem*, 35, 304-310.
- Sturman, J. A., Wen, G. Y., Wisniewski, H. M., Niemann, W. H. y Hayes, K. C. (1981) Taurine and tapetum structure. *Adv Exp Med Biol*, 139, 65-78.
- Sturman, J. A., Moretz, R. C., French, J. H. 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.
- Sturman, J. A., Palackal, T., Imaki, H., Moretz, R. C., French, J. y Wisniewski, H. M. (1987) Nutritional taurine deficiency and feline pregnancy and outcome. *Adv Exp Med Biol*, 217, 113-124.
- Sturman, J. A., Messing, J. M., Rossi, S. S., Hofmann, A. F. y Neuringer, M. D. (1988) Tissue taurine content and conjugated bile acid composition of rhesus monkey infants fed a human infant soy-protein formula with or without taurine supplementation for 3 months. *Neurochem Res*, 13, 311-316.

- Sturman, J. A. (1993) Taurine in development. *Physiol Rev*, 73, 119-147.
- Stutzin, A. y Hoffmann, E. K. (2006) Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol (Oxf)*, 187, 27-42.
- Svensden, C. N. y Caldwell, M. A. (2000) Neural stem cells in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res*, 127, 13-34.
- Takasawa, K., Kitagawa, K., Yagita, Y., Sasaki, T., Tanaka, S., Matsushita, K., Ohstuki, T., Miyata, T., Okano, H., Hori, M. y Matsumoto, M. (2002) Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 299-307.
- Tappaz, M., Almarghini, K., Legay, F. y Remy, A. (1992) Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) from brain: the long and tricky trail to identification. *Neurochem Res*, 17, 849-859.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J. M. y Doetsch, F. (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 279-288.
- Thiriet, N., Jouvert, P., Gobaille, S., Solov'eva, O., Gough, B., Aunis, D., Ali, S. y Zwiller, J. (2001) C-type natriuretic peptide (CNP) regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain. *Eur J Neurosci*, 14, 1702-1708.
- Till, J. E. y McCulloch, E. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-222.
- Tropepe, V., Sibilia, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F. y van der Kooy, D. (1999) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*, 208, 166-188.
- Ubiali, F., Nava, S., Nessi, V., Frigerio, S., Parati, E., Bernasconi, P., Mantegazza, R. y Baggi, F. (2007) Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation. *Int Immunol*, 19, 1063-1074.
- Ulloa, F. y Briscoe, J. (2007) Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle*, 6, 2640-2649.
- Urruela-Mora, A. (2005) La investigación con células madre. Aspectos éticos y jurídicos, p. 151-179. IN: Series La investigación con células madre. Aspectos éticos y jurídicos, UNAM, México, DF.
- Van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F. H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2, 266-270.
- Vesce, S., Kirk, L. y Nicholls, D. G. (2004) Relationships between superoxide levels and delayed calcium deregulation in cultured cerebellar granule cells exposed continuously to glutamate. *J Neurochem*, 90, 683-693.
- Vessey, D. A. (1978) The biochemical basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *Biochem J*, 174, 621-626.
- Vohra, B. P. y Hui, X. (2001) Taurine protects against carbon tetrachloride toxicity in the cultured neurons and *in vivo*. *Arch Physiol Biochem*, 109, 90-94.

- Voss, J. W., Pedersen, S. F., Christensen, S. T. y Lambert, I. H. (2004) Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Eur J Biochem*, 271, 4646-4658.
- Wang, D. S., Xu, T. L., Pang, Z. P., Li, J. S. y Akaike, N. (1998) Taurine-activated chloride currents in the rat sacral dorsal commissural neurons. *Brain Res*, 792, 41-47.
- Wang, Q., Hollinger, M. A. y Giri, S. N. (1992) Attenuation of amiodarone-induced lung fibrosis and phospholipidosis in hamsters by taurine and/or niacin treatment. *J Pharmacol Exp Ther*, 262, 127-132.
- Wen, G. Y., Sturman, J. A., Wisniewski, H. M., Lidsky, A. A., Cornwell, A. C. y Hayes, K. C. (1979) Tapetum disorganization in taurine-depleted cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 18, 1200-1206.
- Wright, L. S., Prowse, K. R., Wallace, K., Linskens, M. H. y Svendsen, C. N. (2006) Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion *in vitro*. *Exp Cell Res*, 312, 2107-2120.
- Wu, J. Y., Tang, X. W., Schloss, J. V. y Faiman, M. D. (1998) Regulation of taurine biosynthesis and its physiological significance in the brain. *Adv Exp Med Biol*, 442, 339-345.
- Wu, Z. Y. y Xu, T. L. (2003) Taurine-evoked chloride current and its potentiation by intracellular Ca²⁺ in immature rat hippocampal CA1 neurons. *Amino Acids*, 24, 155-161.
- Xu, Y. J., Arneja, A. S., Tappia, P. S. y Dhalla, N. S. (2008) The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol*, 13, 57-65.
- Yancey, P. H. (2004) Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. *Sci Prog*, 87, 1-24.
- Yoshimura, H., Nariai, Y., Terashima, M., Mitani, T. y Tanigawa, Y. (2005) Taurine suppresses platelet-derived growth factor (PDGF) BB-induced PDGF-beta receptor phosphorylation by protein tyrosine phosphatase-mediated dephosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1745, 350-360.
- Zappaterra, M. W. y Lehtinen, M. K. (2012) The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2863-2878.
- Zhang, X., Tenner, T. E., Jr. y Lombardini, J. B. (1999) Inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation by taurine and taurine analogues. *Biochem Pharmacol*, 57, 1331-1339.
- Zhao, L., Jiao, Q., Yang, P., Chen, X., Zhang, J., Zhao, B., Zheng, P. y Liu, Y. (2011) Metabotropic glutamate receptor 5 promotes proliferation of human neural stem/progenitor cells with activation of mitogen-activated protein kinases signaling pathway *in vitro*. *Neuroscience*, 192, 185-194.
- Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R. M., Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J. y Janson, A. M. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7925-7930.
- Zheng, X. S., Yang, X. F., Liu, W. G., Shen, G., Pan, D. S. y Luo, M. (2007) A novel method for culturing neural stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 43, 155-158.

XIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Artículos de investigación

1. Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Saldaña IT, Ramos-Mandujano G. 2010. Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. J Neurosci Res. 88(8):1673-1681. **Vea pág. 110.**
2. Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Pinzón-Estrada E, Ramos-Mandujano G. 2010. Functional expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in murine neural precursors. Dev Neurosci. 32(4):321-328. **Vea pág. 119.**
3. Hernández-Benítez R, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H. 2012. Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. Stem Cell Res. 9(1):24-34. **Vea pág. 127**
4. Hernández-Benítez R, Vangipuram SD, Ramos-Mandujano G, Lyman WD, Pasantes-Morales H. 2013. Taurine Enhances the Growth of Neural Precursors Derived from Fetal Human Brain and Promotes Neuronal Specification. Dev Neurosci. 35(1):40-49. **Vea pág. 141.**
5. Hernández-Benítez R, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H. Multiple pathways mediate taurine-induced proliferation of neural stem/progenitor cells. Artículo en preparación. (Resultados de la sección 5 de esta tesis, **págs. 73-78**).

Artículo de revisión

- Pasantes-Morales H, Hernández-Benítez R. 2010. Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? Neurochem Res. 35(12):1939-1943. **Vea pág. 151.**

Taurine Stimulates Proliferation of Mice Embryonic Cultured Neural Progenitor Cells

Reyna Hernández-Benítez,¹ Herminia Pasantes-Morales,¹ Ismael Torres Saldaña,² and Gerardo Ramos-Mandujano^{1*}

¹División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

²Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Taurine is present in high levels in fetal brain which decrease in the adult, suggesting its role in brain development. In some regions of taurine deficient animals cells show defective migration and the presence of numerous mitotic figures, suggesting a delay in cell proliferation. To know more about the role of taurine in the developing brain cells, the present study investigated whether taurine is a factor involved in proliferation or/and viability of neural progenitor cells (NPC). NPC were obtained from 13.5-days mice embryos mesencephalon, and cultured during 4–5 days to form neurospheres in the presence of EGF plus FGFb (EGF/FGF) or EGF alone. Mesencephalon taurine content (349 mmol/kg protein) was lost in NPC and recovered after addition of 10 mM taurine to the culture. Neurospheres-forming NPC were over 94% nestin-positive. Taurine increased 38.6% and 43.2% the number of NPC formed in EGF/FGF or EGF conditions, respectively. In secondary neurospheres this increase was 24.6% and 62.1%, in EGF/FGF or EGF cultures respectively. Correspondingly neurospheres size was increased by taurine but neurospheres number was not enhanced. Taurine significantly increased the number of BrdU-positive cells, without affecting cell viability, suggesting proliferation as the mechanism responsible for taurine action increasing NPC. Taurine seems unable to increase the number of β -III-tubulin-positive cells differentiated from neurospheres after serum addition, and rather an increase in astrocytes was observed. These results point to taurine as a trophic factor contributing to optimize NPC proliferation. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: neurospheres; trophic factor; EGF; FGFb; brain development

Taurine is an amino acid present in high amounts, often in the mM range, in most cells in vertebrate species. In spite of this high concentration, taurine is not involved in metabolic reactions, excepted the taurocholate synthesis, and is not part of protein molecules (Huxtable, 1992). A taurine role in brain development is suggested by the higher taurine content in the develop-

ing brain as compared to the adult brain, the difference being up to five-fold higher taurine levels in the immature brain (Sturman and Gaull, 1975; Miller et al., 2000). Even if brain taurine content varies between species, the decline from immature to mature brain is consistently observed. The importance of taurine in brain development is further supported by studies on taurine deprivation in newborn cats and monkeys (Sturman, 1993). Cats born from taurine deficient mothers have smaller brain weight and an abnormal morphology in the cerebellum and the visual cortex (Sturman et al., 1985; Palackal et al., 1986). In taurine deficient kitten cerebellar granule neurons, many of them in mitotic phase, persist in the external cell layer, whereas cell division and migration has been completed at the same age in the brain of non taurine-deprived or taurine-supplemented animals (Sturman et al., 1985). Delayed migration of neuroblasts and glioblasts is also observed in the visual cortex. Pyramidal cell number is reduced and cells show poor arborization (Sturman et al., 1985; Palackal et al., 1986). Studies in monkeys fed formulas without taurine showed a similar defective maturation of the visual cortex (Neuringer et al., 1990). In vitro, defective migration in taurine-deficient cultured brain cells, and effects of taurine increasing or restoring cell proliferation of human fetal neurons have been documented (Maar et al., 1995; Chen et al., 1998). Altogether, these findings point to a possible effect of taurine in some steps of brain ontogeny, as a trophic factor and/or a protective factor necessary for optimal maturation of brain cells. This question can be addressed in the model of cultured

Contract grant sponsor: UNAM; Contract grant number: IMPULSA-03; Contract grant sponsor: DGAPA; Contract grant number: IN203410.

*Correspondence to: Gerardo Ramos-Mandujano, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F. México. E-mail: gramos@ifc.unam.mx

Received 11 September 2009; Revised 20 October 2009; Accepted 22 October 2009

Published online 22 December 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.22328

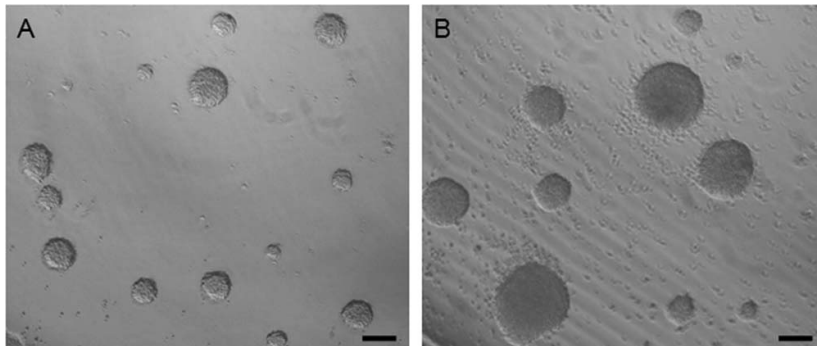


Fig. 1. Representative morphology of free-floating neurospheres. Neurospheres were derived from the mesencephalon of 13.5-days mouse embryos, obtained and cultured as described in Methods. **A:** Neurospheres grown in the presence of EGF plus FGFb (20 ng/ml). **B:** Neurospheres formed in the presence of the two growth factors plus 10 mM taurine. Imaged at 4 \times magnification, scale bar = 100 μ m.

embryonic neural progenitory cells (NPC). NPC isolated from embryonic brain regions proliferate in vitro as spherical free-floating aggregates termed neurospheres (Reynolds et al., 1992; Rietze and Reynolds, 2006). NPC in neurospheres are able to proliferate, self-renew, and further differentiate into astroglia, oligodendroglia and neurons (Baizabal et al., 2003; Ahmed, 2009). The influence of growth factors and other molecules on these parameters has been extensively examined (Tropepe et al., 1999; Chaichana et al., 2006). The present study aims to investigate whether taurine could be one of these factors. To address this point the effect of taurine on cell viability, proliferative capacity, lineage potential and growth factor responsiveness of neural progenitor cells was examined.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with L-glutamine and 15 mM HEPES, Pen Strep (penicillin streptomycin), fetal bovine serum (FBS), goat serum (GS), transferrin human, insulin human, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor basic (FGFb), glutamax 100 \times . Antibodies Alexa fluor 488 (chicken anti-rat) and Alexa fluor 568 (goat anti-rabbit) were from GIBCO Invitrogen (Grand Island, NY) and the monoclonal rat anti-bromodeoxyuridine antibody (Rat Mab anti-BrdU) from Accurate Chemical & Scientific Corporation (Westbury, NY). Rat anti-GFAP and mouse nestin tail polyclonal antibody from ZYMED Invitrogen (San Francisco, CA) and COVANCE (Princeton, NJ), respectively. Anti- β -III-tubulin, anti-myelin basic protein (MBP), progesterone, sodium selenite, putresine (1-4-diaminobutane-dihydrochloride), 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), bisbenzimidazole H 33258 (Hoescht), D-(+)-glucose, triton 100 \times and poly-L-lysine hydrobromide were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Albumin bovine serum (ABS) was from US Biological (Marblehead, MA). Paraformaldehyde (CH₂O)_n and chloride acid (HCl) were from J.T. Baker and

taurine (ultra > 99.5%) was from in BioChemika Fluka (Buchs, Switzerland).

Cultures

Mesencephalon tissue from CD1 mouse 13.5 days-embryos (plug day = 0) was dissected and transferred into ice-cold culture medium containing DMEM/F12, glutamax 100 \times , 25 μ g/mL insulin, 100 μ g/mL transferrin, 20 nM progesterone, 60 μ M putresine, 30 nM sodium selenite, 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin. Animals used in this research were acquired and cared in accordance with the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. The tissue was triturated with a micropipette, then the supernatant was collected and centrifugated at 1200g/5 min. The pellet was resuspended with culture media, and cells were plated in the presence of EGF and FGFb or EGF alone (20 ng/mL each) in sterile 6-well plates (5 \times 10⁵ cells/well), or in 96-well microplates (1 \times 10⁵ cells/well). When indicated, taurine was added at 10 mM final concentration. Cultures were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. After 5 days, primary neurospheres (generated in 6-well plates) were collected by centrifugation (1200g/5 min), disaggregated and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay. Size of primary neurosphere (generated in 96-well microplates) was directly measured, using the software ImageJ. For secondary neurosphere culture, primary neurospheres generated in EGF/FGF or EGF conditions were collected and centrifugated at 1200g/5 min, the pellet resuspended and neurospheres gently disaggregated. The dispersed cells were plated in sterile 6-well plates (2.5 \times 10⁵ cells/well), or in 96-well microplates (2 \times 10³ cells/well) in the same conditions as for primary cultures. The parameters of viability, number and size of secondary neurospheres were determined as described for primary cultures.

BrdU Incorporation and Immunocytochemical Detection

The percentage of BrdU incorporation was determined by adding a 10 μ M BrdU pulse 2 hr before analysis of incor-

poration. For immunocytochemistry analysis cells were collected, washed and resuspended with culture media, and plated onto pre-treated poly-L-lysine 96-well microplates. 90 min after plating, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed (3-times for 5 min each) with PBS/BSA 0.1%, incubated 15 min with pre-heated PBS-HCl 2 N solution, washed and permeabilized/blocked with a solution containing PBS/ BSA + 10% GS + 0.3% triton 100 \times , during 1 hr, at room temperature. Then cells were incubated overnight at 4°C with [1:100] anti-BrdU antibody followed by 1 hr incubation with Alexa fluor 488 to visualize the signal. Nuclei were counterstained with Hoescht.

Immunocytochemistry for Differentiated Cells

The neurospheres obtained from primary and secondary cultures were gently disaggregated, washed and plated onto pre-treated poly-L-lysine 96-well microplates with culture media plus 1% SFB, in the absence of exogenous growth factors. Cultures were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere during seven days. Then cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 min), washed (3-times, 5 min each) with PBS/BSA 0.1% BSA, permeabilized/blocked with PBS/BSA 0.1% + 10% GS + 0.3% triton 100 \times , during 1 hr, at room temperature. Cell types were identified by the primary antibodies [1:200] GFAP (astrocytes), nestin (NPC) and [1:250] β -III-tubulin (neurons) followed by 1 hr incubation with [1:200] Alexa 488 and 568 secondary antibodies. Nuclei were counterstained with Hoescht. The anti-MBP (oligodendrocytes) was used at different dilutions, but in any case we could find positive cells to this antibody. The number of positive cells present in a pool of 200 cells by each condition was determined and their respective percentages were calculated.

Measurements of Taurine Concentration

Taurine levels were measured in tissue samples obtained from 13.5 days-embryo mice mesencephalon, or in primary and secondary neurospheres. Samples were collected and washed three times with PBS, then resuspended in 150 μ L of PBS and sonicated (30 sec) with a Branson Sonifier-250. For HPLC taurine measurements, 15 μ L of each sample were collected and treated with 105 μ L ethanol during 20 min, centrifuged and filtered across 0.22 μ m sterile membrane. 10 μ L of the filtered were derivatized with the same volume of o-phthalaldehyde and injected into a Beckman liquid chromatograph system. An ODAS column (4.6 \times 250 mm internal diameter) was used, and the column effluent was monitored with a fluorescence detector (emission at 460 nm and excitation at 330 nm). The mobile phase was methanol (HPLC grade)/potassium acetate (0.1 M, pH 5.5) and was run at a rate of (1.5 mL/min during 15 min). Protein content was determined by the Bradford procedure.

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm standard error (SE). A two-way analysis of variance was used to detect significant differences considering the conjunction of two variables (growth factor's conditions and taurine presence) in the

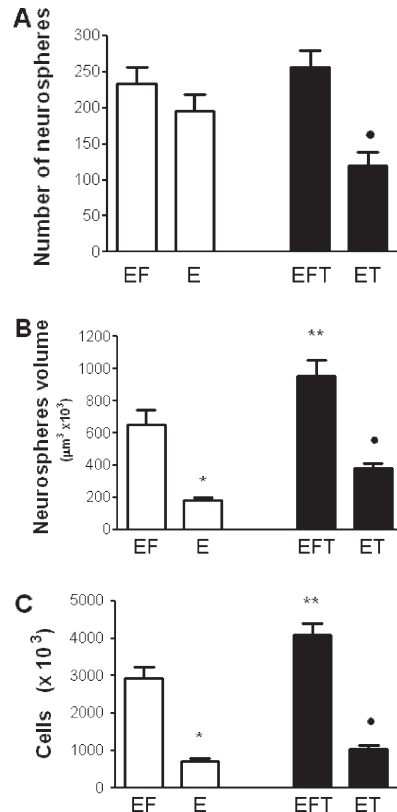


Fig. 2. Effect of taurine on the number and volume of neurospheres and on the number of neurospheres-forming cells in primary cultures, in EGF/FGF or in FGF-free medium **A**: Number of neurospheres grown in EGF/FGF, EGF alone, and in the presence of 10 mM taurine (gray bars). **B**: Neurosphere volume in the same conditions as in (A). **C**: Total number of cell-forming neurospheres grown in the culture conditions as in (A). All measurements were carried out after expansion for five days in vitro. The volume of neurospheres was determined using ImageJ software and the number of neurospheres was determined by direct counting. Values are means \pm SE of 12 experiments, significantly different at $P < 0.05$ EF vs E (*), EF vs EFT (**), and E vs ET (●) by ANOVA two-ways.

experiments described in Figures 2 and 6. Because interaction was not found, a subsequent analysis was unnecessary. In other experiments, significance at $P < 0.05$ was estimated by the Student's t-test.

RESULTS

Cell cultures obtained from the mesencephalon of 13.5-days mouse embryos were maintained in the growth-promoting medium in the following conditions: 1. EGF plus FGF-b (20 ng/ml each) (EGF/FGF), 2. EGF, 3. EGF/FGF plus 10 mM taurine, 4. EGF plus taurine. Free-floating neurospheres formed in cultures over the course of 5 days were collected and their num-

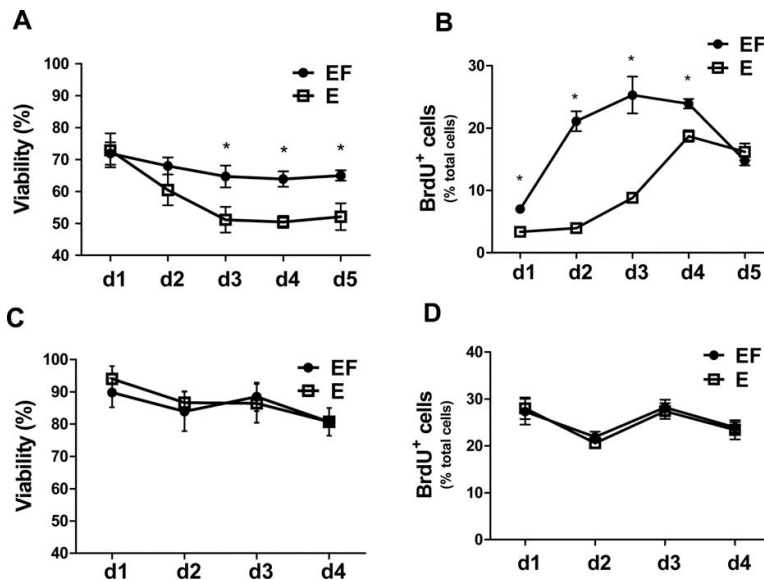


Fig. 3. Viability and proliferation of NPC in primary and secondary neurospheres formed over 1–5 days in culture in the EGF/FGF and EGF-conditions. Viability was determined by Trypan Blue exclusion assay and the cell proliferation was followed by BrdU incorporation, after a 2-hr BrdU pulse, as described in Methods. **A,B:** Primary neurospheres. **C,D:** Secondary neurospheres. EGF/FGF (●), EGF

(□). Results are expressed as percentage of cells excluding Trypan blue (viability) and percentage of BrdU positive cells (proliferation) over total cells counted. Points represent means \pm SE of 4–12 experiment. Significantly different from their respectively controls at $*P < 0.05$.

ber, volume and the number of neurosphere-forming cells, were examined (Figs. 1,2). Neurosphere-forming cells were over 94% nestin-positive, and are then considered neural progenitor cells (NPC). No neurospheres were formed in the absence of EGF/FGF and very few were formed with only FGF. Cultures with EGF but no FGF formed less neurospheres than cultures with the two factors (195 vs 233) (Fig. 2A). A more remarkable difference was found in the neurosphere volume in the two conditions: 180 vs. $653 \mu\text{m}^3 \times 10^3$ in FGF-free or EGF/FGF cultures, respectively (Fig. 2B). Correspondingly, the number of NPC in the FGF-free condition was also markedly lower (Fig. 2C). FGF may increase NPC number by protecting cells from injuring agents derived from dying cells from the dispersed tissue, or by promoting NPC proliferation. FGF had the two effects as shown in Fig. 3 (A,B). NPC viability, assessed by trypan-blue exclusion assay was markedly decreased in FGF-free cultures during the 1–3-day period, as compared to EGF/FGF-grown cultures (Fig. 3A). Also neurospheres formed in FGF-free cultures had less number of BrdU-positive cells compared with those grown in EGF/FGF cultures (Fig. 3B). Addition of taurine (10 mM) to the culture medium significantly increased neurosphere volume and the number of NPC-forming neurospheres. Taurine effects were found in EGF/FGF or FGF-free cultures, but were proportionally larger in the FGF-free condition. Addition of taurine to EGF/FGF

cultures increased neurosphere size by 46% and in the FGF-free cultures, the increase was 110%, but still neurospheres size in this condition was far from that found in the EGF/FGF cultures (Fig. 2B). Taurine effect on neurosphere size is reflected in the NPC number, which increased 38% and 43% in EGF/FGF or FGF-free cultures, respectively (Fig. 2C). In any condition the number of neurospheres generated was enhanced by taurine. In fact, less neurospheres were formed in FGF-free cultures containing taurine (Fig. 2A). These neurospheres were, though, notably higher than those formed in the absence of taurine (Fig. 2B). In all these experiments taurine concentration was 10 mM. A dose-response curve showed maximal effect at 10 mM, though a significant increase was observed already at 1 mM taurine (Fig. 4). Cell viability assayed by trypan-blue exclusion was unaffected by taurine. The proliferation rate assayed by the number of BrdU-positive cells was increased by taurine (Fig. 5A,B). In EGF/FGF cultures, higher proliferation rates were seen during the first days in culture and taurine addition prolonged proliferation up to 5-days. In FGF-free cultures, a gradual and constant increase in the number of BrdU-positive cells was observed during the 5 days in culture, which was consistently increased by taurine, particularly after 4–5 days in culture (Fig. 5A,B).

Neurospheres harvested from these primary cultures were dissociated and cultured under the same conditions:

EGF/FGF of EGF media, in the presence or absence of taurine. These neurosphere cultures had markedly higher cell viability than the primary cultures, and at variance with the primary cultures no difference in viability was observed between EGF/FGF and FGF-free conditions

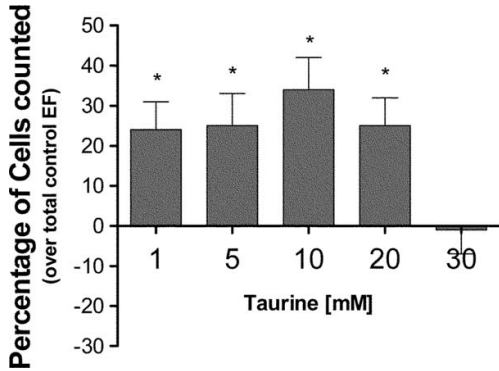


Fig. 4. Concentration-dependent effect of taurine increasing the total number of NPC in primary neurospheres. Neurospheres were generated in the EGF/FGF condition plus taurine at the indicated concentrations (in mM) and the amount of NPC after 5 days in culture was estimated. Bars represent the percentage increase in cell number found in the presence of taurine, over the control condition. Means \pm SE of 5 experiments, significantly different from control at $*P < 0.05$.

(Fig. 3C). The proliferation rate was also comparable in the two conditions (Fig. 3D). The number and size of neurospheres formed in secondary cultures, illustrated in Figure 6 (A,B) showed no differences between EGF/FGF and FGF-free conditions. NPC number was also essentially the same (Fig. 6C). Taurine did not change the number of neurospheres formed in the secondary cultures but neurosphere size was significantly higher (Fig. 6B), and consequently NPC number was also higher, 25% and 62% in EGF/FGF or FGF-free cultures, respectively (Fig. 6C). In secondary cultures taurine did not affect cell viability but significantly increased the number of BrdU-positive cells along the culture days 2-4. This increase was higher in the FGF-free cultures (Fig. 5C,D).

Taurine content in primary and secondary neurospheres was measured and compared to that in dissociated cells obtained from the freshly dissected mesencephalon at embryonic day 13.5. Taurine concentration in mesencephalon cells was 349 mmol/kg protein. After 5 days in culture, the taurine content in cells from primary neurospheres was 44.3 mmol/kg protein, and it further decreased to only 8.3 mmol/kg protein in cells from secondary neurospheres (Fig. 7). Neurospheres formed in cultures containing 10 mM taurine, not only recovered the taurine level found in the intact tissue, but showed a higher concentration of 486 mmol/kg protein (Fig. 7). This increase is not due to adherent taurine

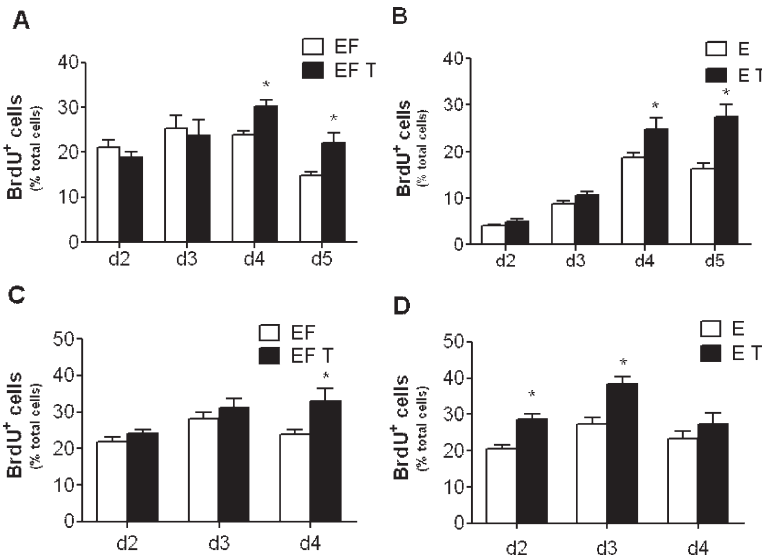


Fig. 5. Taurine effect on proliferation of NPC cells in primary and secondary neurospheres over 2-5 days in culture. BrdU incorporation assay as in Figure 3. BrdU-positive cells from primary (A) or secondary (C) neurospheres grown in EGF/FGF the presence or absence of taurine. BrdU-positive cells in primary (B) or secondary (D) neurospheres grown with EGF alone, in the presence or absence of taurine. Bars represent the percentage of BrdU positive cells in each condition. Significantly different from their respective controls at $*P < 0.05$.

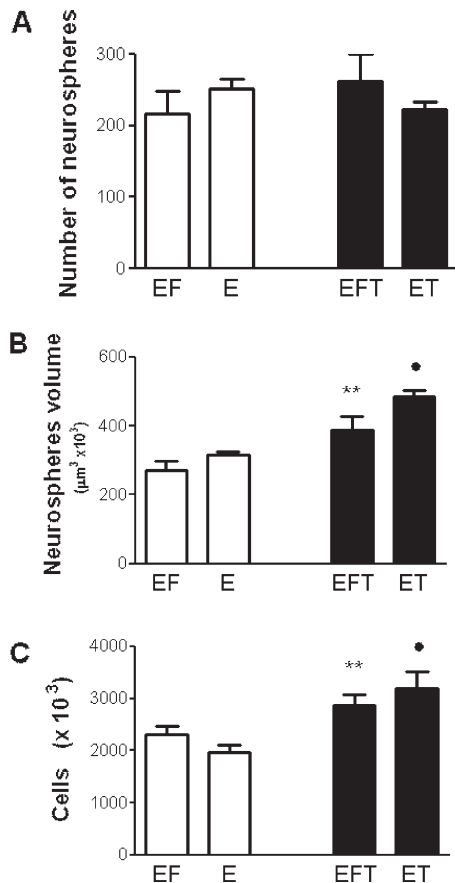


Fig. 6. Effect of taurine on the number and size of secondary neurospheres and on the number of neurosphere-forming cells in EGF/FGF or in FGF-free medium **A**: Number of neurospheres grown in EGF/FGF, EGF alone, and in the presence of 10 mM taurine (gray bars). **B**: Neurosphere volume in the same conditions as in (A). **C**: Total cell number in neurospheres formed in the culture in the conditions described in (A). All measurements were carried out after expansion for 4 days in vitro. The volume of neurospheres was determined using ImageJ software and the number of neurospheres was determined by direct counting. Values are means ± SE of 12 experiments, significantly different at $P < 0.05$ EF vs EFT (**) and E vs ET (●) by ANOVA two-ways.

from the medium, since taurine levels in cells exposed to 10 mM taurine and immediately washed and processed for quantification were essentially the same as those in cells cultured without taurine (Fig. 7).

The lineage potential of neurospheres formed in EGF/FGF or FGF-free conditions was examined in the presence or absence of taurine. To promote differentiation, cells dissociated from secondary neurospheres were transferred to medium without growth factors and containing 1% fetal bovine serum. After 7 days, cultures

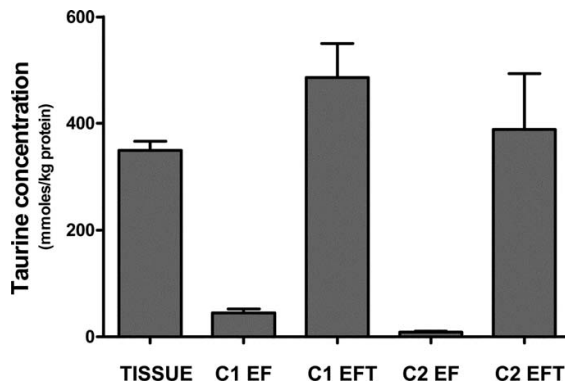


Fig. 7. Taurine concentration in mesencephalon of mice embryos and in neurospheres in the presence or absence of taurine. The mesencephalon tissue and primary (C1) or secondary (C2) neurospheres were collected from cultures generated under EGF/FGF condition (EF) plus or minus taurine. Taurine levels were determined by HPLC as described in Methods. Bars represent means ± SE of 4 experiments.

were processed for immunocytochemistry to detect neurons and different types of glial cells using specific antibodies to marker proteins characteristic of the different cell types. The markers used were nestin for NPC, β -III-tubulin for neurons, GFAP for astrocytes and MBP for oligodendrocytes (Fig. 8). Neurosphere-forming cells before treatment for differentiation, were largely nestin-positive (94–97%) regardless of the growth factors present in the culture or of the presence or absence of taurine. A small percentage (>5%) of cells were β -tubulin-III-positive. No GFAP- nor MBP-positive cells were found in any condition. In our cultures, 39–48% of the nestin-positive cells differentiated into astrocytes (GFAP-positive cells) and a small number (10–12%) generated neurons. We were unable to detect oligodendrocytes in the conditions tested. Taurine did not significantly modify this distribution. No increased neurogenesis was found in cultures treated with taurine and only the number of astrocytes was found increased.

DISCUSSION

The embryonic mesencephalon contains, among other cells, the neural precursor cells, which if cultured in proper conditions, proliferate and generate neurospheres. These structures are formed by aggregations of neural progenitor cells (NPC) and often contain also multipotent stem cells. In our conditions, neurosphere-forming cells were mostly (94%) neural progenitor nestin-positive cells. Cells from dissociated neurospheres generate by self-renewal other neurosphere generations. Neurosphere formation and proliferation are sustained by two main mitogens, the growth factors EGF and FGF (Tropepe et al., 1999; Ciccolini, 2001). The present study was carried out to examine effects of taurine on NPC cells, which according to available evidence,

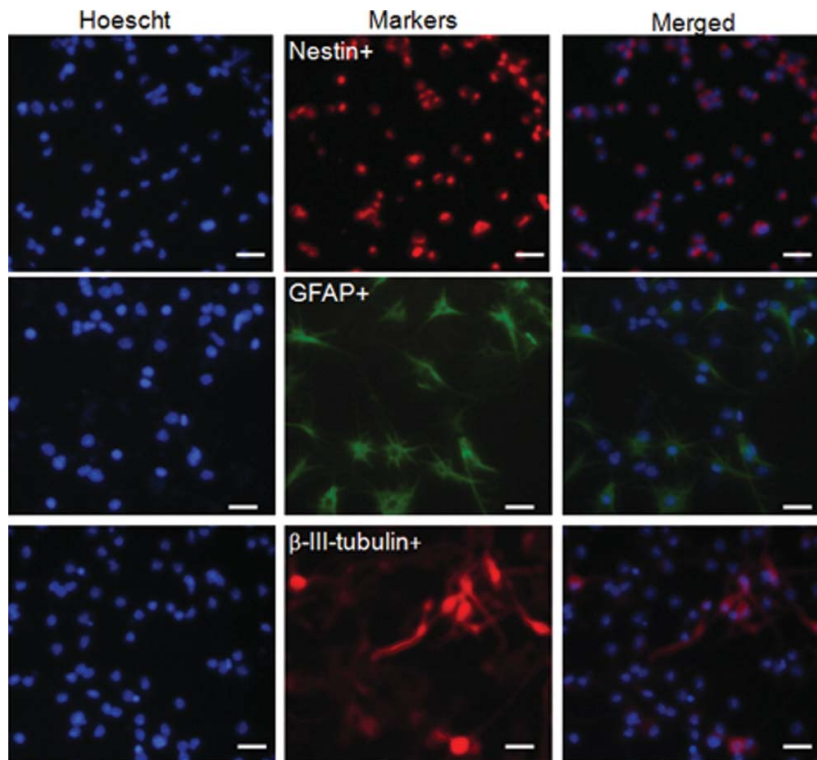


Fig. 8. Photomicrographs showing dissociated neurosphere-forming cells before and after differentiation. Neurospheres were dissociated and immunostained for nestin (red, upper panel) or exposed to culture media plus 1% SFB in the absence of growth factors for 7 days, and immunostained for the astrocyte-marker GFAP (green, middle panel) or neuron-marker β -III-tubulin (red, bottom panel). Nuclei were counterstained with Hoescht (blue). Imaged at 20 \times , scale bar = 40 μ m.

could be proliferative or/and protective (Pasantes-Morales et al., 1985; Jeon et al., 2007). These effects may occur in addition or instead of the effect of the trophic factors EGF and FGF. According to existing information, the relative importance of each one of these factors depends on the age of embryos providing the progenitor cells, and of some of the conditions in the cell culture (Ciccolini and Svendsen, 1998; Santa-Olalla and Covarrubias, 1999; Tropepe et al., 1999; Kelly et al., 2005). In our study in cells of 13.5-days embryo brain, EGF was required for neurosphere formation, since essentially no neurospheres were formed in the absence of this factor. Cultures with EGF but no FGF generated similar number of neurospheres as in EGF/FGF condition, but were considerably smaller and clearly with less NPC number. Our results showed effects of FGF preserving cell viability and also increasing NPC proliferation. These two effects combined, could explain the differences in NPC number and neurosphere size between FGF-free and EGF/FGF cultures. Neurosphere formation and proliferation are sustained by FGF and

EGF, in serum-free medium. Other cells from the dispersed tissue are not responsive to these factors and die. Consequently, neurosphere-forming cells are exposed to noxious agents derived from the dying cells, and presumably require protective mechanisms for survival and proliferation, which may be provided in part by FGF. The trophic action of EGF and FGF increasing NPC proliferation is well documented but FGF has effects other than the mitogenic effect, including the protective action found in the present study (Ciccolini and Svendsen, 1998; Wagle and Singh, 2000; Grothe and Timmer, 2007).

In cultures forming secondary neurospheres no difference was found anymore between EGF/FGF and FGF-free conditions regarding cell viability and proliferation. These cultures contain only NPC derived from primary neurospheres, with no debris from dead cells threatening cell viability, thus likely making the FGF protection unnecessary. Interestingly, the proliferative effect of FGF observed in primary neurospheres is not found in secondary neurospheres. This raises the ques-

tion of whether the effect of FGF increasing cell proliferation in primary neurospheres is due to a trophic action per se or results from an FGF primary action protecting NPC cells and keeping them in better conditions to proliferate.

A consistent effect of taurine increasing neurosphere size and NPC number was shown in the present study. This effect was observed in cultures containing the two trophic factors or EGF alone, in cultures forming primary neurospheres or in those generating secondary neurospheres. Taurine effect enhancing NPC number may reflect increased cell survival or/and increased proliferation. Previous evidence supported these two possibilities. Taurine has a diversity of biological actions, including modulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis and antioxidant effects, through which it could protect cells from damage elicited by the attack of free radicals or other detrimental conditions (Parvez et al., 2008; Schaffer et al., 2009). This protective effect of taurine is well established through evidence accumulated over the years in a variety of cell types (rev. in Saraansari and Oja, 2000; Schaffer et al., 2009). The present results, though, did not support a cytoprotective action of taurine on NPC, but rather showed an effect increasing cell proliferation. It cannot be excluded, though, that the structure and functioning of membrane, nuclear or mitochondrial elements, are better preserved in the presence of taurine, thus favoring proliferation. Taurine consistently increased the number of BrdU-positive cells, in all conditions, but did not induce NPC proliferation nor neurospheres generation in the absence of the growth factors. Thus, taurine is acting only once the proliferative process has been initiated, and in fact, the taurine-induced increase in BrdU-positive cells is more apparent in the last days of culture. This is in line with the idea of a stabilizer effect of taurine on cell elements favoring proliferation. Evidence about a proliferative action of taurine is so far conflicting, with reported proliferative or antiproliferative effects (Yoshimura et al., 2005; Jeon et al., 2007).

A study on neurospheres formed in cultures obtained from the subventricular zone of rat brain, containing explants of embryonic brain cortex showed an increase in cell proliferation mediated by the release of diffusible factors from brain tissue (Agasse et al., 2006). Taurine may be one of these factors, since the proliferative effect is observed only when cells are exposed to the embryonic cortex but not to adult cortex, and taurine content is significantly lower in the adult brain than in the embryonic tissue.

Taurine proliferative effect on NPC number occurs in addition to that of the growth factors effects. In other cells proliferative effects of taurine involve MAP kinases, similar to those mediated by EGF/FGF (Jeon et al., 2007). Other similarities or dissimilarities between taurine and growth factors mechanisms in NPC require further investigation, though the fact that taurine proliferative effect is higher in the absence of FGF suggests that taurine and FGF may contend for some mechanisms relevant to cell proliferation.

The proliferative effect of taurine in NPC may be related to cell aggregation since notably larger neurospheres are formed in the presence of taurine. A study in human NPC, describes a linear correlation between neurospheres size and proliferation rate (Mori et al., 2006). The molecular mechanism proposed for this action is the aggregation-induced activation of Notch signaling pathways.

Cells dissociated from freshly excised tissue contained high taurine levels, in agreement with the elevated concentrations of taurine typical of embryonic brain (Agrawal et al., 1968; Miller et al., 2000). In the absence of fetal serum or of other sources of external taurine, the cell taurine content was lost in NPC during the days in culture, but it was fully replenished in cells grown in culture medium with taurine, suggesting the presence of an active and robust mechanism of taurine uptake in NPC.

NPC differentiate under appropriate conditions into neurons, astrocytes and oligodendrocytes (Campos, 2004; Singec et al., 2006; Deleyrolle and Reynolds, 2009). In our cultures, about 40% of the nestin-positive cells differentiated into astrocytes (GFAP-positive cells) and 12% into neurons. This distribution is not different from that reported in previous studies about differentiation of NPC obtained from mice embryo brains (Ciccolini and Svendsen, 1998; Tropepe et al., 1999). Taurine did not significantly modified this distribution. No increased neurogenesis was observed in cultures containing taurine, but rather some increase in astrocytes was found.

In summary, results of the present study showing a taurine stimulatory effect of NPC proliferation, provide some mechanistic insight on the taurine requirement for optimal brain development. Additionally, these results may be considered to optimize the environment for proliferation of NPC obtained from the adult brain, as well as for procedures using NPC for cell replacement strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the valuable technical assistance of Xóchitl Ayala Méndez for HPLC measurement, to Dr. Enrique Pinzón Estrada for providing the mice used for the study, to Dr. Agustina Cano for her guidance in the procedures to obtain neurospheres and to Drs. Luis Covarrubias and Iván Velasco for most helpful critical discussions throughout the work. This study is part of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Reyna Hernández-Benitez at the Universidad Nacional Autónoma de México, with a CONACYT, México fellowship.

REFERENCES

- Agasse F, Benzakour O, Berjeaud JM, Roger M, Coronas V. 2006. Endogenous factors derived from embryonic cortex regulate proliferation and neuronal differentiation of postnatal subventricular zone cell cultures. *Eur J Neurosci* 23:1970–1976.

- Agrawal HC, Davies J, Himwich WA. 1968. Developmental changes in mouse brain: weight, water content and free amino acids. *J. Neurochem* 15:917–923.
- Ahmed S. 2009. The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem* 106: 1–6.
- Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L. 2003. Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res* 34:572–588.
- Campos LS. 2004. Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res* 78:761–769.
- Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quiñones-Hinojosa A. 2006. Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. *Stem Cells* 24:2851–2857.
- Chen XC, Pan ZL, Liu DS, Han X. 1998. Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 442:397–403.
- Ciccolini F, Svendsen CN. 1998. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci* 18:7869–7880.
- Ciccolini F. 2001. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development. *Mol Cell Neurosci* 17:895–907.
- Deleyrolle LP, Reynolds BA. 2009. Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods Mol Biol* 549:91–101.
- Grothe C, Timmer M. 2007. The physiological and pharmacological role of basic fibroblast growth factor in the dopaminergic nigrostriatal system. *Brain Res Rev* 54:80–91.
- Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:101–163.
- Jeon SH, Lee MY, Kim SJ, Joe SG, Kim GB, Kim IS, Kim NS, Hong CU, Kim SZ, Kim JS, Kang HS. 2007. Taurine increases cell proliferation and generates an increase in $[Mg^{2+}]_i$ accompanied by ERK 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett* 581:5929–5934.
- Kelly CM, Tyers P, Borg MT, Svendsen CN, Dunnett SB, Rosser AE. 2005. EGF and FGF-2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS. *Brain Res Bull* 68:83–94.
- Maar T, Morán J, Schousboe A, Pasantes-Morales H. 1995. Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int J Dev Neurosci* 13:491–502.
- Miller TJ, Hanson RD, Yancey PH. 2000. Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125:45–56.
- Mori H, Ninomiya K, Kino-oka M, Shofuda T, Islam MO, Yamasaki M, Okano H, Taya M, Kanemura Y. 2006. Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J Neurosci Res* 84:1682–1691.
- Neuringer M, Palackal T, Kujawa M, Moretz RC, Sturman JA. 1990. Visual cortex development in rhesus monkeys deprived of dietary taurine. *Prog Clin Biol Res* 351:415–422.
- Palackal T, Moretz R, Wisniewski H, Sturman J. 1986. Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J Neurosci Res* 15:223–239.
- Parvez S, Tabassum H, Banerjee BD, Raisuddin S. 2008. Taurine prevents tamoxifen-induced mitochondrial oxidative damage in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:382–387.
- Pasantes-Morales H, Wright CE, Gaull GE. 1985. Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol* 34:2205–2207.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565–4574.
- Rietze RL, Reynolds BA. 2006. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* 419:3–23.
- Santa-Olalla J, Covarrubias L. 1999. Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells. *J Neurobiol* 40:14–27.
- Saransaari P, Oja SS. 2000. Taurine and neural cell damage. *Amino Acids* 19:509–526.
- Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. 2009. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 87:91–99.
- Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhal G, Frotscher M, Snyder EY. 2006. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* 3:801–806.
- Sturman JA, Gaull GE. 1975. Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *J Neurochem* 25:831–835.
- Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM. 1985. Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J Neurosci Res* 13:405–416.
- Sturman JA. 1993. Taurine in development. *Physiol Rev* 73:119–147.
- Tropepe V, Sibilio M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. 1999. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208:166–188.
- Wagle A, Singh JP. 2000. Fibroblast growth factor protects nitric oxide-induced apoptosis in neuronal SHSY-5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 295:889–895.
- Yoshimura H, Nariai Y, Terashima M, Mitani T, Tanigawa Y. 2005. Taurine suppresses platelet-derived growth factor (PDGF) BB-induced PDGF-beta receptor phosphorylation by protein tyrosine phosphatase-mediated dephosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1745:350–360.

Functional Expression and Subcellular Localization of the Taurine Transporter TauT in Murine Neural Precursors

Reyna Hernández-Benítez^a Herminia Pasantes-Morales^a

Enrique Pinzón-Estrada^b Gerardo Ramos-Mandujano^a

^aDivisión de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, and ^bFacultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Key Words

Neurospheres · Neural stem cells · Amino acids · Cell growth

Abstract

Taurine addition to cultured embryonic neural precursor cells (NPC) significantly increased cell proliferation [Hernández-Benítez et al., 2010]. The medium used for NPC growing and proliferation is a fetal serum-free medium, and therefore, NPC become taurine depleted. Addition of taurine to the cultured medium fully replenished the cell taurine pool, suggesting the functional expression of a taurine transporter (TauT) in these cells. In the present study, TauT in NPC was functionally characterized and its protein expression and the subcellular distribution of immunoreactivity were determined. ³H-taurine uptake in NPC could be separated into a non-saturable component and a Na⁺/Cl⁻-dependent, saturable component. The saturable component showed an apparent 2:1:1 Na⁺/Cl⁻/taurine stoichiometry, a V_{max} of 0.39 ± 0.04 nmol/mg protein/min, and a K_m of 21.7 ± 2.6 μM. TauT in NPC was strongly inhibited by hypotaurine and β-alanine (92 and 79%, respectively) and reduced (71%) by γ-aminobutyric acid. TauT protein is expressed in NPC as a single band of about 70 kDa. Essentially all (98.8%) of the neurosphere-

forming cells were positive to TauT immunoreactivity. Immunolocalization visualized by confocal microscopy localized TauT predominantly at the cell membrane. TauT was also found at the cytosol and only occasionally at the nuclear membrane. This study represents the first characterization of TauT in NPC.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Taurine is a sulfur β-amino acid present in most animal cells (in mM concentrations). It is not a protein constituent and is present largely free in the cytosol. The highest taurine levels are found in excitable tissues: heart and skeletal muscle, secretory glands, the brain and retina, where taurine levels of up to 60–80 mM have been reported [Huxtable, 1992; Wójcik et al., 2010]. Taurine is not involved in metabolic reactions in the cell, besides the synthesis of taurocholic acid in the liver, but it has a prominent role as an osmolyte in numerous cell types [Pasantes-Morales et al., 1998]. This function essentially involves its translocation through the membrane in the direction required to correct deviations in cell volume. Besides these physiological roles, taurine, when present

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
0378–5866/10/0324–0321\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/dne

Gerardo Ramos-Mandujano
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
México D.F. 04510 (México)
Tel. +52 5 5622 5588, Fax +52 5 5622 5607, E-Mail gramos@ifc.unam.mx

in large amounts, has a variety of effects on different cell types. Modulation of Ca^{2+} homeostasis, antioxidant effects and cytoprotection are all well-documented taurine actions [Schuller-Levis and Park, 2003; Xu et al., 2008]. Taurine concentration in a cell type results from its ability to synthesize, its capacity to accumulate from the extracellular milieu and its turnover rate. Taurine synthesis is restricted to some cells and tissues, and the biosynthetic capacity varies between species. Taurine is formed from cysteine via a pathway requiring cysteine dioxygenase and cysteine sulfinatase decarboxylase. The latter is a rate-limiting enzyme, and its presence and activity often reflect the ability of a given tissue to synthesize taurine. In the liver and kidney, taurine is actively synthesized while its synthesis is limited in the brain and absent in the heart and skeletal muscle [Huxtable, 1992; Stipanuk, 2004; Tappaz, 2004]. Taurine transport is of key importance to maintain the high levels typical of excitable tissues. Taurine is transported inside cells by a well-characterized and ubiquitous taurine transporter (TauT). TauT is able to concentrate taurine inside the cells at concentrations several orders of magnitude higher than the extracellular concentrations. In most cells of different types, TauT is a Na^+/Cl^- and energy-dependent carrier, transporting taurine with high affinity and low capacity and showing a narrow specificity for β -amino acids [Tappaz, 2004]. Knockout of the TauT gene in a mouse model shows a 98% decrease in taurine levels in skeletal and heart muscle, 80–90% in the brain and retina and 70% in the liver, stressing the key importance of taurine transport in maintaining physiological taurine tissue levels. The TauT^{-/-} phenotype is characterized by severe and progressive retinal degeneration, reduced brain size and shrunken kidneys [Heller-Stilb et al., 2002; Warskulat et al., 2007].

In the adult mammalian brain, taurine is found at levels ranging from 1 to 13 mM, the highest found in the mouse brain [Huxtable, 1992]. Taurine levels are markedly high in the immature brain as compared with the adult brain [Rassin et al., 1981; Sturman, 1993; Miller et al., 2000]. This decline is a consistent feature observed among species, regardless of their differences in taurine concentration. A high taurine cell content may thus be a requirement for developing brain cells. Interestingly, the olfactory bulb, which maintains a constant neurogenesis in the adult, also maintains a high taurine concentration [Miller et al., 2000; Miranda-Contreras et al., 2000].

The present study aims to characterize TauT in neural precursor cells obtained from the mesencephalon of mice embryonic brain, and cultured as neurospheres. Neuro-

spheres are formed by aggregations of neural progenitor cells and may also contain multipotent stem cells. Altogether these cells are named 'neural precursor cells' (NPC). Under appropriate conditions, NPC differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes [Baizabal et al., 2003; Campos, 2004; Singec et al., 2006; Deleyrolle and Reynolds, 2009]. NPC have been extensively studied in the last years and some of their requirements for survival, proliferation, self-renewal and differentiation have been identified [Campos, 2004; Chaichana et al., 2006]. A recent study from our laboratory has shown an effect of taurine increasing proliferation of NPC isolated from mice embryonic mesencephalon and cultured as neurospheres [Hernández-Benítez et al., 2010]. The freshly excised tissue contains high levels of taurine characteristic of the embryonic mouse brain. The disaggregated cells are then cultured in the absence of fetal serum, which is the common source of taurine for cells in culture. Only NPC survive under these conditions, supported by specific growth factors [Tropepe et al., 1999]. After a few days in culture, NPC have lost all their taurine content, but addition of taurine to the culture medium fully replenishes the cell taurine pool [Hernández-Benítez et al., 2010]. This is indicative of an efficient mechanism of taurine accumulation, presumably via TauT. The present study aims to identify the presence and the functional expression of TauT in NPC.

Methods and Materials

Materials

DMEM/F₁₂ with L-glutamine and 15 mM HEPES, Pen Strep (penicillin streptomycin), goat serum, human transferrin, human insulin, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor basic (bFGF), Glutamax 100X, and Alexa Fluor 568 (goat anti-rabbit) were from Gibco, Invitrogen. The antibody anti-rat C-tail TauT was from Alpha Diagnostics, Inc. Mouse nestin tail polyclonal antibody was purchased from Covance. The secondary antibody rabbit HRP-IgG was from Santa-Cruz Biotechnologies. Progesterone, sodium selenite, putrescine (1,4-diaminobutanedihydrochloride), bisbenzimidazole H 33258 (Hoechst), D-(+)-glucose, Triton X-100, poly-L-lysine hydrobromide, Tris, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride ($\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$), bromophenol blue, NaCl, MgSO_4 , KNO_3 , choline chloride, sodium gluconate, and the amino acids β -alanine, hypotaurine, creatine, glycine and γ -aminobutyric acid (GABA) were from Sigma Aldrich. Albumin bovine serum (ABS) was from US Biological. Paraformaldehyde (CH_2O)_n, chloride acid (HCl), KCl, KH_2PO_4 and CaCl_2 were from J.T. Baker, and HEPES from Roche. The acrylamide was from Ameresco, fat-free milk was from Svelty, Nestlé, and finally, taurine (ultra >99.5%) and ³H-taurine were from Biochemika Fluka and American Radiolabeled Chemicals, respectively.

Cultures

Mesencephalon from CD1 13.5-day-old mouse embryos was dissected and transferred into ice-cold DMEM/F₁₂ medium, triturated with a micropipette and the supernatant collected and centrifuged at 1,200 *g*/5 min. The pellet was resuspended and cells were plated in sterile 6-well plates (5×10^5 cells/well) with a medium containing Glutamax 100X, 25 μ g/ml insulin, 100 μ g/ml transferrin, 20 nM progesterone, 60 μ M putrescine, 30 nM sodium selenite, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin and supplemented with EGF plus bFGF (20 ng/ml each). Cultures were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. After 5 days, primary neurospheres were collected by centrifugation (1,200 *g*/5 min), disaggregated, and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay. For secondary neurospheres, primary neurospheres generated in EGF/bFGF condition were collected and centrifuged at 1,200 *g*/5 min, the pellet resuspended and neurospheres gently disaggregated. The dispersed cells were plated in sterile 6-well plates (2.5×10^5 cells/well) and formed secondary neurospheres, which were collected after 4 days for taurine uptake assays. Animals used in this research were acquired and cared for in accordance with the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Taurine Uptake Experiments

All experiments were carried out with NPC obtained from secondary neurosphere cultures. Secondary neurospheres were gently disaggregated, plated onto pretreated poly-L-lysine 24-well microplates (5×10^5 cells/well) with culture media and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere during 2 h. Before each experiment, NPC were washed 3 times with medium containing (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1.7 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 1 CaCl₂, 5 glucose and 10 HEPES (300 mosm, pH 7.4). Then cells were incubated for 30 min with ³H-taurine (0.8 μ Ci/ml; 28 nM) under the condition indicated for each assay. At the end of the experiment, cells were washed and the accumulated radioactivity in cells was measured in a liquid scintillation counter. Taurine uptake is calculated as nmol/mg protein/min. For assays on the Na⁺/Cl⁻ dependence of taurine uptake, NaCl in the medium was replaced by equimolar concentrations of choline chloride (for Na⁺ dependence) or sodium gluconate (for Cl⁻ dependence). KNO₃ substituted NaCl in experiments to quantitate the saturable and non-saturable components of ³H-taurine. Osmolarity of all media was verified in a freezing point osmometer from Precision Systems Inc. (Natick, Mass., USA).

SDS-PAGE and Western Blotting

Neurospheres were collected, washed in PBS and homogenized in a buffer containing 10 mM of Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA and 0.5 mM C₇H₇FO₂S. Samples were then sonicated for 20 s, the homogenized cells centrifuged at 1,000 *g* for 10 min, and the supernatant collected and stored at 0°C until processing. The protein content of samples was in the range of 30–55 μ g and was measured by the Bradford assay. Equal amounts of protein were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (10%), followed by transfer to a 0.2- μ m nitrocellulose membrane (Trans-Blot, Bio Rad, USA). The membrane was blocked with a solution of TBS + fat-reduced milk (5%) + ABS (1%) during 1 h. Proteins of interest were then detected using appropriate antibodies: anti-rat TauT (1:750) incubated overnight, and secondary antibody rabbit HRP-IgG (1:2,000) incubated for 1 h. The band reactivity was identified using a chemiluminescence detection kit ECL-Plus (Amersham GE Healthcare, UK).

Immunocytochemistry

The neurospheres obtained from secondary cultures were gently disaggregated, washed and plated onto pretreated poly-L-lysine 96-well microplates (for epifluorescence) or coverslips (for confocal microscopy), with culture medium, and samples were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere during 2 h. Then, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 min), washed (3 times, 5 min each) with PBS/ABS 0.1%, permeabilized/blocked with PBS/ABS 0.1% + 10% goat serum + 0.3% Triton X-100, during 1 h at room temperature. Nestin- and TauT-positive cells were identified by 24-hour incubation with anti-mouse nestin tail (1:200) or anti-rat C-tail TauT (1:100) primary antibodies, followed by 1-hour incubation with Alexa Fluor 568 secondary antibody (1:200). Nuclei were counterstained with Hoechst (1:500). Microphotographs were visualized in an epifluorescence microscope Olympus IX71 with a 20 \times objective and analyzed by an Image-Pro plus 6.0 software. Subcellular distribution of TauT reactivity was examined by confocal microscopy. Optical slices in the z-axis were taken at 0.75- μ m intervals. The samples were scanned on a confocal laser scanning microscope FV1000, with a Plan-Apo 60X NA 1.45 objective. Images were processed with an Olympus FV10-ASW 2.1 software.

Data Analysis

Statistical differences between experimental groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Statistically significant differences were considered at * $p < 0.01$. All data are given as means \pm SEM. For image processing, microphotographs were analyzed using Adobe Image Ready 7.0[®], Image-Pro plus 6.0 software[®] and Olympus Fluoview FV10-ASW 2.1[®].

Results

Culture and Characterization of NPC

Cell cultures obtained from the mesencephalon of 13.5-day-old mouse embryos were maintained in a growth-promoting medium containing EGF plus bFGF (20 ng/ml each). Free-floating neurospheres were formed in cultures over the course of 5 days, and thereafter, cells from dissociated neurospheres were cultured to generate other neurospheres (secondary neurospheres). In accordance with our previous study [Hernández-Benítez et al., 2010], essentially all the neurosphere-forming cells ($97.4 \pm 1.1\%$) were positive to nestin, which is a marker for NPC. Cells obtained from secondary neurosphere disaggregation were plated for ³H-taurine uptake experiments.

Functional Characterization of ³H-Taurine Transport in NPC

The time course of taurine uptake by NPC measured as ³H-taurine accumulation was linear within the first 30 min (results not shown). Therefore, all subsequent experiments were performed at this time. For kinetic analysis of taurine uptake, NPC were incubated with increasing

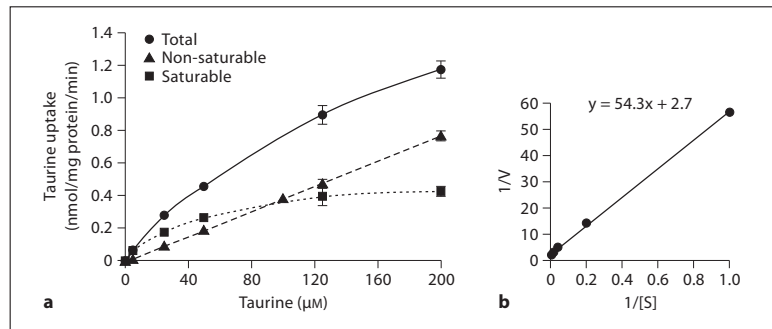


Fig. 1. Kinetic analysis of ^3H -taurine uptake by NPC. Cells were incubated during 30 min with ^3H -taurine (0.8 $\mu\text{Ci/ml}$, 28 nM) and unlabeled taurine over a concentration range of 1–200 μM . **a** ● = Total taurine uptake; ▲ = uptake measured in the absence of NaCl, replaced by KNO_3 (non-saturable component); ■ = uptake resulting from subtracting the Na^+/Cl^- -independent uptake (saturable

component). Uptake rates were calculated from the amount of radioactivity in the cells after the uptake period and the unlabeled taurine in the incubation media. **b** Lineweaver-Burk plot of the saturable component. The V_{max} and K_m constants were calculated using the Lineweaver-Burk equation. Results are means \pm SE of 6–20 experiments. V = Taurine uptake; S = taurine concentration.

concentrations of unlabeled taurine, in the range of 1–200 μM and 0.8 $\mu\text{Ci/ml}$ of ^3H -taurine (28 nM). Accumulation of ^3H -taurine was concentration dependent up to 200 μM (fig. 1a). Total taurine uptake could be separated in a non-saturable and a saturable component. The non-saturable component was identified by measuring ^3H -taurine uptake in a medium with equimolar substitution of NaCl by KNO_3 . Taurine accumulated under this condition was subtracted from the total ^3H -taurine uptake. This procedure evidenced the saturable component (fig. 1a). The kinetic constants of this saturable component were calculated using the Lineweaver-Burk equation. The Lineweaver-Burk plot (fig. 2b) revealed a V_{max} of 0.39 ± 0.04 nmol/mg protein/min and a K_m of 21.7 ± 2.6 μM .

Taurine uptake by NPC was Na^+ and Cl^- dependent. Figure 2a shows ^3H -taurine uptake measured in the presence of increasing Na^+ concentrations (0–135 mM) and a fixed concentration of Cl^- , made by equimolar replacement of NaCl by choline chloride. Figure 2b shows ^3H -taurine uptake measured in the presence of increasing concentrations of Cl^- (0–135 mM) and a fixed concentration of Na^+ , made by equimolar replacement of NaCl by sodium gluconate. Results showed a clear Na^+/Cl^- dependence of taurine uptake in NPC. The concentrations of Na^+ and Cl^- at which half-maximal ^3H -taurine transport occurs were 95.2 ± 9 and 15.2 ± 2.9 mM, respectively. The ^3H -taurine transport was a sigmoidal function of the concentration of Na^+ , with a Hill coefficient of 2.032 (fig. 2a). The ^3H -taurine transport was a hyperbolic function of the concentration of Cl^- , and the Hill coefficient

was 1.183 (fig. 2b). These results indicate an apparent Na^+/Cl^- /taurine stoichiometry of 2:1:1.

The specificity of the saturable ^3H -taurine uptake in NPC was assessed by measuring the competitive effect of the β - and γ -amino acids, hypotaurine, β -alanine and GABA, all tested at 1-mM concentration. Creatine was used as a control. Figure 3 shows that the most potent blocker was hypotaurine, which reduced the ^3H -taurine uptake by 92%. β -Alanine and GABA inhibited ^3H -taurine uptake by 77 and 69%, respectively, whereas creatine had no significant effect (fig. 3).

TauT Protein Expression and Subcellular Localization

TauT protein in NPC was revealed by Western blotting and immunocytochemistry, using an anti-rat C-tail TauT antibody. TauT was detected in NPC as a single band of about 70 kDa. Figure 4 shows the TauT band from lysates of NPC and tissue (embryonic mesencephalon). TauT immunoreactivity in cells forming neurospheres was visualized by epifluorescence microscopy (fig. 5a, b). Counting the number of TauT-positive neurosphere-forming cells revealed that 98.8% (± 1.3) expressed the transporter. The subcellular distribution of the TauT immunoreactivity in NPC from disaggregated neurospheres was examined by confocal microscopy. NPC are small cells (12.9 ± 0.6 μm), with large nuclei (9.1 ± 0.4 μm) (fig. 5c, d). TauT immunoreactivity was predominantly localized at the cell membrane. Some TauT reactivity was also located at the cytosol. Very little reactivity was found at the nucleus (fig. 5d).

Fig. 2. Na⁺ and Cl⁻ dependence of taurine uptake in NPC. **a** Uptake of ³H-taurine measured in the presence of increasing Na⁺ concentrations (0–135 mM) and a fixed concentration of Cl⁻ made by equiosmolar replacement of NaCl by choline chloride. **b** Uptake of ³H-taurine measured in the presence of increasing concentrations of Cl⁻ (0–135 mM) and a fixed concentration of Na⁺, made by equiosmolar replacement of NaCl by sodium gluconate. The Hill plots are from of the corresponding data in **a** and **b**. Results are means ± SE of 6 experiments.

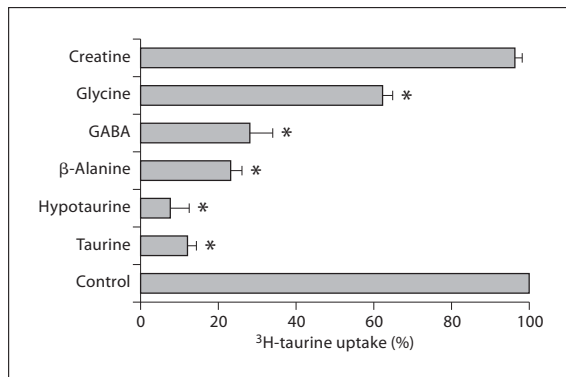
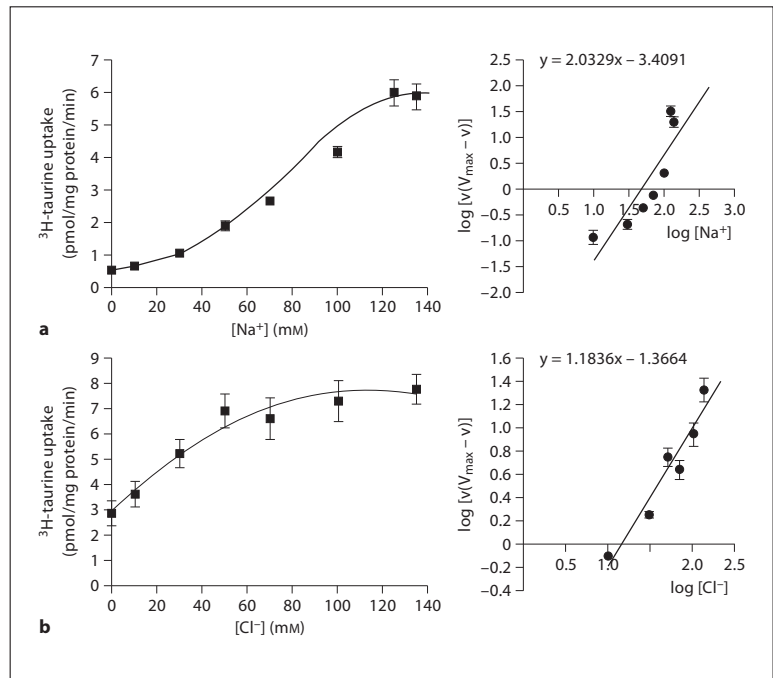


Fig. 3. Substrate specificity of taurine uptake in NPC. Na⁺/Cl⁻-dependent ³H-taurine uptake was measured as described in figure 2a, in the absence (control) or presence of unlabeled taurine, hypotaurine, β-alanine, GABA, glycine or creatine, all 1 mM. Bars represent the percentage reduction in ³H-taurine uptake when measured in the presence of unlabeled amino acids. Results are means ± SE of 12 experiments. * p < 0.01.

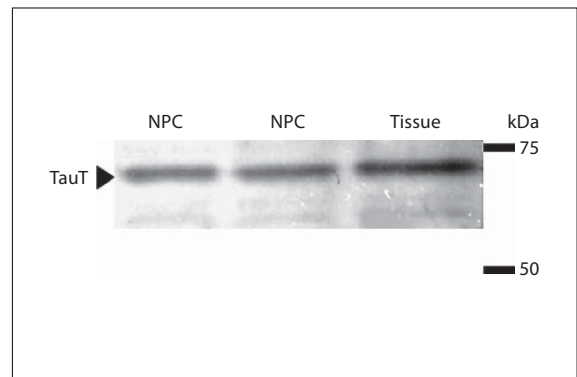


Fig. 4. TauT protein expression in NPC and the mesencephalon tissue revealed by immunoblotting. Proteins from lysates of the cells or tissue were separated by SDS-PAGE (10%) and TauT was detected using an anti-rat C-tail TauT antibody (see Methods). Representative assay from 6 separate experiments.

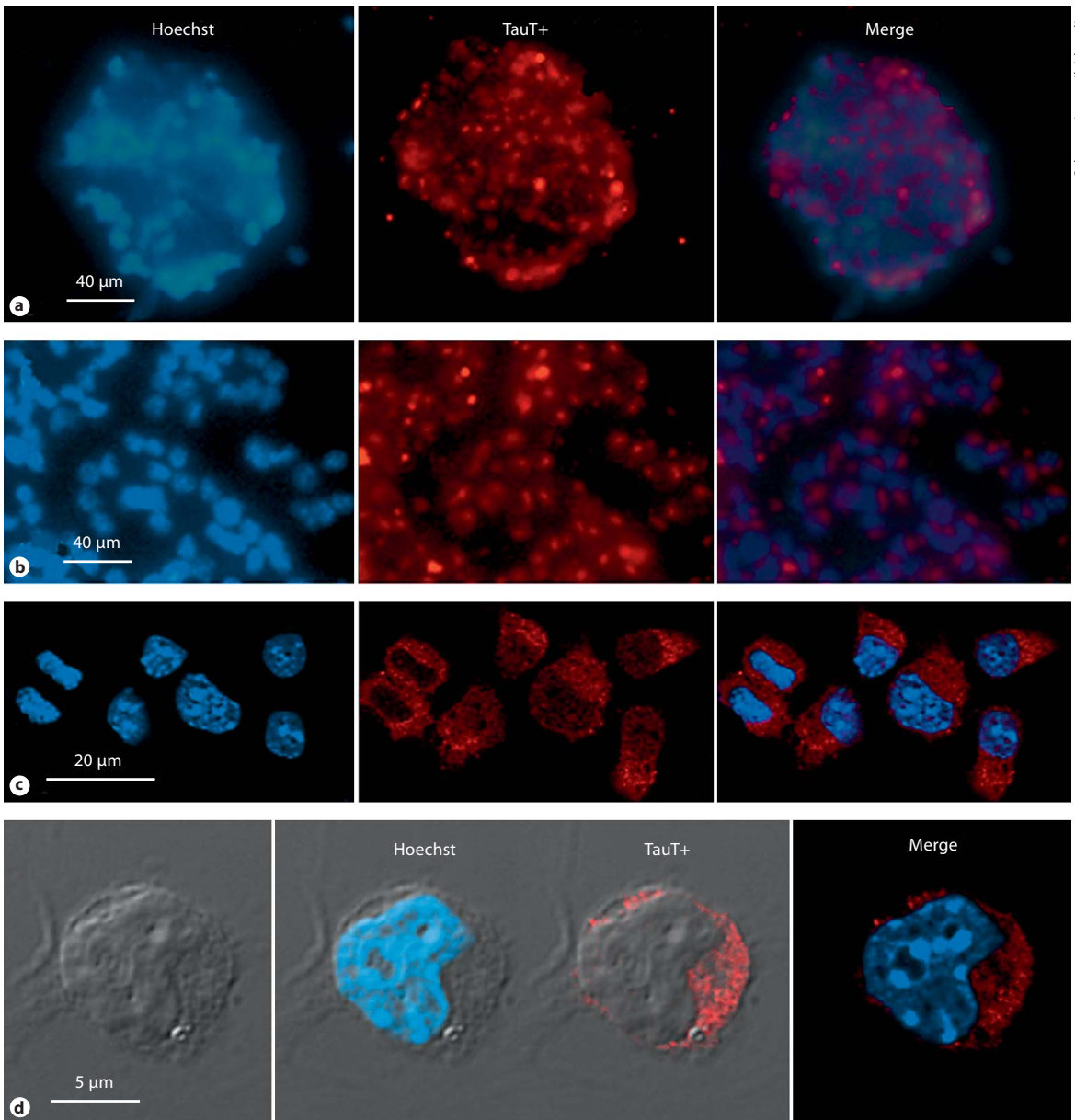


Fig. 5. Identification and localization of TauT in NPC. TauT reactivity detected by immunocytochemistry, using a primary antibody anti-TauT, followed by the secondary antibody Alexa Fluor 568. Nuclei were counterstained with Hoechst. **a, b** TauT reactivity in neurospheres (**a**) or in disaggregated cells (**b**) visualized by epifluorescence microscopy. **c** TauT reactivity in NPC, visualized by confocal microscopy (see Methods). **d** Subcellular localization

of TauT reactivity by confocal microscopy in an optical slice taken in the z-axis at 0.75 μM intervals. Left column: a differential interference contrast Nomarski image of a single NPC; middle column: cell image with Hoechst-stained nucleus and TauT reactivity; right column: merge (Hoechst and TauT). The photomicrographs are from a representative assay.

Discussion

The present study provides evidence of the functional expression of TauT in NPC obtained from the mice embryonic mesencephalon. To our knowledge, this is the first detailed report on the expression and functional characterization of TauT in NPC. Essentially all the NPC cells were TauT positive, regardless of their growing state or differentiation commitment, stressing the importance of this mechanism to maintain taurine levels in NPC.

Taurine transport is an essential mechanism to maintain taurine levels in brain cells, particularly in the embryonic brain, where the contribution of endogenous synthesis seems only marginal or absent. No evidence of mRNA for cysteine dioxygenase or cysteine sulfinate decarboxylase is found in glia or neurons of the developing rodent brain [Rassin et al., 1981; Fujita et al., 2006]. Only in differentiated astrocytes, some cysteine sulfinate decarboxylase activity has been detected [Reymond et al., 1996]. Our previous study on the effect of taurine on NPC proliferation, showing a rapid depletion of the taurine pool in NPC grown in the absence of taurine, suggests that these cells also lack the machinery for endogenous biosynthesis [Hernández-Benítez et al., 2010]. The present results showing an efficient mechanism for taurine transport in NPC, explain the fact that NPC cultures grown in the presence of taurine rapidly recover the high taurine levels found in the embryonic tissue. TauT is expressed in a large variety of cells and tissues, in accordance with the ubiquitous presence of taurine in animal cells. TauT has been cloned from a variety of tissues including the rat and mouse brain [Liu et al., 1992; Smith et al., 1992]. TauT cDNA encodes for a protein of about 70 kDa, with high homology between tissues and species. The functional characterization of taurine transport also shows remarkable similarities between different cell types, including the NPC examined in the present study.

Taurine uptake in NPC showed a saturable, Na^+/Cl^- -dependent component and a non-saturable, Na^+/Cl^- -independent component. The K_m and V_{\max} values of the saturable uptake component were similar to those found in brain cells. The V_{\max} of 0.39 nmol/mg protein/min found in NPC was within the range reported for cerebellar granule cells (0.64), astrocytes (0.2), mouse developing neurons (0.67) and for the rat brain-cloned TauT (0.4) [Sánchez-Olea et al., 1991; Schousboe et al., 1991; Smith et al., 1992; Fujita et al., 2006]. Similarly, the K_m value of 21.7 μM found in NPC was of the same order of magnitude as the K_m of 10.6 μM in mouse cerebrocortical neurons, 4.5 μM in mouse brain, 35 μM in mouse astrocytes

and 43 μM in TauT cloned from rat brain [Sánchez-Olea et al., 1991; Liu et al., 1992; Smith et al., 1992; Fujita et al., 2006]. TauT in NPC shows an apparent stoichiometry of 2:1:1 for Na^+/Cl^- /taurine transport. Since at physiological pH taurine is a zwitterion without net charge, the TauT operation is electrogenic. TauT in NPC was specific for the β -amino acids, taurine, hypotaurine and β -alanine, with some interaction also with the γ -amino acid GABA. These features of TauT in NPC are similar to those reported for TauT in other brain and non-brain cells [Smith et al., 1992; Voss et al., 2004; Fujita et al., 2006].

TauT protein expression in NPC identified by Western blotting analysis showed the 70-kDa protein, as has been reported in all cell types examined so far. TauT in NPC was found localized at the plasma membrane and some at the cytosol, but it was essentially absent from the nuclear membrane. In NIH3T3 fibroblasts, TauT seems to be inside the nuclear compartment [Voss et al., 2004]. So far, no other studies reported TauT subcellular distribution. More information is necessary to clarify whether the nuclear location of TauT is cell specific.

TauT has a critical function in the well-established role for taurine as osmolyte in a large variety of cells, including brain cells. Reductions in external osmolarity evoke an immediate efflux of taurine, of a magnitude proportional to the hypotonic stimulus. This taurine mobilization occurs through a volume-sensitive taurine leak pathway. In brain cells, the non-saturable component of taurine uptake is highly increased by hyposmolarity and presumably represents the volume-sensitive taurine leak pathway [Sánchez-Olea et al., 1991; Schousboe et al., 1991]. Similarly, the non-saturable component of NPC was increased by hyposmolarity (not shown). Taurine efflux through this pathway, together with the efflux of other organic osmolytes, contributes to reestablish the osmotic equilibrium. When hypotonicity is large or persistent, the cells become taurine depleted. Upon osmolarity correction, the cell taurine pool is replenished by the TauT operation. The transporter also plays a key role in the cell adaptive response to hypertonicity. TauT upregulation via the TonEBP pathway is a characteristic cell response to a hypertonic condition, directed to increase cell taurine concentration, and together with other osmolytes, counteracts cell volume loss [Ito et al., 2004]. The remarkable similarities of the distinctive features of TauT in a variety of cells, tissues and organs stress the importance of this universal mechanism for cell homeostasis.

A previous study from our laboratory showed an effect of taurine increasing the number of NPC in cultures ob-

tained from mice mesencephalon. Cells cultured in taurine-free conditions have a negligible taurine cell content, while those grown in the presence of taurine reach the high taurine levels characteristic of the developing brain. The mechanisms of taurine action increasing NPC proliferation are still unknown. The present demonstration of an ubiquitous and active taurine transporter in NPC suggests that taurine action may be exerted from outside as well as from inside the cell.

Embryonic NPC have been used in transplantation experiments into the adult brain. To optimize this procedure, cells may require the presence of cues or factors found in the embryonic brain milieu but absent in the adult. Taurine may be one of these factors, and the func-

tional TauT in NPC cells will provide the mechanism for increasing cell taurine levels in the transplanted embryonic cells.

Acknowledgements

We acknowledge the valuable technical assistance of Gabriel Orozco Hoyuela for his assistance in the handling of mice used for the study. This work was supported in part by grants from UNAM IMPULSA-03, DGAPA IN203410 and CONACYT 98952. This study is part of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Reyna Hernández-Benítez at the Universidad Nacional Autónoma de México, with a CONACYT, Mexico, fellowship.

References

- Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L (2003): Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res* 34:572–588.
- Campos LS (2004): Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res* 15: 761–769.
- Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quiñones-Hinojosa A (2006): Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. *Stem Cells* 24:2851–2857.
- Deleyrolle LP, Reynolds BA (2009): Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods Mol Biol* 549:91–101.
- Fujita T, Shimada A, Wada M, Miyakawa S, Yamamoto A (2006): Functional expression of taurine transporter and its up-regulation in developing neurons from mouse cerebral cortex. *Pharm Res* 23:689–696.
- Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D (2002): Disruption of the taurine transporter gene (TauT) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* 16:231–233.
- Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Saldaña IT, Ramos-Mandujano G (2010): Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 88:1673–1681.
- Huxtable RJ (1992): Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:101–163.
- Ito T, Fujio Y, Hirata M, Takatani T, Matsuda T, Muraoka S, Takahashi K, Azuma J (2004): Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J* 382:177–182.
- Liu QR, López-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1992): Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12145–12149.
- Miller TJ, Hanson RD, Yancey PH (2000): Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125:45–56.
- Miranda-Contreras L, Ramírez-Martens LM, Benítez-Díaz PR, Peña-Contreras ZC, Mendoza-Briceño, RV, Palacios-Prü EL (2000): Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Dev Neurosci* 18:83–91.
- Pasantes-Morales H, Quesada O, Morán J (1998): Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol* 442:209–217.
- Rassin DK, Sturman JA, Gaull GE (1981): Sulfur amino acid metabolism in the developing rhesus monkey brain: subcellular studies of taurine, cysteinesulfinic acid decarboxylase, gamma-aminobutyric acid, and glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem* 37:740–748.
- Reymond I, Almarghini K, Tappaz M (1996): Immunocytochemical localization of cysteine sulfinate decarboxylase in astrocytes in the cerebellum and hippocampus: a quantitative double immunofluorescence study with glial fibrillary acidic protein and S-100 protein. *Neuroscience* 75:619–633.
- Sánchez-Olea R, Morán J, Schousboe A, Pasantes-Morales H (1991): Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosci Lett* 130: 233–236.
- Schousboe A, Sánchez-Olea R, Morán J, Pasantes-Morales H (1991): Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *J Neurosci Res* 30:661–665.
- Schuller-Levis GB, Park E (2003): Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* 226:195–202.
- Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkha G, Frotscher M, Snyder EY (2006): Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* 3:801–806.
- Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinschenk RL (1992): Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 42:563–569.
- Stipanuk MH (2004): Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. *Neurochem Res* 29:105–110.
- Sturman JA (1993): Taurine in development. *Physiol Rev* 73:119–147.
- Tappaz ML (2004): Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res* 29:83–96.
- Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D (1999): Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208:166–188.
- Voss JW, Pedersen SF, Christensen ST, Lambert IH (2004): Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Eur J Biochem* 271:4646–4658.
- Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, Zilles K, Haas H, Lang F, Häussinger D (2007): Phenotype of the taurine transporter knockout mouse. *Methods Enzymol* 428:439–458.
- Wójcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, Costa M, Chen Y (2010): The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* 208:19–25.
- Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS (2008): The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol* 13: 57–65.



REGULAR ARTICLE

Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells

Reyna Hernández-Benítez, Gerardo Ramos-Mandujano, Herminia Pasantes-Morales*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Received 3 October 2011; received in revised form 26 January 2012; accepted 28 February 2012
Available online 7 March 2012

Abstract This study reports an effect of taurine (1–10 mM) increasing markedly (120%) the number of neural precursor cells (NPCs) from adult mouse subventricular zone, cultured as neurospheres. This effect is one of the highest reported for adult neural precursor cells. Taurine-containing cultures showed 73–120% more cells than controls, after 24 and 96 h in culture, respectively. Taurine effect is due to enhanced proliferation as assessed by BrdU incorporation assays. In taurine cultures BrdU incorporation was markedly higher than controls from 1.5 to 48 h, with the maximal difference found at 1.5 h. This effect of taurine reproduced at every passage with the same window time. Taurine effects are not mimicked by glycine, alanine or GABA. Clonal efficiency values of 3.6% for taurine cultures and 1.3% for control cultures suggest a taurine influence on both, progenitor and stem cells. Upon differentiation, the proportion of neurons in control and taurine cultures was 3.1% (± 0.5) and 10.2% (± 0.8), respectively. These results are relevant for taurine implication in brain development as well as in adult neurogenesis. Possible mechanisms underlying taurine effects on cell proliferation are discussed.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Taurine is a sulfur amino acid, present in large amounts in most cell types and tissues as a free amino acid. It is not a protein amino acid and participates in only few metabolic reactions (Huxtable, 1992). Taurine has a function as osmoregulator (Pasantes-Morales, 2007) and exhibits a protective effect in a variety of detrimental situations, often acting as antioxidant (Schaffer et al., 2009). Early studies on brain taurine point to its involvement in brain development. Taurine levels in the immature brain are 3–4-fold higher than in the adult brain, a decrease consistently observed regardless of the species variations in brain taurine content (Agrawal et al., 1968;

Abbreviations: NPCs, neural precursor cells; SVZ, subventricular zone; FBS, fetal bovine serum; MTT, [3–84,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; TUNEL, TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling; EGF, epidermal growth factor; FGF2, fibroblast growth factor 2; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; TauT, taurine transporter.

* Corresponding author at: División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, 04510 Mexico DF, Mexico. Fax: +52 5622 5607.

E-mail address: hpasante@ifc.unam.mx (H. Pasantes-Morales).

Sturman and Gaull, 1975; Miller et al., 2000). Taurine deficiency disturbs development in cats (Sturman, 1993) leading to a delay in cell division and migration in cerebellum and visual cortex (Sturman et al., 1985; Palackal et al., 1986). Similarly, taurine deprivation in newborn monkeys results in abnormalities in the visual cortex characterized by delayed migration of neurons and poor differentiation of pyramidal cells (Neuringer et al., 1990). Furthermore, studies in vitro in cultures of dissociated cerebellum showed that cell taurine depletion significantly reduces cell migration (Maar et al., 1995). It seems therefore that a deficiency of taurine disturbs the developmental precise program of cellular proliferation, migration and differentiation. In further support to an involvement of taurine in brain development, a recent study reports that the detrimental influence of gestational protein restriction on fetal brain is prevented by supplement of taurine during pregnancy (Liu et al., 2011).

The mechanism(s) of this taurine requirement for brain development are poorly understood. The influence of taurine may be exerted on cell division, migration or/and differentiation. These possibilities can be examined in a preparation of neural precursor cells (NPCs) collectively including neural progenitor and stem cells, which are characteristically proliferative and self renewing, and maintain the ability to differentiate into neural cell lineages (Reynolds et al., 1992; Rietze and Reynolds, 2006). NPCs actively proliferate in cultures as floating spherical clusters called neurospheres. This is a widely used technique to characterize a variety of NPCs features. In the proper conditions, i.e. free-serum media supplemented with specific growth factors, NPC cultures can be expanded through several passages. If then switched to serum-containing media, NPCs differentiate into astrocytes, neurons and oligodendrocytes, which are formed in different proportion, being astrocytes the most abundant cell type formed (Ahmed, 2009). A previous study from our laboratory described an effect of taurine increasing proliferation of NPCs generated from embryonic mouse mesencephalon (Hernández-Benítez et al., 2010a) but there is no information about taurine effects in NPCs from the adult brain.

Interest in studies about adult NPCs is raised by the possibility of increasing and manipulating neurogenesis in the adult brain. Neurogenesis persists in some regions of the adult brain derived from NPCs located at the SVZ of the lateral ventricles (Ming and Song, 2011), and it is enhanced by brain injuring conditions such as ischemic stroke, seizures or in neurodegenerative diseases (Arvidsson et al., 2002; Nakatomi et al., 2002; Parent, 2007; Vandenbosch et al., 2011). NPCs may then be a source of neuronal replacement during brain repair. It is therefore of interest to investigate whether taurine has an influence on proliferation or/and differentiation of NPCs obtained from the adult brain. The present study on NPCs obtained from the SVZ of adult mice brain, examined whether taurine affects cell viability and proliferation and evaluated its effect on the proportion of astrocytes and neurons generated after differentiation.

Results

Neural precursor cells (NPCs) of the SVZ of mice adult brain, cultured as neurospheres were used in this study. NPCs from

adult tissue are currently defined by self-renewal, positive reaction to nestin and multipotent differentiation. We found that i) neurospheres are formed from the dissociated SVZ and expanded through several passages, ii) cells forming neurospheres from passages 1 to 6 ranged 90.4–95.5% positive to nestin, 0.92–2.2% positive to GFAP and 1.2 to 2.3% positive to β -III-tubulin, and iii) under the appropriate conditions, NPCs differentiate into neurons (β -III-tubulin-positive cells), and astrocytes (GFAP-positive cells) with a marked reduction (up to 2.9%) of nestin-positive cells (Supplementary Figs. 1A–C). It can be then reasonably concluded that our cultures contain essentially NPCs organized as neurospheres. As shown by the range of variation in the quantitative composition of cells, no significant difference was found through the several passages, 1–6.

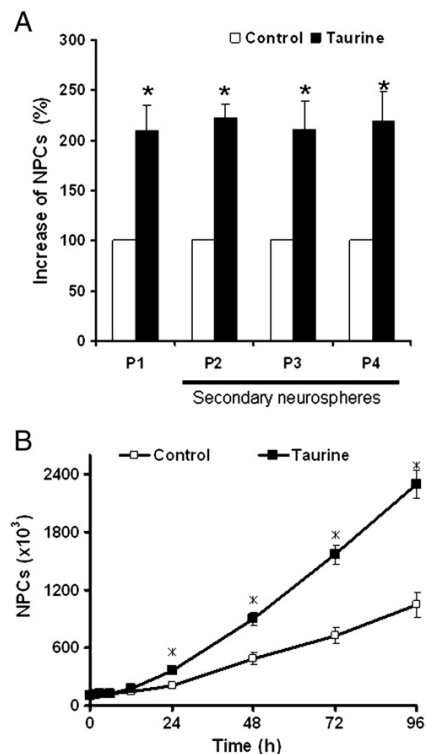


Figure 1 Effect of taurine on the number of NPCs grown as neurospheres. Neurospheres generated in EGF/FGF2 plus or minus taurine, were mechanically disaggregated and the cells were directly counted. A. Cells from primary neurospheres (P1) or from secondary neurospheres at different culture passages (P2–P4). At each passage (P) the number of NPCs was counted. Bars represent the percentage increase in NPCs grown in the presence of 10 mM taurine (black bars) over the control condition (empty bars). The number of cells in empty bars was set at 100% to homologate differences between primary and secondary passages. B. Increase with time of the number of NPCs from neurospheres grown in the control medium (\square) or in the presence of 10 mM taurine (\blacksquare). Values are means \pm SE, $n \geq 5$ experiments, significantly different at $*P < 0.05$.

The effect of taurine on NPCs was examined in primary neurosphere cultures as well as on the secondary neurospheres formed after successive culture passages, up to 4–6 passages. Primary neurospheres originate directly from the excised SVZ, and cultured in a conditioned medium without FBS. Growth and proliferation of NPCs forming neurospheres are sustained by the growth factors EGF and FGF2. No neurospheres were formed in cultures with taurine but without growth factors.

Addition of taurine to cultures markedly increased the number of NPCs. All secondary cultures start with a similar number of cells (about 200×10^3), which is referred to as the initial cell number. After 96 h, taurine cultures contained about 120% more cells than control cultures. This effect of taurine was consistently observed in primary cultures as well as in secondary cultures at all passages (Fig. 1A). The increase with time (1–4 days) of NPC number in cultures in the presence or absence of taurine is shown in Fig. 1B. After 24 h taurine cultures have significantly more cells (73%) than

controls. This difference further increased with time, and at 48, 72 and 96 h, taurine cultures have, respectively, 85%, 116% and 120% more cells than controls (Fig. 1B).

The effect of taurine increasing NPC number may result from a protective action improving cell viability or/and from an increase in proliferation. This was examined by measuring viability by the Trypan blue exclusion and MTT assays, and proliferation by BrdU incorporation. Fig. 2A shows the time course of BrdU incorporation, in cells cultured with or without taurine. BrdU incorporation was monitored at short times in culture, 1.5, 3, 6 and 12 h, and thereafter every 24 h up to 96 h (Fig. 2A). In control cultures, the percentage of BrdU⁺ cells found immediately after neurosphere disaggregation in the previous passage was 14% (initial point of the curve) and this number remained essentially unchanged during the first 12 h in the new culture. During the next hours (24–48 h) the number of BrdU⁺ cells increased up to 24% and thereafter a decline was observed (Fig. 2A). The BrdU incorporation pattern in the presence

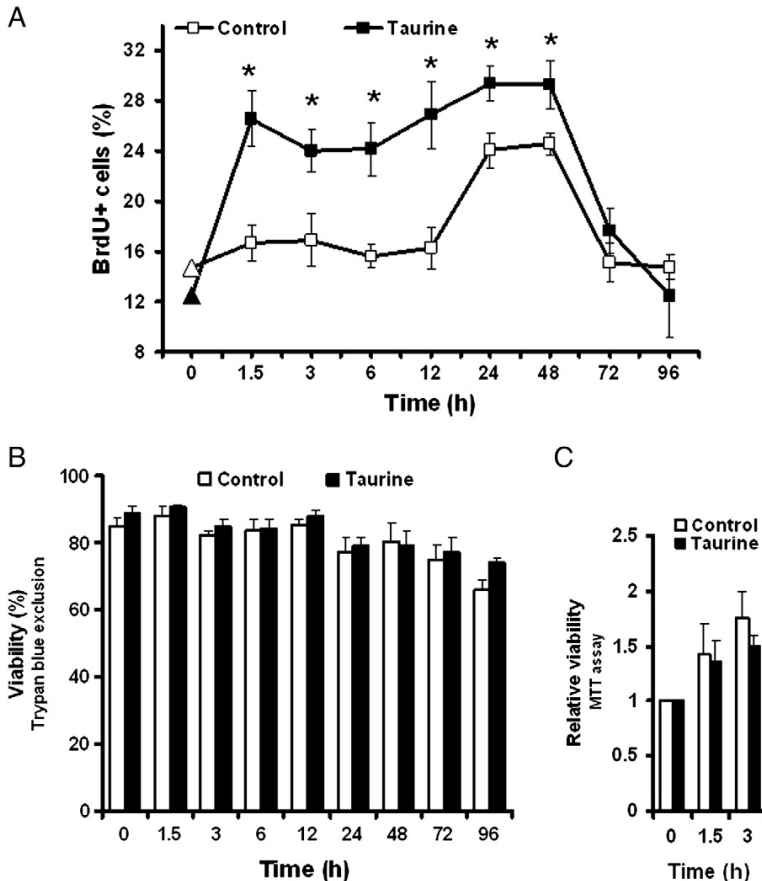


Figure 2 Viability and BrdU incorporation of NPCs formed over the time in culture in the presence or absence of taurine. A. Time-course of cellular BrdU incorporation, after a 1.5 h pulse (see Materials and methods). Results are expressed as percentage of BrdU⁺ cells over total cells counted in control cultures (□) or in taurine containing cultures (■). The initial point in the curve corresponds to the percentage of BrdU⁺ cells found after 96 h in culture, immediately after neurosphere disaggregation (△, ▲). B. Cell viability determined by the Trypan blue exclusion assay as described in Materials and methods. C. Cell viability assayed by MTT. Bars represent means ±SE of 4–12 experiment. Significantly different from their respective controls at **P*<0.05.

of taurine was markedly different than in controls. The percentage of BrdU in cells from dissociated neurospheres was about 12%, but once seeded for a new culture, a striking and fast increase in BrdU incorporation occurred, so that as early as 1.5 h of culture the number of BrdU⁺ cells has doubled attaining 26% of NPCs. At this time a BrdU incorporation peak was observed (Fig. 2A). BrdU incorporation rate slightly increased in the following days up to 48 h, and declined thereafter. Upon neurosphere disaggregation to start a new cycle of expansion, the effect of taurine increasing BrdU incorporation occurs again, with the same window time, and this sequence of events reproduces at every passage. Comparing the BrdU incorporation curve in control and taurine cultures, it is evident that taurine was markedly increasing the number of NPCs in DNA synthesis phase during the first hours after seeding (Fig. 2A). In contrast, taurine did not affect cell viability, examined by Trypan blue exclusion and MTT assays. No difference was found at any time between 1.5 and 96 h between taurine and control cultures (Figs. 2B, C). Apoptotic death estimated by TUNEL was found to be lower than 3%, in cultures either in the presence or absence of taurine (results not shown).

Taurine effect increasing NPC number was examined at taurine concentrations ranging 0.1 to 30 mM. Maximal effect was found at 10 mM, but some increase was observed already at 0.5 mM although it was significant only from 1 mM (Fig. 3A). Other amino acids such as GABA, glycine or alanine, at the same concentration, did not modify NPC number. Only the amino acids structurally similar to taurine, hypotaurine and β -alanine, exhibited some effect increasing NPC number although it is clearly lower than that of taurine (Fig. 3B). In embryonic NPCs, GABA shows a proliferative effect at low doses (Nakamichi et al., 2009). In adult NPCs, GABA (1–10 mM) induced a slight decrease in cell number (Fig. 3C).

NPCs is used as a generic term including stem cell and progenitor cells. To investigate whether the effect of taurine above described occurs on the neurosphere stem cells as well as on progenitor cells, NPCs were seeded at low-density on a 96 wells plate (25 cells per well; 0.25 cells/ μ L) and the total number of neurospheres generated after 7 days was counted. Under these conditions, control cultures generated 31 (\pm 4) neurospheres per plate while in the presence of taurine 86 (\pm 14) neurospheres per plate were

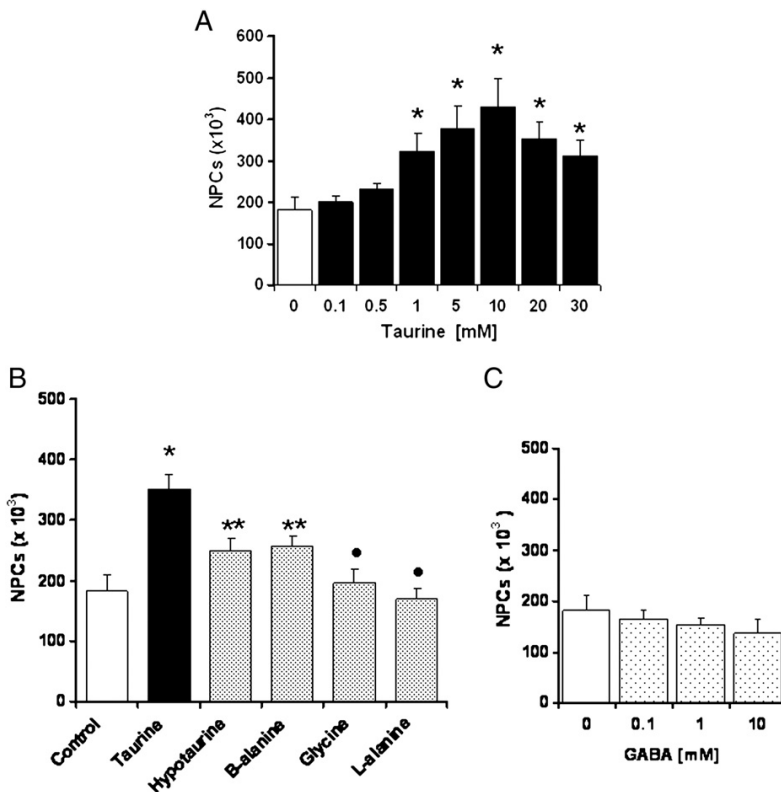


Figure 3 Concentration-dependent effect of taurine and other amino acids on NPC number. Neurospheres were generated in control condition (empty bars), in taurine condition (black bars) or in the presence of other amino acids (spotted bars), at the indicated concentrations (in mM). After 5 days in culture, neurospheres were disaggregated and the number of NPCs was counted. A. Concentration-dependent effect of taurine. B. Effect of the amino acids: hypotaurine, β -alanine, glycine and L-alanine (at 10 mM) on NPC number. C. Concentration-dependent effect of GABA on NPC number. All results are means \pm SE, $n \geq 4$ experiments. Significantly different from control at * $P < 0.01$, significantly different from taurine bar ** $P < 0.05$ and ● $P < 0.01$.

formed, an increase of 177% (Fig. 4). The clonal efficiency in cultures with or without taurine was calculated and results showed a markedly higher efficiency in the presence of taurine than in controls (Fig. 4).

Taurine concentration in the SVZ of the lateral ventricles from which NPCs were obtained was $14.5 \mu\text{mol/g}$ protein, but the taurine content in cells forming neurospheres in the absence of taurine is of only $2 \mu\text{mol/g}$ protein. Upon taurine addition to the culture medium, this concentration strikingly increased up to $240 \mu\text{mol/g}$ protein (Fig. 5B), a level higher than that of other adult brain regions (Fig. 5A), and comparable to that found in fetal brain. This ability to concentrate taurine indicates the presence of an efficient mechanism for taurine uptake into the cell. In most cell types, taurine accumulates by the operation of a well characterized energy-dependent transporter TauT. The molecular expression of TauT in NPCs was detected by immunocytochemistry. As shown in Fig. 6A TauT is expressed in essentially all ($92.8 \pm 2.6\%$) NPCs. The functional expression of TauT was also examined. Fig. 6B shows taurine uptake by NPCs incubated with increasing concentrations of unlabelled taurine in a range of 1 to $200 \mu\text{M}$ and $0.8 \mu\text{Ci/mL}$ of ^3H -taurine. Total taurine uptake include a nonsaturable and a saturable component. The non-saturable component was identified by measuring ^3H -taurine uptake when cells were incubated in a Na^+ -free medium (NaCl replaced by KNO_3). Subtraction of this non-saturable component from total uptake revealed the saturable component. The kinetic constant values of the saturable taurine uptake calculated from the Lineweaver–Burk equation were a V_{max} of $493 \text{ pmol/mg protein/min}$ and a K_m of $41.7 \mu\text{M}$ (Fig. 6B).

Differentiation of NPCs was induced by replacing the culture medium by a medium without growth factors and containing 1% FBS. Under this condition, NPCs generated astrocytes and neurons. Astrocyte was the most abundant cell type, present in a proportion of $89.6\% (\pm 1.3\%)$. The presence of taurine in the differentiation medium only marginally decreased the percentage of astrocytes ($85.6 \pm 1.0\%$). The proportion of neurons, identified by β -III-tubulin, was only

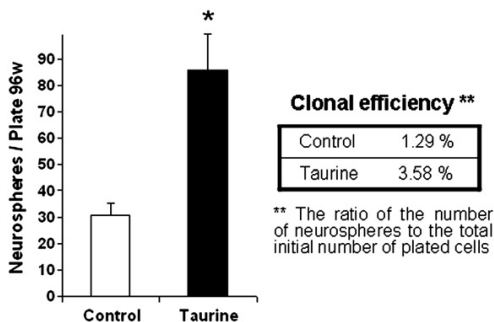


Figure 4 Clonal efficiency in taurine and control cultures. Secondary neurospheres were gently dissociated and seeded at low density (25 cells/well) on 96-well dishes, in the presence or absence of taurine. After seven days in culture, the number of formed neurospheres was counted and the clonal efficiency was calculated. Bars (\pm SE) represent the mean of neurospheres/plate in each condition. Significantly different $*P < 0.05$.

$3.1\% (\pm 0.5\%)$. In the presence of taurine the number of β -III-tubulin-positive neurons increased up to $10.2\% (\pm 0.8\%)$ (Figs. 7A, B, C). Neurons positive to the mature neuron marker MAP2 in control cultures were $1.8\% (\pm 0.4\%)$, and increased to $5.1\% (\pm 0.5\%)$ in taurine cultures (Supplementary Fig. 2). These results correspond to cells growing in 1% FBS medium during one week. The proportion of β -III-tubulin and of MAP2 positive neurons decreased at longer times in culture of 2–3 weeks, and the effect of taurine also proportionally decreased (Supplementary Fig. 3). Other differentiation media were tested in this study, as follows: 1. B27 replacing FBS, 2. ascorbic acid replacing FBS, 3. medium without FBS, 4. neurobasal medium plus B27. In the ascorbic acid medium and medium without factors, only a few number of cells survived. In the B27 medium the number of cells in the culture, including neurons decreased by 50%. In the neurobasal/B27 medium mainly neurons survived as

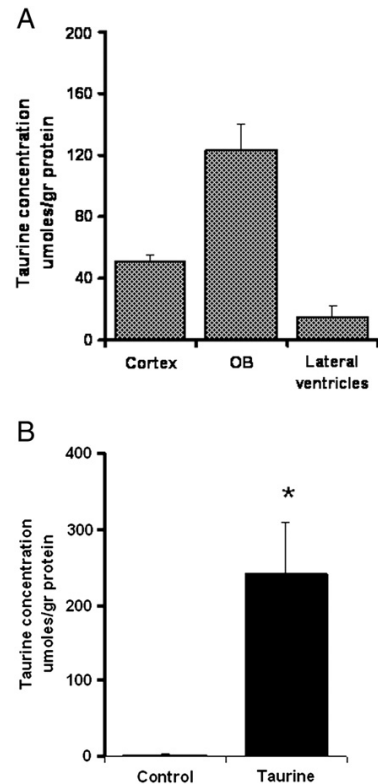


Figure 5 Taurine concentration of adult mouse brain tissues and of NPCs. Taurine levels were measured by HPLC as described in **Materials and methods**. A. Taurine content of adult neural tissues. Fresh tissue samples were isolated from cortex, olfactory bulbs and from the lateral ventricles and processed for HPLC. B. Neurosphere taurine content. Neurospheres generated in the EGF/FGF condition plus or minus taurine were collected and treated for HPLC measurements. Bars represent net taurine concentration, i.e. after subtraction of taurine values found in cells exposed to 10 mM taurine and immediately washed and processed for quantification. Data are means \pm SE of 3–4 experiments.

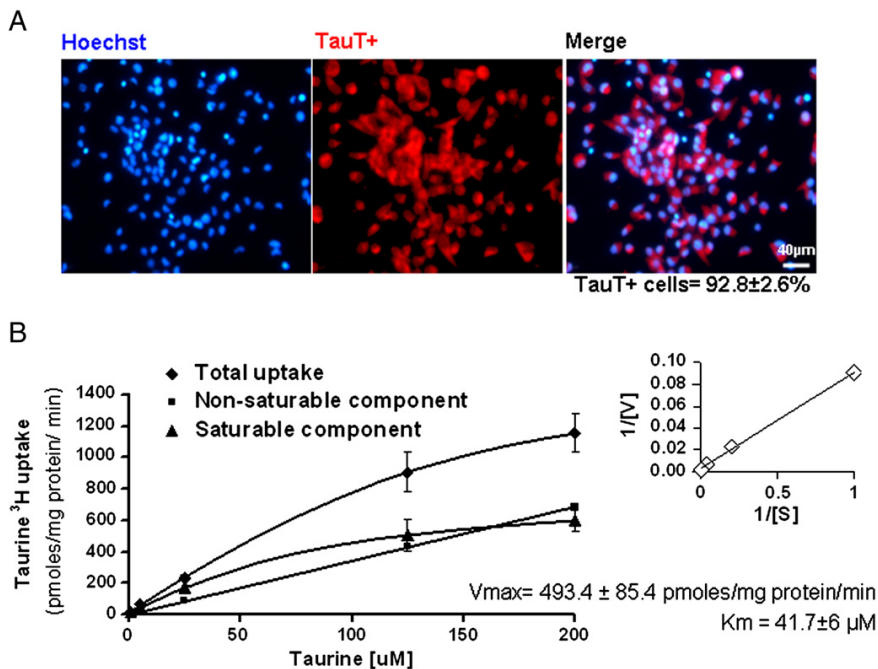


Figure 6 Molecular and functional expression of TauT in NPCs. **A**. TauT reactivity was detected by immunocytochemistry in NPCs from disaggregated neurospheres, using a primary anti-TauT antibody, followed by the secondary antibody Alexa fluor 568 (red). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Reactivity was visualized by epifluorescence microscopy. The photomicrographs are from a representative assay. **B**. Kinetic analysis of ³H-taurine uptake by NPCs. Cells were incubated during 30 min with ³H-taurine (29 nM), and unlabeled taurine over a concentration range of 1–200 μM. The lines represent the total taurine uptake (◆), the uptake measured in a Na⁺-free medium (NaCl replaced by KNO₃) (non-saturable component) (■) and the uptake resulting from subtracting the Na⁺/Cl⁻ independent uptake (saturable component) (▲). Uptake rates were calculated from the amount of radioactivity in the cells after the uptake period and the unlabeled taurine in the incubation media. **C**. Lineweaver–Burk plot of the saturable component and values of Vmax and Km calculated using the Lineweaver–Burk equation. Results are means ± SE of 13 experiments.

expected, being this medium directed to neuronal growth. However, the number of neurons in this medium decreased by 45% as compared to the FBS medium. Taurine significantly increased the proportion of neurons formed in neurobasal/B27 and in medium without FBS, but to a lower extent than in the 1% FBS medium.

Discussion

The present study reports an effect of taurine markedly increasing the number of NPCs obtained from the SVZ of adult mouse brain, and grown in culture as neurospheres. The taurine-induced increase in NPC number, of over 120%, is one of the highest reported for any other molecule or condition in NPCs from adult brain, including melatonin, dopamine or neuropeptides (O’Keeffe et al., 2009; Sothibundhu et al., 2010; Thiriet et al., 2011). We recently reported an effect of taurine increasing the number of embryonic NPCs (Hernández-Benítez et al., 2010a), but the effect now observed in NPCs derived from the SVZ is over 5-fold higher than that in embryonic cells. The reason for this difference is so far unclear, and could be related to the fact that embryonic cells are growing in an environment rich in taurine, while in the adult brain, taurine levels are much lower.

Taurine concentrations of 1–10 mM, required for its action in increasing NPC number are within the range of taurine content found in most cells types, including brain cells (Huxtable, 1992; Wójcik et al., 2010). Taurine content of NPCs cultured in a taurine-free medium is very low, but upon addition of taurine there is a fast accumulation, increasing the cell taurine content up to attain the fetal brain levels. This is likely occurring via the taurine specific carrier TauT. We found this transporter expressed and functionally active in NPCs derived from the adult brain. TauT is present in essentially all animal cells, where it is in charge of taurine uptake from plasma, and has a critical role in maintaining the intracellular taurine levels characteristic of each cellular type. The kinetic constant values for TauT found in adult NPCs cells are within the range found in most cell types, including embryonic NPCs (Hernández-Benítez et al., 2010b).

The increase in the number of NPCs observed in cultures containing taurine is not due to an effect enhancing cell survival but rather results from an action on cell proliferation, as evidenced by the BrdU incorporation assay. Taurine seems not to be a mitogen per se, since in the absence of the growth factors, no neurospheres are formed in the taurine containing medium. It is only when the proliferative activity has initiated that taurine stimulates proliferation.

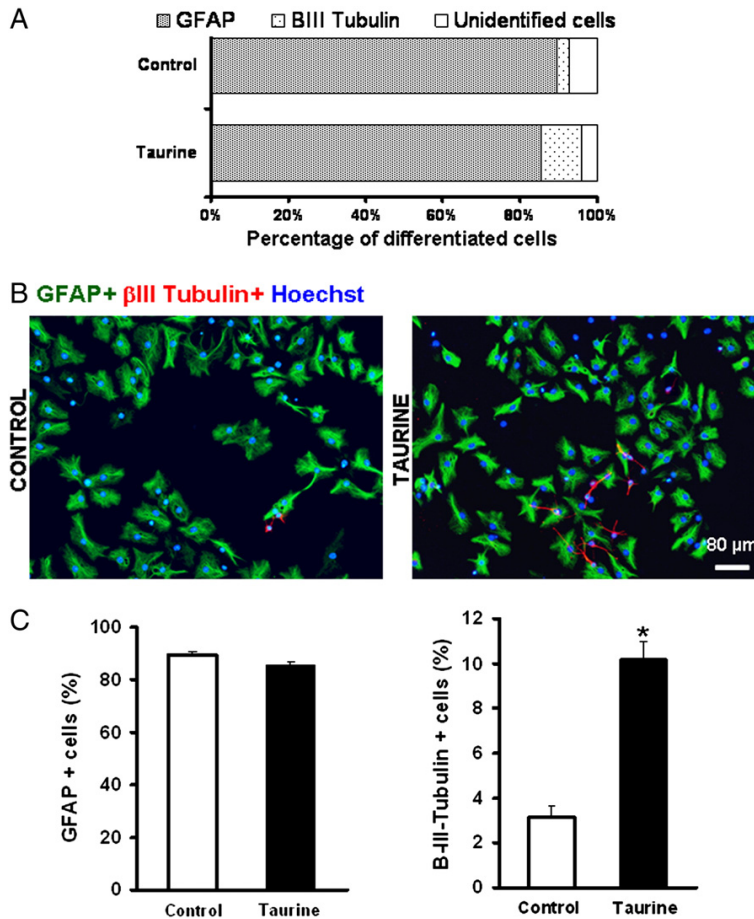


Figure 7 Taurine effect on proportion of cell lineages derived from NPCs. Neurospheres were dissociated and cultured in media containing 1% FBS in the absence of growth factors. After 7 days, cultures were immunostained for the astrocyte marker GFAP (green) or neuron marker β -III-tubulin (red). Nuclei were counterstained with Hoescht (blue). A. Distribution of differentiated cells in control or taurine condition. B. Representative photomicrographs imaged at 20 \times . C. Taurine effect on the proportion of astrocyte (left panel) or neurons (right panel) differentiated from NPCs. Bars represent means \pm SE of ≥ 12 experiments. Significantly different * $P < 0.05$.

Assays of BrdU incorporation as used in this study showed a progressive increase in the number of cells with DNA replicative activity up to 48 h in culture, when the activity declines, suggesting the transit to the phases of the cell cycle. Taurine markedly influenced the magnitude and time course of DNA synthesis in NPCs. In the presence of taurine, substantially more NPCs exhibit DNA replicative activity at a significant shorter time than in controls and this effect results in the notable increase in cell number found in taurine cultures already after 24 h of a new passage. After this time the difference in BrdU incorporation between taurine and control cultures decreases, and no difference is observed anymore at 72 h. but the initial difference in the number of formed cells persists through all culture days, so that taurine cultures contain more cells than controls, at all times.

We aimed here to elucidate whether the effect of taurine increasing proliferation occurs on stem cells as well as on

neural progenitor cells. Neurospheres are formed by aggregates of neural progenitor cells around one or several stem cells, but may also be formed by clusters of progenitor cells only (Rietze and Reynolds, 2006). The protocol of low-cell density was used in the present study to test whether taurine effect enhancing proliferation occurs in stem cells. A low plating density of 5–50 cells/ μ L has been considered as a clonal condition, .i.e. a condition in which each one of the formed neurospheres is presumably generated from a stem cell (Campos, 2004). The cell density used in the present study of 25 cells/well (0.25 cells/ μ L in 100 μ L) is among the lowest reported for NSCs, and the clonal efficiency obtained of 1.3%, is not far from the 2% calculated for the single-cell clonal efficiency (Engstrom et al., 2002). Our results show that taurine markedly enhances the number of neurospheres formed, with a clonal efficiency of 3.6%. Although this approach is not providing rigorous evidence of a clonal condition, the low dilution of the assay minimizes

the possibility of neural progenitor coalescence, and increases the possibility of neurosphere formation due to the presence of stem cells. From these considerations there is a reasonable possibility that the effect of taurine is exerted on both, stem cells and neural progenitor cells.

The mechanism(s) of the stimulatory effect of taurine on cell proliferation here described are still unknown (Pasantes-Morales and Hernández-Benítez, 2010). A possibility, based on the time course of DNA replicative activity observed in the presence or absence of taurine, is of that the mechanical disaggregation of neurospheres creates adverse conditions for DNA synthesis, and that this is prevented by taurine. Taurine cell protective activity is well documented although its mechanism is still unclear. Activity as antioxidant, a modulator of calcium homeostasis, or a general effect on membrane stability, are suggested possibilities (Schaffer et al., 2009). Taurine may influence proliferation via an effect on the redox state of the cells, which is known to regulate DNA replication and cell proliferation in various cell types, including NPCs (Kim and Wong, 2009). The antioxidant properties of taurine, reported in a variety of cells and tissues (Schaffer et al., 2009), by preventing redox imbalance in NPCs, may preserve favorable conditions for proliferation (Sharma et al., 2008; Kim and Wong, 2009). However, unpublished studies from our laboratory did not find any effect of general antioxidants increasing proliferation of NPCs as taurine did, a result arguing against an antioxidant action of taurine as the mechanism underlying its effect on NPCs proliferation.

Another possibility is related to a possible interaction of taurine with the GABA_A receptor.

High concentrations of taurine as those showing its proliferative effect may act as agonists of the GABA_A receptor (Albrecht and Schousboe, 2005) and through this mechanism could regulate proliferation. This is also an unlikely possibility since even when GABA stimulates proliferation in certain conditions in embryonic NPCs (Fukui et al., 2008), in adult cells GABA decreases proliferation, as confirmed in the present study, an action opposite to that of taurine. Taurine-induced cell swelling may possibly be related to its proliferation regulatory effect. There is evidence showing that an increase in cell volume can regulate proliferation (Stutzin and Hoffmann, 2006). The large amounts of taurine accumulated by NPCs may lead to cell swelling and via this mechanism, affecting proliferation. However, other amino acids such as glycine, alanine and GABA also tested at high concentrations may as well accumulate into the cells and induce similar swelling (Andäng et al., 2008), and nevertheless, did not exhibit the same effect as taurine in cell proliferation.

Alternately, taurine may be affecting the rate of cell migration and through this mechanism accelerate cell proliferation. By increasing cell adhesion or/and accelerating migration on the plate, cells get close faster and this proximity may then generate a propitious condition for proliferation, as has been suggested (Mori et al., 2006). In any event, the time course of the taurine effects on BrdU incorporation suggests its influence on mechanisms related to the progress of the DNA replication phase of the proliferation cell cycle. Taurine might exert this action by directly influencing the chromatin structure, via electrostatic or hydrophobic interactions with the DNA. There is evidence showing the presence of high taurine levels in nuclei of

other cell types (Lobo et al., 2000a,b). Thus, taurine could favor a more propitious chromatin configuration for DNA synthesis, and via this action regulate NPC proliferation (Buche et al., 1989). This possibility is now under investigation in our laboratory.

In addition to its effect on cell proliferation, taurine induced a significant increase in the proportion of neurons formed during the NPC differentiation process. The mechanism of this action is so far unknown.

The present results in NPCs from the present study may be relevant for the taurine role in brain development. Since the early studies of Sturman et al. (1985), it is known that taurine deficiency impairs brain development, disturbing the sequence of cell mitosis, migration and organization. After three decades, the reason for this taurine requirement for optimal brain development remains obscure. An *in vitro* system as that used in the present study offers a useful experimental model to clarify the role of taurine on brain developing cells. Taurine may also be required for neurogenesis in the adult brain. One of the few regions where neurogenesis persists in the adult brain is the SVZ of the lateral ventricles which provide new neurons to the olfactory bulb during adulthood. Cells from the SVZ proliferate and migrate via the rostral migratory stream to the olfactory bulb where they differentiate into neurons, mostly into granule cells, which integrate into the functional circuitry of the bulb (Lledo et al., 2008). Of relevance for taurine implication in neurogenesis, the olfactory bulb contains the highest taurine levels in the adult brain, and in contrast to most brain regions, there is no taurine decline during brain maturation (Miranda-Contreras et al., 2000). The high levels of taurine in the olfactory bulb may then respond to a requirement for the optimal proliferation, migration and differentiation of the NPCs in the adult brain.

Altogether, results of the present study point to the NPCs as an interesting system to examine in detail the mechanisms by which taurine participates in brain development and of its presumed requirement for neurogenesis in the adult brain. In another context, they provide a rationale for considering the use of taurine as a factor to enrich niches of neurogenesis when the cell replacement therapy is the strategy of choice for brain injuries and diseases.

Materials and methods

Materials

DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with L-glutamine and 15 mM HEPES, Pen Strep (penicillin streptomycin), fetal bovine serum (FBS), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), glutamax 100×, goat serum (GS), Neurobasal medium, B27 medium, antibodies Alexa fluor 488 (chicken anti-rat) and Alexa fluor 568 (goat anti-rabbit) were from GIBCO, Invitrogen. Anti-β-III-tubulin, progesterone, sodium selenite, putresine (1-4-diaminobutane-dihydrochloride), human transferrin, human insulin, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), bisbenzimidazole H 33258 (Hoechst), o-phthalaldehyde (OPA), D-(+)-glucose, Triton 100×, brilliant blueG, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphate buffered saline (PBS), γ-aminobutyric acid (GABA), β-alanine,

L-alanine, glycine, hypotaurine, ascorbic acid and poly-L-lysine hydrobromide, were from Sigma Aldrich. Monoclonal rat anti-bromodeoxyuridine antibody (Rat Mab anti-BrdU), rat anti-GFAP, polyclonal mouse nestin tail and MAP2, were from Accurate Chemical & Scientific Corporation, ZYMED Invitrogen, COVANCE and Santa Cruz Biotechnology, respectively. DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System was from Promega. Bovine serum albumin (BSA) was from Calbiochem. Ethanol and methanol were from Reactivos Química MEYER. Paraformaldehyde (CH₂O)_n, potassium acetate, and hydrochloric acid (HCl) were from J.T. Baker and taurine (ultra >99.5%) was from in BioChemika Fluka.

Cultures

Animals used in this study were cared for in accordance with the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. SVZ from CD1 adult mouse (6–8 weeks) was dissected and transferred into ice-cold culture medium containing: DMEM/F12, 1% glutamax 100×, 25 µg/mL insulin, 100 µg/mL transferrin, 20 nM progesterone, 60 µM putresine, 30 nM sodium selenite, 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. The tissue was triturated with a micropipette and the supernatant was collected and centrifuged at 1000 rpm/5 min. The pellet was resuspended with culture medium, and cells were seeded in the presence of EGF and FGF2 (20 ng/mL each) in sterile 6-well plates (4 × 10⁴ cells/well) or plus 10 mM taurine. Cultures were incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. EGF (20 ng/mL) was added to cultures every 48 h. After 12 days, primary neurospheres were collected by centrifugation (1000 rpm/5 min), disaggregated and reseeded at 2 × 10⁵ cells/well in sterile 6-well plates. Secondary neurospheres were obtained after 4 days. Unless otherwise indicated, all the experiments were carried out with secondary cultures between 2 and 6 passages. For studies on taurine dose/dependent effect or to test other amino acids, cells were seeded in EGF/FGF2 medium at 5 × 10⁴ cells/well in 24-well plates, and grown in media containing the indicated concentration of amino acids. The number of cells in cultures was measured by direct counting after 6 days on a Neubauer chamber. In all cultures, viability was determined by Trypan blue exclusion assay.

For lineage analysis of undifferentiated NPCs, the neurospheres were disaggregated, cells plated (100 × 10³) on pre-treated poly-L-lysine 96-well microplates. Cells were incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere during 2 h, and then fixed and processed by immunocytochemistry.

For NPC differentiation the neurospheres were disaggregated, washed and cells (50 × 10³) were plated on pre-treated poly-L-lysine cover slips, and cultured in a medium without growth factors, containing 1% FBS in the presence or absence of 10 mM taurine. Cultures were incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere during 7, 14 or 21 days and then fixed and processed for immunocytochemistry.

MTT assay

Neurospheres were mechanically dissociated and cells were seeded on poly-L-lysine-treated in 48-well plates (2 × 10⁵ cells/well) with EGF/FGF2 medium in the presence or absence of 10 mM taurine. After the indicated culture

conditions, MTT reconstituted in PBS (1 mg/mL) was added to obtain 0.1 mg/mL final concentration, and cells incubated during 60 min at 37 °C. After incubation, the formazan reaction products were dissolved with DMSO, wells stirred for 5 min on a plate shaker and the optical density measured in an UV-2100 Spectrophotometer (Cole Parmer) at 570 nm.

TUNEL assay

The TUNEL assay was carried out using the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System. After the indicated treatments cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton 100x during 5 min and incubated in darkness with the TUNEL reaction mixture (equilibration buffer, terminal deoxynucleotidyl transferase, and nucleotide mix) for 60 min at 37 °C. Nuclei were counterstained with Hoechst. Cells were observed in an epifluorescence microscope Olympus IX71 and microphotographs obtained from the QCapture Pro 6.0 software. The percentage of TUNEL-positive cells was calculated over the total of cells counted.

Low density assay

Neurospheres were mechanically disaggregated to obtain a single cell suspension. The cells were seeded on 96-well microplates (25 cells/well) containing EGF/FGF2 medium (100 µL/well) in the presence or absence of 10 mM taurine. Cultures were incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere, and after 7 days the formed neurospheres were counted.

BrdU incorporation and immunocytochemical detection

For assays of BrdU incorporation, a 1.5 h-pulse of 10 µM BrdU was applied to cultures, before the indicated time. Cells were collected, washed and resuspended with culture medium, and plated on poly-L-lysine-treated 96-well microplates. Ninety minutes after plating, cells were fixed in 4% cold paraformaldehyde for 15 min, washed (3-times 5 min each) with PBS plus 0.1% BSA, incubated 15 min with pre-heated PBS plus 2N HCl solution (37 °C), washed and permeabilized/blocked with a solution containing PBS+0.1% BSA+10% GS+0.3% Triton 100 ×, during 1 h, at room temperature. Cells were incubated overnight at 4 °C with [1:100] anti-BrdU antibody followed by 1 h incubation with [1:200] Alexa fluor 488 to visualize the signal. Nuclei were counterstained with 2 µg/mL Hoechst diluted in PBS. Microphotographs were obtained by direct epifluorescence microscope Olympus IX71 using the QCapture Pro 6.0 software and data analyzed with Adobe Image 7.0 software. The percentage of BrdU-positive cells was calculated over the total of cells counted.

Immunocytochemistry

For cell lineage analysis cultured cells were fixed in 4% cold paraformaldehyde (15 min), washed (3-times, 5 min each) with PBS+0.1% BSA, permeabilized/blocked with PBS+0.1% BSA+10% GS+0.3% Triton 100 ×, during 1 h, at room

temperature. Cell types were identified by the primary antibodies [1:200] nestin (NPC), [1:200] GFAP (astrocytes), [1:500] β -III-tubulin (neurons) and [1:100] MAP2 followed by 1 h incubation with [1:200] Alexa 488 and 568 secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 2 μ g/mL Hoechst diluted in PBS. Microphotographs were obtained by direct epifluorescence microscope Olympus IX71 using the QCapture Pro 6.0 software and data analyzed with Adobe Image 7.0 software. The number of cells positive to the different antibodies was counted from a pool of at least 200 cells per photo, from 3 to 6 photos obtained from each condition, i.e. 600–1200 cells were counted for one separate experiment. The respective percentage of each cell type was then calculated.

Measurements of taurine concentration

Taurine levels were measured in tissue samples obtained from adult mouse brain cortex and olfactory bulbs or in neurospheres cultured in the presence or absence of taurine. Samples were collected and washed with PBS, then resuspended in 150 μ L of PBS and sonicated (30 s) with a Branson Sonifier-250. For HPLC measurements, 10 μ L of each sample was mixed with 400 μ L ethanol during 20 min, centrifugated and filtered across 0.22 μ m sterile membrane. 10 μ L of the filtered was derivatized with the same volume of o-phthaldialdehyde and injected into a Beckman liquid chromatograph system. An ODS column (4.6 \times 250 mm internal diameter) was used, and the column effluent was monitored with a fluorescence detector (emission at 460 nm and excitation at 330 nm). The mobile phase was methanol/potassium acetate (0.1 M, pH 5.5) and was run at a rate of 1.5 mL/min in a linear gradient (15 min duration). Protein content was determined by the Bradford procedure.

Taurine uptake experiments

Secondary neurospheres were disaggregated and plated on poly-L-lysine-treated 48-well microplates (2 \times 10⁵ cells/well) with culture media and incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere during 24 h. For the uptake assay, plates were washed with medium containing (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1.7 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄, 1 CaCl₂, 5 glucose and 10 HEPES; 300 mOsm, pH 7.4, and cells were incubated 30 min with ³H-taurine (0.8 μ Ci/ml; 29 nM) under the condition indicated for each assay. At the end of the experiment, cells were washed and the accumulated radioactivity in cells was measured in a liquid scintillation counter. Taurine uptake is calculated as pmol/mg protein/min. KNO₃ equimolarly replaced NaCl to quantify the non-saturable component of ³H-taurine uptake. Osmolarity of all media was verified in a freezing point osmometer from Precision Systems Inc. (Natick, MA, USA).

Data analysis

All results are expressed as means \pm standard error (SE). A t-test was used to detect significant differences at **P*<0.05. Data in Fig. 3 were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.scr.2012.02.004.

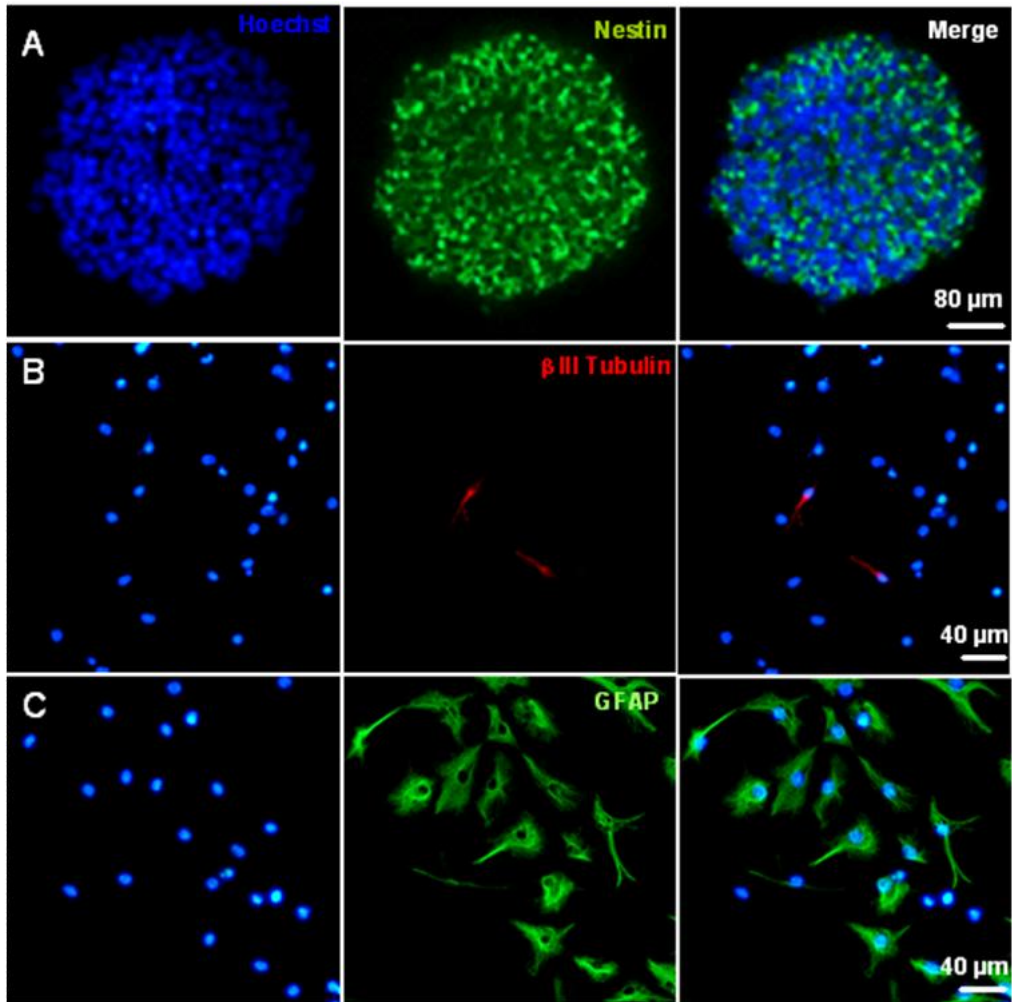
Acknowledgments

We acknowledge the valuable technical assistance of Patricia Salazar Sandoval for HPLC measurements. We are grateful to Drs. Luis Covarrubias and Ivan Velasco for their most helpful comments and suggestions throughout this study. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [grant number IN203410], and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant number 98952]. This work is part of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Reyna Hernández-Benitez at UNAM, with a CONACyT fellowship.

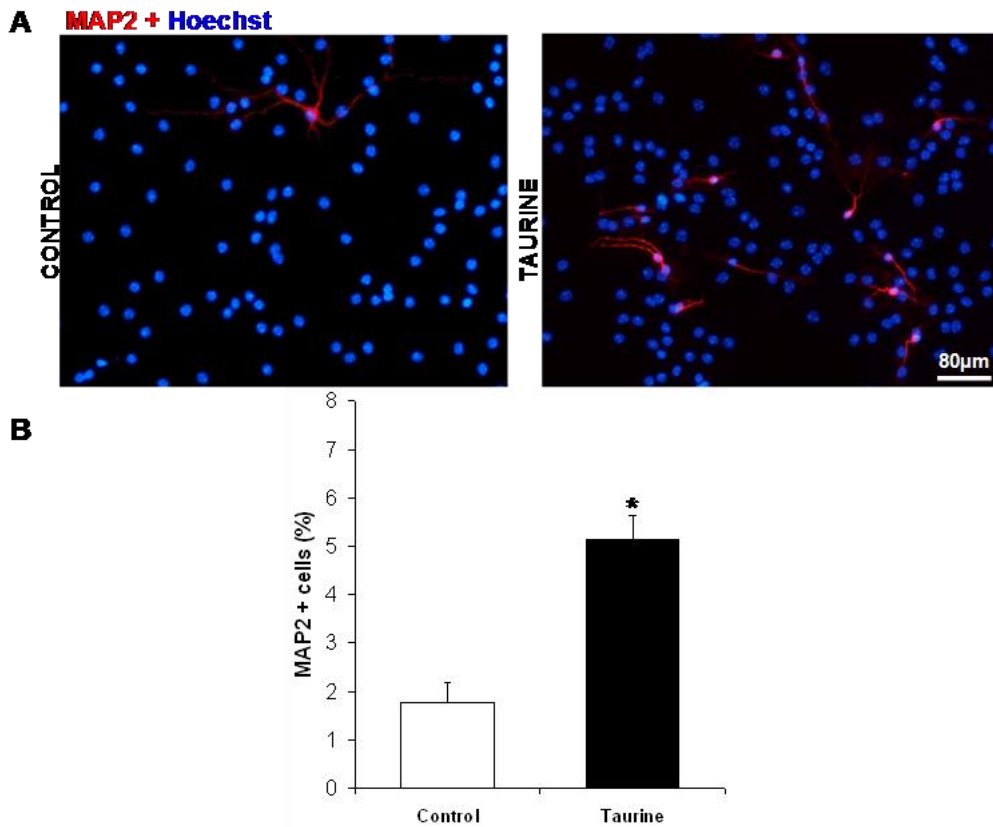
References

- Agrawal, H.C., Davies, J., Himwich, W.A., 1968. Developmental changes in mouse brain: weight, water content and free amino acids. *J. Neurochem.* 15, 917–923.
- Ahmed, S., 2009. The culture of neural stem cells. *J. Cell. Biochem.* 106, 1–6.
- Albrecht, J., Schousboe, A., 2005. Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem. Res.* 30, 1615–1621.
- Andäng, M., Hjerling-Leffler, J., Moliner, A., Lundgren, T.K., Castelo-Branco, G., Nanou, E., Pozas, E., Bryja, V., Halliez, S., Nishimaru, H., Wilbertz, J., Arenas, E., Koltzenburg, M., Charnay, P., El Manira, A., Ibañez, C.F., Ernfors, P., 2008. Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451, 460–464.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 8, 963–970.
- Buche, A., Ouassaidi, A., Hacha, R., Delpire, E., Gilles, R., Houssier, C., 1989. Glycine and other amino compounds prevent chromatin precipitation at physiological ionic strength. *FEBS Lett.* 247, 367–370.
- Campos, L.S., 2004. Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J. Neurosci. Res.* 78, 761–769.
- Engstrom, C.M., Demers, D., Dooner, M., McAuliffe, C., Benoit, B.O., Stencel, K., Joly, M., Hulspas, R., Reilly, J.L., Savarese, T., Recht, L.D., Ross, A.H., Quesenberry, P.J.A., 2002. A method for clonal analysis of epidermal growth factor-responsive neural progenitors. *J. Neurosci. Methods* 117, 111–121.
- Fukui, M., Nakamichi, N., Yoneyama, M., Ozawa, S., Fujimori, S., Takahata, Y., Nakamura, N., Taniura, H., Yoneda, Y., 2008. Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain. *J. Cell. Physiol.* 216, 507–519.
- Hernández-Benitez, R., Pasantes-Morales, H., Saldaña, I.T., Ramos-Mandujano, G., 2010a. Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 88, 1673–1681.
- Hernández-Benitez, R., Pasantes-Morales, H., Pinzón-Estrada, E., Ramos-Mandujano, G., 2010b. Functional expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in murine neural precursors. *Dev. Neurosci.* 32, 321–328.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101–163.
- Kim, J., Wong, P.K., 2009. Loss of ATM impairs proliferation of neural stem cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK signaling. *Stem Cells* 27, 1987–1998.
- Liu, J., Liu, L., Chen, H., 2011. Antenatal taurine supplementation for improving brain ultrastructure in fetal rats with intrauterine growth restriction. *Neuroscience* 181, 265–270.
- Lledo, P.M., Merkle, F.T., Alvarez-Buylla, A., 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.* 31, 392–400.

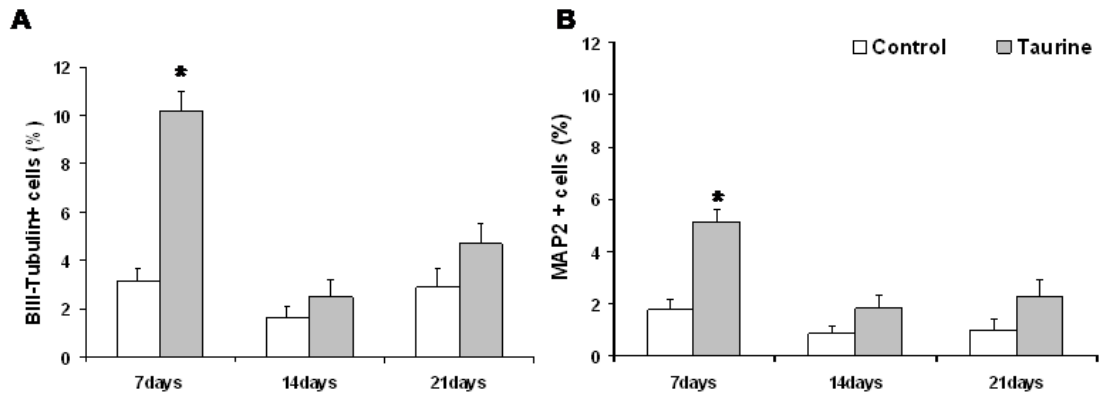
- Lobo, M.V., Alonso, F.J., del Río, R.M., 2000a. Immunocytochemical localization of taurine in different muscle cell types of the dog and rat. *Histochem. J.* 32, 53–61.
- Lobo, M.V., Alonso, F.J., del Río, R.M., 2000b. Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 313–320.
- Maar, T., Morán, J., Schousboe, A., Pasantes-Morales, H., 1995. Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, 491–502.
- Miller, T.J., Hanson, R.D., Yancey, P.H., 2000. Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 125, 45–56.
- Ming, G.L., Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.
- Miranda-Contreras, L., Ramírez-Martens, L.M., Benítez-Díaz, P.R., Peña-Contreras, Z.C., Mendoza-Briceño, R.V., Palacios-Prü, E.L., 2000. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 83–91.
- Mori, H., Ninomiya, K., Kino-oka, M., Shofuda, T., Islam, M.O., Yamasaki, M., Okano, H., Taya, M., Kanemura, Y., 2006. Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 84, 1682–1691.
- Nakamichi, N., Takarada, T., Yoneda, Y., 2009. Neurogenesis mediated by gamma-amino butyric acid and glutamate signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 110, 133–149.
- Nakatomi, H., Kuriu, Y., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M., 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429–441.
- Neuringer, M., Palackal, T., Kujawa, M., Moretz, R.C., Sturman, J.A., 1990. Visual cortex development in rhesus monkeys deprived of dietary taurine. *Prog. Clin. Biol. Res.* 351, 415–422.
- O'Keefe, G.C., Tyers, P., Aarsland, D., Dalley, J.W., Barker, R.A., Caldwell, M.A., 2009. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8754–8759.
- Palackal, T., Moretz, R., Wisniewski, H., Sturman, J., 1986. Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J. Neurosci. Res.* 15, 223–239.
- Parent, J.M., 2007. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 529–540.
- Pasantes-Morales, H., 2007. Amino acids and brain volume regulation: contribution and Mechanisms. In: Lajtha, A., Oja, S.S., Schousboe, A., Saransaari, P. (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Amino Acids and Peptides in the Nervous System*. Springer, New York, pp. 225–248.
- Pasantes-Morales, H., Hernández-Benítez, R., 2010. Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? *Neurochem. Res.* 35, 1939–1943.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S., 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565–4574.
- Rietze, R.L., Reynolds, B.A., 2006. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* 419, 3–23.
- Schaffer, S.W., Azuma, J., Mozaffari, M., 2009. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87, 91–99.
- Sharma, R.K., Zhou, Q., Netland, P.A., 2008. Effect of oxidative preconditioning on neural progenitor cells. *Brain Res.* 1243, 19–26.
- Sotthibundhu, A., Phansuwan-Pujito, P., Govitrapong, P., 2010. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J. Pineal Res.* 49, 291–300.
- Sturman, J.A., 1993. Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73, 119–147.
- Sturman, J.A., Gaull, G.E., 1975. Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *J. Neurochem.* 25, 831–835.
- Sturman, J.A., Moretz, R.C., French, J.H., Wisniewski, H.M., 1985. Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J. Neurosci. Res.* 13, 405–416.
- Stutzin, A., Hoffmann, E.K., 2006. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol.* 187, 27–42.
- Thiriet, N., Agasse, F., Nicoleau, C., Guégan, C., Vallette, F., Cadet, J.L., Jaber, M., Malva, J.O., Coronas, V., 2011. NPY promotes chemokinesis and neurogenesis in the rat subventricular zone. *J. Neurochem.* 116, 1018–1027.
- Vandenbosch, R., Borgs, L., Beukelaers, P., Belachew, S., Moonen, G., Nguyen, L., Malgrange, B., 2011. Adult neurogenesis and the diseased brain. *Curr. Med. Chem.* 16, 652–666.
- Wójcik, O.P., Koenig, K.L., Zeleniuch-Jacquotte, A., Costa, M., Chen, Y., 2010. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis* 208, 19–25.



Supplementary Figure 1. Immunocytochemical characterization of neurosphere forming cells and cell lineages derived after their differentiation. Cells derived from the subventricular zone of lateral ventricles of adult mouse were cultured as described in Methods to obtain secondary neurospheres. **A.** Representative image of one secondary neurosphere plated on a pre-treated poly-L-lysine dish and incubated with anti-nestin antibody. **B.** Neurons identified by anti-βIII tubulin antibody. **C.** Astrocytes recognized with anti-GFAP antibody. In all cases, nuclei were counterstained with Hoechst. Representative photomicrographs imaged at 20×.



Supplementary Figure 2. Taurine effect on mature neurons generation. Neurospheres were dissociated and exposed to culture medium with fetal bovine serum (1 %) in the absence of growth factors for 7 days. The differentiated cells were immunostained for the neuron marker MAP2 (red). Nuclei were counterstained with Hoescht (blue). **A.** Representative photomicrographs imaged at 20 \times , scale bar= 80 μ m. **B.** Quantification of taurine effect on neuronal differentiation. Bars represent means \pm SE of 4 experiments. Significantly different * $P < 0.05$.



Supplementary Figure 3. Taurine effect on generation of neurons at different times in culture in differentiation medium. Neurospheres were dissociated and cells cultured in medium without growth factors plus 1 % fetal bovine serum, during 7, 14 or 21 days. The differentiated cells were immunostained for the neuron marker β III tubulin or for the mature neuron marker MAP2. **A.** Percentage of β III tubulin+ cells. **B.** Percentage of MAP2+ cells cultured in medium without taurine (empty bars) or with added taurine (gray bars). Bars are means \pm SE of 4 experiments. Significantly different * $P < 0.05$.

Taurine Enhances the Growth of Neural Precursors Derived from Fetal Human Brain and Promotes Neuronal Specification

Reyna Hernández-Benítez^{a, b} Sharada D. Vangipuram^b
Gerardo Ramos-Mandujano^a William D. Lyman^b Herminia Pasantes-Morales^a

^aDivisión de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ^bChildren's Research Center of Michigan, The Carman and Ann Adams Department of Pediatrics, Wayne State University School of Medicine, Detroit, Mich., USA

Key Words

Human neural precursor cells · Trophic factor · Neurospheres · ReNcell VM

Abstract

Taurine is present at high concentrations in the fetal brain and is required for optimal brain development. Recent studies have reported that taurine causes increased proliferation of neural stem/progenitor neural cells (neural precursor cells, NPCs) obtained from embryonic and adult rodent brain. The present study is the first to show that taurine markedly increases cell numbers in cultures and neuronal generation from human NPCs (hNPCs). hNPCs obtained from 3 fetal brains (14–15 weeks of gestation) were cultured and expanded as neurospheres, which contained 76.3% nestin-positive cells. Taurine (5–20 mM) increased the number of hNPCs in culture, with maximal effect found at 10 mM and 4 days of culture. The taurine-induced increase ranged from 57 to 188% in the 3 brains examined. Taurine significantly enhanced the percentage of neurons formed from hNPCs under differentiating conditions, with increases ranging from 172 to 480% over controls without taurine. Taurine also increased the cell number and neuronal generation in cultures of the immortalized human cell line ReNcell VM. These results suggest that taurine has a positive influence on hNPC growth and neuronal formation.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Neuronal replacement by cell transplantation is considered a promising therapeutic strategy to restore functions lost due to neurodegenerative diseases or after acute disorders, such as stroke or trauma, that result in neuronal death [1, 2]. Neural stem/progenitor cells are considered to have this restorative potential following a viable transplant. Low viability as well as decreased proliferation rates are major obstacles to the achievement of successful neural restoration strategies with stem/progenitor cells. Further, a functional recovery after cell transplantation requires that stem/progenitor cells be provided with an adequate microenvironment to sustain the survival, self-renewal, proliferation and regenerative capacities of the cells. Therefore, creating the best niches for the transplanted cells is critical for their functional integration into the damaged tissue. Taurine may be one of the constituents of this niche.

Taurine is one of the most abundant amino acids in the brain [3]. Taurine concentrations are 4–5-fold higher in the immature brain than in the adult brain. This pattern is consistently observed, regardless of the variation in tau-

Herminia Pasantes-Morales, PhD
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria
Circuito Exterior, Mexico City 04510 (Mexico)
E-Mail hpasante@ifc.unam.mx

Sharada Vangipuram, PhD
Children's Hospital of Michigan
3901 Beaubien Street, 3N73, Detroit, MI 48201 (USA)
E-Mail svangipuram@med.wayne.edu

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/dne

© 2013 S. Karger AG, Basel
0378-5866/13/0000-0000\$38.00/0

rine content among species [4]. The human brain is not an exception, and the brain taurine content measured at the occipital lobe markedly declines with maturation. The highest values are found at the earliest time recorded, approximately 13 weeks of gestation, and taurine levels remain similarly high until 16 weeks of gestation [5]. This timespan corresponds to the period of neural proliferation and migration, which occurs between 8 and 18 weeks. Taurine appears to be essential for the normal growth and development of the nervous system [4]. Taurine deprivation during development leads to defective neural maturation and migration, as well as poor neuronal differentiation [6, 7]. Taurine has been shown to maintain stable membranes, regulate osmotic pressure and the intracellular calcium balance, and it also exhibits protective effects on a variety of cell types and tissues, including human stem cells that have been exposed to stringent or toxic conditions [8–10].

Recent studies have shown that taurine increases the number of cultured neural progenitor cells obtained from the embryonic mouse mesencephalon [11], the hippocampal dentate gyrus [12] and the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles of adult mice [13]. These studies found that taurine increases the number of cells and neurospheres formed. It is proposed that, in the presence of taurine, more cells proliferate in a shorter period of time, presumably due to the protective actions of taurine on cell membranes and organelles [13]. Interestingly, in neural precursor cells (NPCs) derived from the SVZ of adult mouse brain, taurine also showed an effect on NPC differentiation, increasing the proportion of neurons formed [13]. We consider the investigation of whether these effects of taurine that have been observed in rodent brain are reproducible in NPCs derived from human tissue to be of particular interest. This investigation is the purpose of the present study, which was carried out in human NPCs (hNPCs) derived from fresh human fetal brain tissue. Additional experiments were performed in the immortalized human neural progenitor cell line ReNcell VM.

Materials and Methods

Isolation and Culture of hNPCs

Fetal human brain tissue of 15–16 weeks of gestation was obtained in accordance with the institutional guidelines of the Ethical Committee of Wayne State University. Fetal brains were obtained from elective abortions of normal pregnancies, with no known abnormalities reported in either the mother or the fetus. Pregnancy terminations were performed in the evening, and the tissue was immediately placed in ice-cold Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) overnight. The tissue was processed the next morning for

stem cell isolation, approximately 16 h after surgery. The tissue was maintained in cold buffer at all times. Second-trimester pregnancy terminations are performed by 'suction evacuation'. Because the tissue is macerated during this procedure, tissue regions were isolated from indeterminate parts of the brain. Brain tissue was washed in cold HBSS, and the meninges were discarded. The tissue was minced and trypsinized for 15 min at 37°C in the presence of DNase, with regular shaking, then centrifuged at 300 g for 5 min at 4°C and washed again. The pellet was resuspended in cold PBS and filtered through a 30- μ m filter. The sample containing the cells was centrifuged, and the pellet was resuspended in serum-free NeuroCult® NS-A proliferation medium containing NeuroCult NS-A basal medium (human), NeuroCult NS-A proliferation supplements, heparin (0.4 U/ml), hEGF (20 ng/ml), hFGF2 (10 ng/ml) (all from Stem Cell Technologies, Vancouver, B.C., Canada), 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin (Gibco, Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA). Cells were seeded into T75 flasks and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Primary neurospheres obtained after 5 days were dissociated using a NeuroCult chemical dissociation kit (Stem Cell Technologies) following the manufacturer's instructions. The cells were reseeded according to the experimental requirements. Clusters with a diameter of over 30 μ m were considered neurospheres. hNPCs were obtained from 3 different fetal brain samples, and all experiments were conducted separately for each brain.

ReNcell VM Cell® Culture

ReNcell VM cells (Chemicon, Millipore, Darmstadt, Germany) were routinely expanded on laminin-coated 6-well plates in ReNcell proliferation medium containing DMEM-F12 (Gibco, Life Technologies) supplemented with B27 medium (Gibco, Life Technologies), heparin (10 U/ml), 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin, 1% amphotericin B, hEGF and hFGF2 at 20 ng/ml and 10 ng/ml each. The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. The cells were passaged at approximately 80% confluence. Using accutase solution (Millipore, Temecula, Calif., USA), the cells were detached, and the cell suspension was collected and centrifuged at 700 g at 4°C for 10 min. The cell pellet was resuspended with fresh medium and plated as necessary.

Immunophenotyping

The proportion of nestin- and CD133-positive cells in the isolated cell population was estimated by flow cytometry using anti-nestin antibody and anti-CD133 antibody as previously described [14]. Cells were washed in cold PBS and resuspended in tubes containing pre-aliquoted monoclonal antibodies. After the cells had been incubated with antibody in the dark for 30 min at room temperature, they were washed with 1 ml of PBS and resuspended with 0.5 ml of 2.5% coulter fixative in PBS. A two-color analysis was performed using a Coulter XL Flow Cytometer (Coulter Corp., Miami, Fla., USA) gated on the viable cell population as inferred from forward and side scatter analysis.

Cell Counting

hNPCs were seeded in 24-well plates at 60,000 cells/well in serum-free NeuroCult NS-A proliferation medium containing taurine (0, 5, 10 or 20 mM), GABA, glycine or creatine (10 mM) (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). After the indicated number of days, the cultured neurospheres were observed using an in-

verted microscope (Olympus, Japan). To count the cells in the culture, the neurospheres were dissociated and the number of cells was determined by direct counting in a Neubauer chamber. For the experiments with ReNcell VM cells, cells were seeded at 90,000 cells/well on 6-well plates pre-treated with laminin, ReNcell proliferation medium and 0, 5, 10 or 20 mM taurine. At the indicated times, the cells were detached using accutase solution, and the number of cells and cell viability were determined in a Neubauer chamber.

Cell viability was assessed by a trypan blue exclusion assay. An analysis of the apoptotic cells was performed in a Coulter XL Flow Cytometer (Coulter Corp.) after the cells were incubated with 2 ml of cold Coulter DNA-Prep reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) for 2 h at room temperature and overnight at 4°C. Apoptotic cells were quantified by gating the population that binds to propidium iodide to a lesser degree. Histograms were created with CellQuest Pro software.

Differentiation Assays

Differentiation assays were carried out with cells derived from cultures in proliferation medium. hNPCs derived from neurospheres were seeded onto pre-coated poly-L-lysine coverslips in differentiation medium containing NeuroCult Basal NS-A medium and Differentiation Supplements Human (Stem Cell Technologies). For the ReNcell VM differentiation assays, cells were seeded onto poly-D-lysine/Laminin Cellware 8-well culture slides (BD Biocoat, Biosciences, Bedford, Mass., USA) at 25,000 cells per well in differentiation ReNcell medium containing DMEM-F12 with 2% B27 supplement, 10 U/ml heparin, 50 µg/ml gentamicin and 1% amphotericin B. Taurine was dissolved in the differentiation medium at the required concentrations; other amino acids were tested at 10 mM for specificity assays. The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂, and the differentiation medium was replaced every 4 days. After 4–12 days, the cells were fixed for immunocytochemistry.

Immunocytochemistry

Cells were washed once with PBS, fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min. The cells were blocked with 0.5% BSA in PBS for 30 min at room temperature and then incubated with primary antibody (anti-β-III-tubulin [1:100] (CBL412, Chemicon Europe, Darmstadt, Germany)) in PBS at 4°C overnight. Then, the cells were washed with PBS containing 0.2% Tween-20 (PBST) followed by incubation with the secondary antibody (AlexaFluor 546 [1:1000] (Eugene Oregon A11034, Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA)) in PBS for 1 h at room temperature in dark conditions. The cells were washed 5 times with PBST, mounted with VECTASHIELD hard set mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA), and examined using a Nikon epifluorescence microscope with a 20× objective; the images were captured and analyzed with SPOT-Basic software.

High-Performance Liquid Chromatography

Taurine concentration was measured in the tissue samples, cultured neurospheres and ReNcell VM cells. Samples were collected and washed twice with cold PBS, then resuspended and homogenized with 150 µl PBS. A 10-µl aliquot of each sample was mixed with 400 µl ethanol during 20 min and centrifuged. Each sample was mixed 1:1 with o-phthalaldehyde (OPA, Sigma, St. Louis Mo., USA), prepared according to the supplier's instructions, and

analyzed with a Shimadzu Chromatograph HPLC System (Shimadzu, Kyoto, Japan). An ODS column with 4.6 mm ID, length 250 mm and 5 µm particle size was used. The effluent was monitored with a fluorescence detector with emission at 460 nm and excitation at 330 nm. The mobile phase consisted of 55% methanol and 45% potassium acetate (0.1 M, pH 5.5). An isocratic gradient at a rate of 1.5 ml/min was used for 10 min. The taurine values obtained by HPLC were normalized with protein content. Protein levels were determined with the Pierce BCA kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Rockford Ill., USA).

Statistics

The results are reported as the mean ± SEM. Statistical significance was evaluated as indicated by (1) a two-tailed Student's t test, (2) two-way ANOVA with Bonferroni post hoc correction or (3) one-way ANOVA with a Tukey posttest. ANOVA was performed using IBM SPSS (version 19.0[®]) and GraphPad Prism Inc.[®] software; Student's t test was performed using Microsoft Excel. Differences were considered significant at $p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$.

Results

Freshly excised tissue samples from 3 human fetal brains of 15–16 weeks of gestational age were dissociated, and cells were cultured in proliferation medium with hEGF and hFGF2 to generate neurospheres (fig. 1a). The growth and proliferation of neurospheres are sustained by growth factors in the proliferation medium. This medium does not contain taurine, as confirmed by HPLC (data not shown).

To identify the cell types in neurospheres, cells obtained from neurosphere disaggregation were immunophenotyped with nestin and CD133 markers by flow cytometry. The results showed that 60.5% of cells were positive for CD133 and 76.3% of cells were positive for nestin. This finding suggests that a minimum of 36.8% of the cells must express both markers and are likely to be stem cells. Therefore, neurospheres contain both stem and neural progenitor cells; these will also now collectively be referred to as hNPCs (fig. 1b).

The number of hNPCs in the cultures from disaggregated neurospheres was counted after 3–6 days in culture. In cultures containing taurine, the number of hNPCs was significantly increased. This effect was observed in cell cultures from all 3 brains. In all cases, the maximal effect was observed at day 4 and at 10 mM taurine (fig. 2). Some variability was observed in the number of hNPCs generated from each brain in the control cultures (fig. 2a). Regardless of variability, taurine consistently increased the number of cells in the cultures from the 3 brain samples. The significance of the taurine effect was examined by

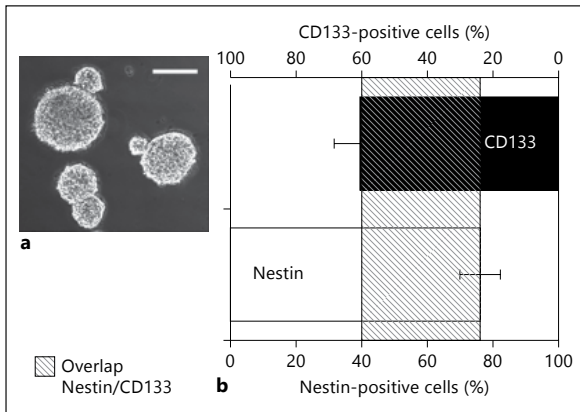


Fig. 1. Immunophenotyping characterization of neurosphere-forming cells. Neurospheres were generated from excised tissue from 3 human fetal brains of 15–16 weeks of gestation, as described in the methods. **a** Neurospheres showing the typical morphology of clusters of undifferentiated cells growing in suspension after 4 days in culture; scale bar = 100 μ m. **b** The neurosphere-forming cells were characterized by flow cytometry using the cells treated with anti-nestin (white bar) and anti-CD133 (black bar) human antibodies. The shaded area refers to the minimum number of cells that were positive for both markers. The bars represent the mean \pm SEM of 3 different tissue samples.

two-way ANOVA, which revealed that this effect was independent of the variability found in the other samples ($F = 2.09$, $p = 0.079$). Post hoc analyses indicated that the taurine effect was significantly different from controls at essentially all taurine concentrations, with the 10 mM concentration showing the lowest p value (fig. 2a). Therefore, figure 2b shows the significant effect of taurine in the number of hNPCs expressed as the mean percentage over control in the 3 brain samples. The results are expressed in this form in all subsequent figures.

Taurine increased the number of neurospheres in the cultures from 2 brain samples, while the size, rather than the number, was increased in the third brain sample, possibly due to the coalescence of small neurospheres. To normalize these differences, the total area filled by neurospheres (over 30 μ m in diameter) was quantified using ImageJ to evaluate the effect of taurine in the cultures from the 3 brain samples; the results are shown in figure 2d.

The results from the trypan blue exclusion assay and those regarding apoptotic cell death as measured by propidium iodide staining and analyzed by flow cytometry showed that taurine did not significantly modify cell viability at any concentration. The percentages of cells ex-

cluding trypan blue were as follows: control 75.1 ± 3.2 ; and 5, 10 and 20 mM taurine, 76.2 ± 2.8 , 71.4 ± 5 and 70 ± 5 , respectively. The percentages of apoptotic cells were as follows: control 23.9 ± 8.2 ; and 5, 10 and 20 mM taurine, 20.7 ± 7.2 , 20.9 ± 8 and 21.6 ± 7.1 , respectively.

NPCs have the ability to differentiate into various cell lineages when grown in media in which the growth factors are replaced by differentiation factors. Under these conditions, NPCs generate astrocytes, neurons and oligodendrocytes. Typically, astrocytes are the most abundant cell type, while neurons are present in a much lower proportion. The differentiation of hNPCs in our cultures was induced by a differentiation medium, as described above, and the number of neurons formed during the differentiation process was evaluated by immunocytochemistry, by counting the number of cells positive for β -III-tubulin. Although quantitative differences were found in the proportion of neurons formed from hNPCs obtained from the 3 human fetal brains, marked increases in this proportion were consistently observed at all taurine concentrations. The maximal effect was found on day 8 and at 10 mM taurine. At this time point, 5 and 10 mM taurine increased the neuron percentage over the control by 119 and 307%, respectively. This effect was observed beginning at 5 days in culture, and it persisted for up to 12 days (fig. 3). At 20 mM the effect of taurine was found to be significant only at day 8, when the percentage of neurons increased by 238%.

Amino acids other than taurine, such as GABA and glycine, can increase the proliferation of NPCs, mediated by their synaptic receptors [15]. Because taurine at high concentrations (1–10 mM) is able to act as a full or partial agonist of these receptors [15, 16], the effect of taurine on the increase of hNPC proliferation was compared with that of GABA or glycine, and creatine was used as a control. Figure 4a shows that under our conditions, these amino acids did not increase the number of hNPCs in cultures. Similarly, the percentage of neurons formed upon differentiation in the cultures from the 3 brain samples was unaffected by GABA or glycine, in contrast to the marked effect of taurine on increasing neuron generation (fig. 4b).

ReNcell VM (Merck Millipore) is an immortalized cell line derived from the ventral mesencephalon of fetal human brain. Because of its high levels of nestin and Sox2, it has been considered a human neural progenitor cell line. This line may be a useful tool for investigating aspects of the physiology of hNPCs. We hypothesized that taurine increases the cell growth and differentiation of ReNcell VM cells in culture through mechanisms similar to those in hNPCs obtained from fresh brain tissue. ReNcell VM

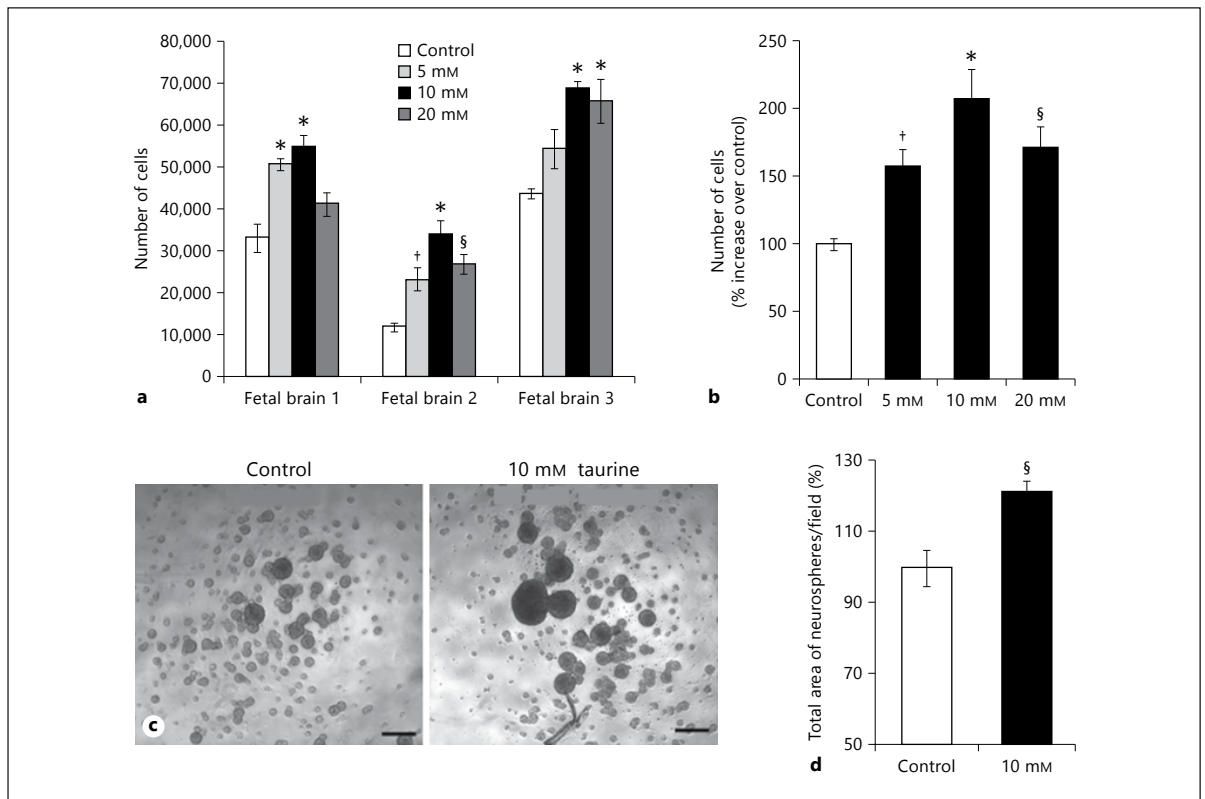


Fig. 2. Taurine's effect on the number hNPCs cultured as neurospheres. Neurospheres generated from human fetal brains were cultured in a proliferation medium or a proliferation medium supplemented with taurine (5, 10 and 20 mM). After 4 days of culture, the neurospheres were disaggregated, and the number of hNPCs was determined. **a** Number of hNPCs grown in the presence of taurine in cultures from each of the 3 fetal human brains. The bars represent the mean \pm SEM of at least 4 cultures from each brain tissue sample in the presence of the indicated taurine concentration. The significance of the interaction of taurine vs. the brain samples was analyzed by two-way ANOVA followed by a post hoc Bonferroni test were considered significant at * $p < 0.001$, § $p < 0.01$, † $p < 0.05$. **b** Effect of taurine on the number of hNPCs expressed

as percentage increase over controls. The bars represent the mean \pm SEM of 4 cultures from each brain tissue sample. Differences from controls according to one-way ANOVA followed by post hoc Tukey test were considered significant at * $p < 0.001$, § $p < 0.01$, † $p < 0.05$. **c** Representative images at 4 \times magnification of neurosphere cultures grown in control medium or in the presence of 10 mM taurine; scale bar = 300 μ m. **d** Total neurosphere area by field. The total area covered by neurospheres was evaluated with ImageJ® software using images captured at 4 \times in the control or taurine cultures. The bars represent the mean \pm SEM of at least 2 cultures from each brain sample ($n = 8$). Different from control according to Student's t test were considered significant at § $p < 0.01$.

cultures are adherent cells forming a monolayer on laminin-coated plates (fig. 5a). To evaluate the ReNcell VM cell number, cultures were maintained in the presence or absence of various concentrations of taurine for 2–5 days. The cells were then detached, and the number of cells was counted. The maximal effect was found on day 3, when taurine at 5 and 10 mM increased the number of cells over control by 70 and 59%, respectively (fig. 5b). At 20 mM, taurine's effect was not significant. The viability of ReNcell

VM cells was not affected by the time in culture or by the addition of taurine because essentially all of the cells were alive, as determined by trypan blue exclusion (not shown), and the number of apoptotic cells was negligible (1–2%). After 4 days in culture under differentiating conditions, 7.4% of the cells were positive for the neuronal marker β -III-tubulin. Taurine significantly enhanced this number, increasing the percentage to 12.5, 16.5 and 12.1% at 5, 10 and 20 mM, respectively (fig. 5c, d).

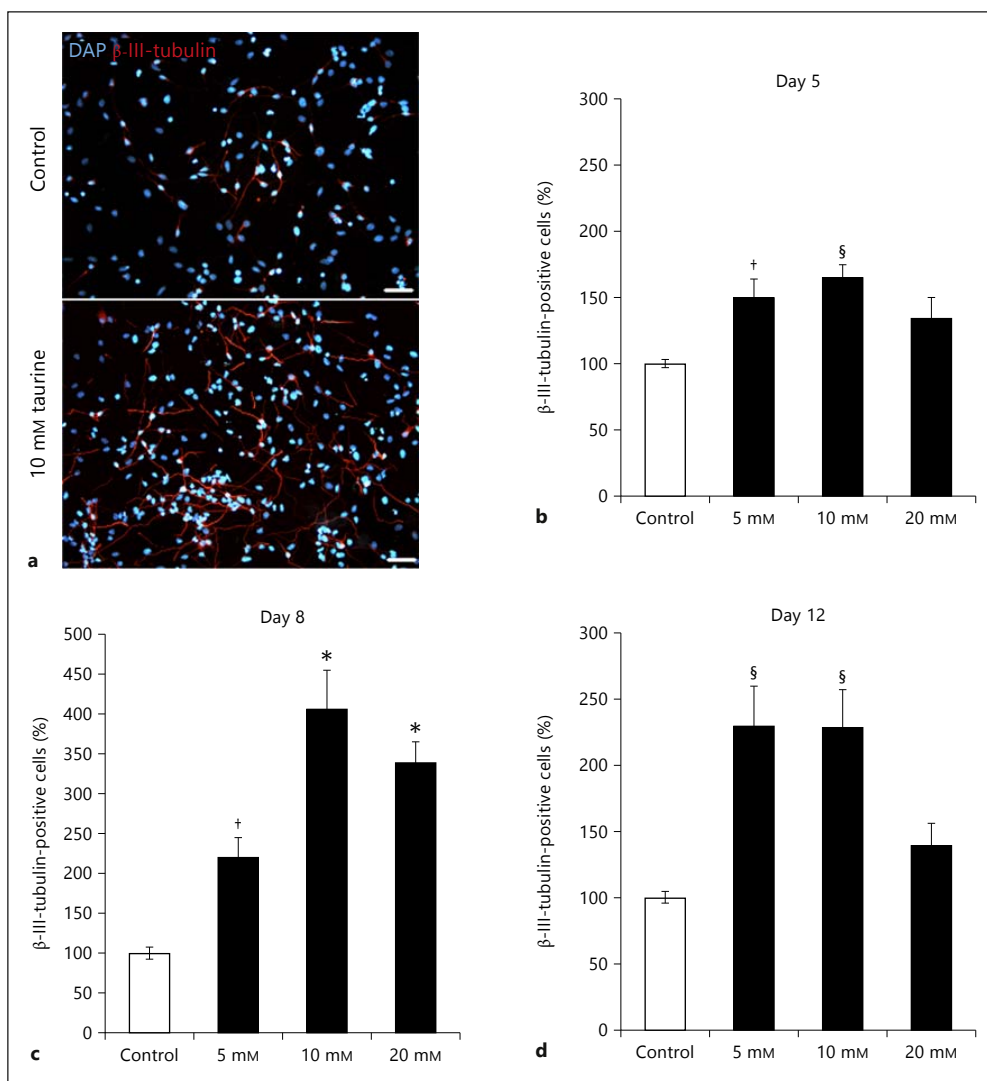


Fig. 3. Effect of taurine on the proportion of neurons differentiated from hNPCs. Neurospheres were disaggregated and plated with differentiation medium in the presence or absence of taurine at the indicated concentration. Differentiated cells were fixed and processed by immunocytochemistry using the primary antibody human anti- β -III-tubulin and the secondary antibody AlexaFluor 546, as described in the Materials and Methods section. **a** Representative images of β -III-tubulin-positive cells in the control (upper panel) and in the presence of 10 mM taurine (lower panel).

Images were obtained by fluorescence microscopy at 20 \times magnification; scale bar = 40 μ m. **b-d** Increase caused by the presence of taurine in the number of neurons differentiated from hNPCs at the indicated times. The bars represent the percentage increase in β -III-tubulin-positive cells over control. The results are presented as the mean \pm SEM of at least 2 cultures from each brain tissue sample ($n = 7$). Difference compared to the control according to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc were considered significant at * $p < 0.001$, § $p < 0.01$, † $p < 0.05$.

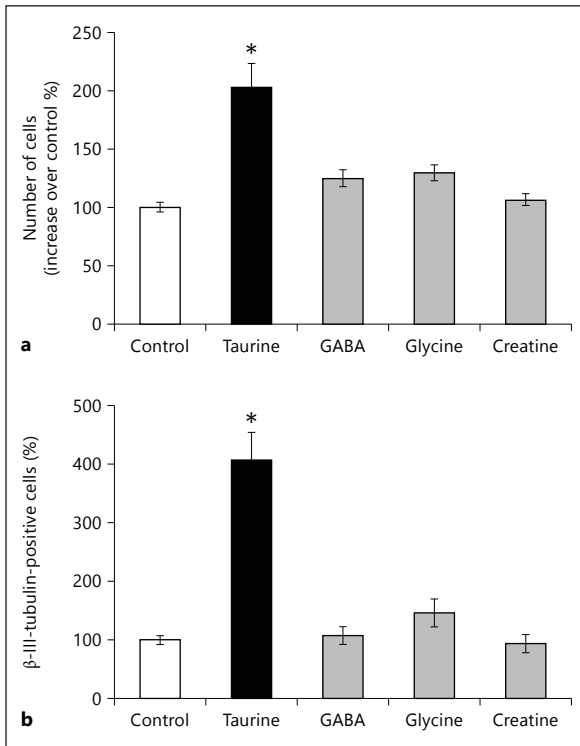


Fig. 4. Effect of the amino acids GABA, glycine and creatine on the growth population of hNPCs and on the number of neurons differentiated from hNPCs. **a** hNPCs were cultured in proliferation medium in the presence of 10 mM of the indicated amino acid. After 4 days in culture, neurospheres were disaggregated and the cells were counted in a Neubauer chamber. **b** hNPCs were plated in the differentiation medium, in the presence of 10 mM of the indicated amino acid. After 8 days in culture, the cells were fixed and immunostained for β -III-tubulin, as described in figure 3. The bars are the mean \pm SEM of at least 2 cultures from each brain sample ($n = 7$). Differences from the control according to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were considered significant at * $p < 0.001$.

The taurine concentrations in fresh fetal brain, neurosphere samples and ReNcell VM cells were evaluated by HPLC. The mean taurine level in the 3 brain samples was 135.2 μ mol/g protein. After 4 days in culture in the proliferation medium without taurine, the cells from disaggregated neurospheres contained only 1.9 μ mol/g protein. The addition of taurine to the medium restored the tissue content, as the hNPCs then contained 158.5 μ mol/g protein (fig. 6). The taurine concentration was also measured in the ReNcell VM cells. The taurine content in these cells was notably lower than that in the fresh tissue,

at only 13.5 μ mol/g protein. ReNcell VM cells avidly accumulated taurine when it was added to the medium, reaching concentrations of 241 μ mol/g protein (fig. 6).

Discussion

The present study showed that taurine increased the number of NPCs obtained from human fetal brain and cultured as neurospheres. This result confirms our previous observation in cells obtained from the mesencephalon of embryonic mouse brain, as well as the recently reported results on NPCs from hippocampi of rodent embryos [11, 12]; however, this is the first study on taurine's effects in NPCs of human origin. A study by Chen et al. [17] reported that taurine (8–10 mM) increased the proliferation of human fetal neuronal cells, although these are not NPCs but cells committed to form neurons. The taurine-induced proliferation of NPCs is significant in cells of embryonic origin, at 28% in hippocampal cells and 39% in the mesencephalon [11, 12]. This effect of taurine is even more evident in cells obtained from the SVZ of the adult mouse, showing that taurine increased the number of NPCs in the culture by 120%, one of the highest reported percentages for any of the molecules that positively regulate NPC proliferation [13]. The results of the present study point to an effect of similar magnitude in NPCs of human origin.

Other amino acids, particularly glutamate and GABA, increase NPC proliferation, and this increase is mediated by their synaptic receptors [18, 19]. Because taurine has been reported to interact with GABA and glycine receptors when used at high concentrations [15], the possibility that taurine's effect is mediated by such interactions must be considered. This was not the case, however, because GABA and glycine had no influence on the growth of hNPCs in our cultures. It seems, therefore, that the positive influence of taurine on NPC proliferation is a separate effect.

The increase in the number of hNPCs in cultures containing taurine may result from the preservation of cell viability and/or an increase in cell proliferation. No clear effects of taurine on cell viability have been observed in any studies published thus far, whereas assays with BrdU in mouse NPCs show that, in the presence of taurine, more cells attain maximal replicative DNA activity at a significantly shorter time than do controls [13]. These results point to the positive regulation of cell proliferation by taurine. Similar results have recently been reported in NPCs from the hippocampus by measuring cell prolifera-

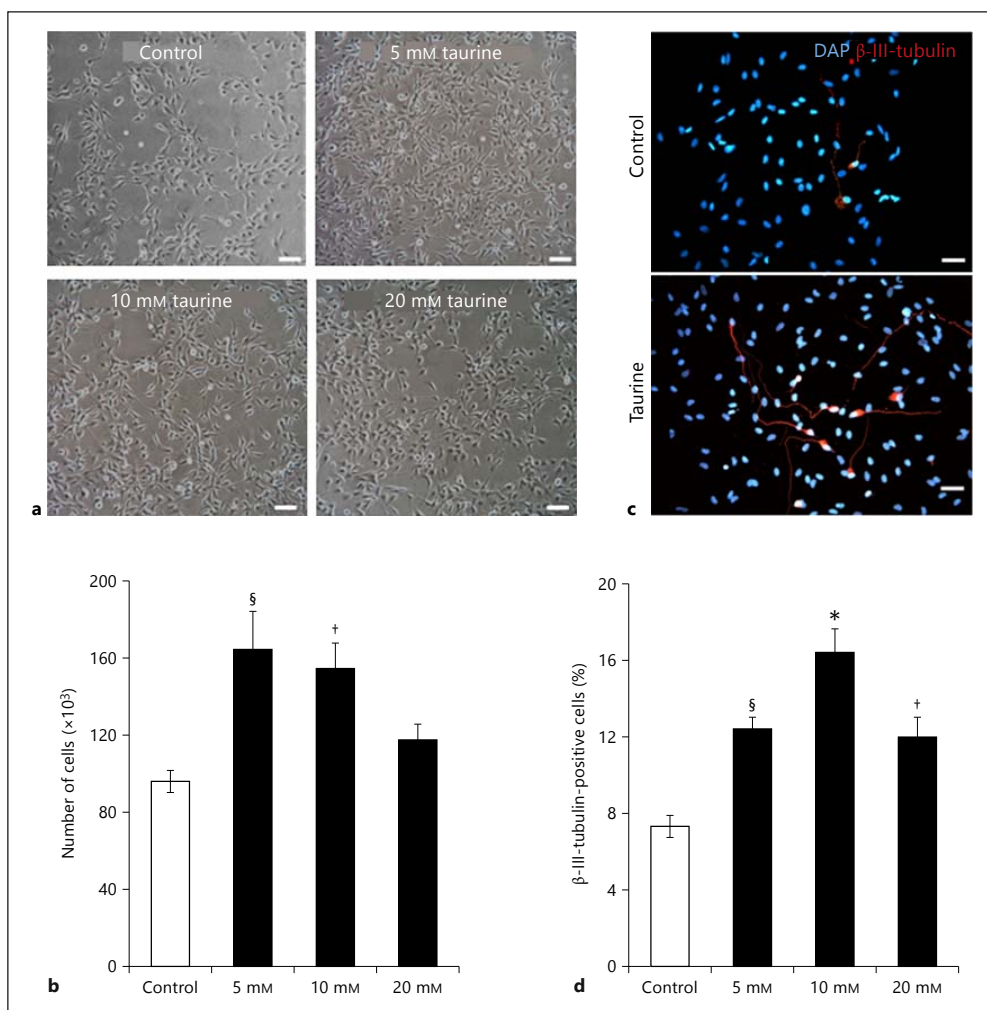


Fig. 5. The effect of taurine on the growth population and differentiation of ReNcell VM cells. **a** Representative images of the ReNcell VM cultures in proliferation medium at the indicated taurine concentration; scale bar = 80 μ m. **b** Number of cells after 3 days in culture in proliferation medium in the presence or absence of taurine at the indicated concentrations. Cultured ReNcell VM cells were detached with accutase solution, and the cells were counted in a Neubauer chamber. The results represent the percentage increase (dark bars) over control (white bar). The values are the mean \pm SEM (n = 6). **c** Effect of taurine on the number of neurons

differentiated from ReNcell VM cells. Representative images β -III-tubulin-positive ReNcell VM cells differentiated in the control (upper panel) and 10 mM taurine (lower panel). Differentiated cells were processed by immunocytochemistry as indicated in figure 3. Images were obtained by fluorescence microscopy at 20 \times magnification; scale bar = 40 μ m. **d** Percentage of neurons (cells positive for β -III-tubulin) differentiated from the ReNcell VM cells. The bars are the mean \pm SEM (n = 4). Differences between **b** and **d** according to one-way ANOVA and Tukey's posttest were considered significant at *p < 0.001, [§]p < 0.01, [†]p < 0.05.

tion by EdU incorporation [12]. In the present study, cell proliferation in hNPCs was not directly measured, but the results showing that taurine had no effect on cell viability indirectly suggest that the increase in hNPC numbers elicited by taurine may result from proliferation, as oc-

curs in cells from mouse brain [12, 13]. The mechanism by which taurine increases the number of hNPCs remains unknown. A number of possibilities can be contemplated, considering the known properties of taurine, such as membrane stabilization, antioxidant effects, and the pro-

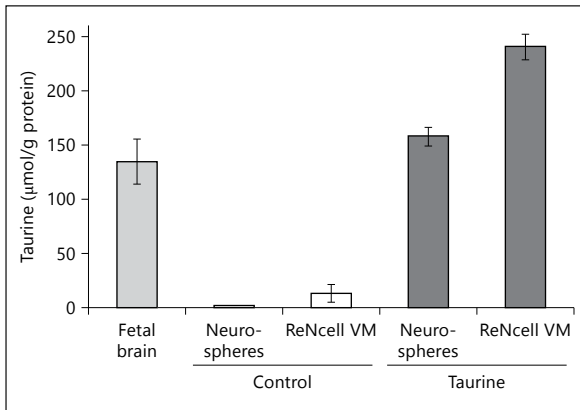


Fig. 6. Taurine levels in cells isolated from tissue excised from fetal human brain, in hNPCs and in ReNcell VM cells. The bars show the taurine content in cells dissociated from fresh excised tissue (gray bar), in control cultures of hNPCs from disaggregated neurospheres and in ReNcell VM cells (white bars). The dark bars show the taurine concentration in hNPCs and in ReNcell VM cells grown in proliferation medium supplemented with 10 mM taurine. At least 400,000 cells were collected and processed for HPLC. The data are presented as the mean \pm SEM of $n = 3$.

tection of cell structure and function [8, 9, 20]. It may then be possible that the presence of taurine maintains cells in a more favorable state for the progress of proliferation. The overactivation of the ERK1/2 kinases by taurine, which has been reported in hippocampal NPCs and in osteoblast cells [12, 21], suggests that these enzymes may be involved with taurine's influence via a still unknown mechanism.

Under appropriate conditions, NPCs differentiate into astrocytes, neurons and oligodendrocytes. The most abundant cell type found is cells that are positive for GFAP, identified as astrocytes. The number of neurons is usually low [22]. Interestingly, in the present study of hNPCs, we found that taurine dramatically increased the percentage of neurons (β -III-tubulin-positive cells). The same effect has previously been observed in cells from the SVZ of adult mouse brain [13]. In contrast, this effect was not observed in cells from embryonic mice, regardless of whether the cells were derived from the mesencephalon [11] or the hippocampus [12]. This difference may be attributed to the developmental state of the brain from which cells are obtained, which is possibly related to the brain taurine levels at each developmental stage. A study using mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood describes an interesting effect of tau-

rine: increasing EGF induced differentiation into cells expressing rhodopsin [23]. There is no evidence regarding possible mechanisms through which taurine is responsible for enhancing the number of neurons formed from NPCs. Taurine's action in regulating the redox state of the cells is a likely possibility, considering the critical role of ROS in NPC differentiation into the neuronal phenotype [24].

Altogether, the effects of taurine documented here in NPCs obtained from human fetal brains, as well as the known positive influence of taurine on the developing human brain, warrants the investigation of the potential benefits of taurine's inclusion in the niche of transplanted cells to improve preservation, proliferation and differentiation of the transplanted cells.

The human cell line ReNcell VM, derived from fetal mesencephalon, has commonly been considered a good model for neural progenitor cells that could be used in studies on the physiology of NPCs [25]. We were therefore interested in whether taurine affects these cells in the same way it affects cells obtained from fresh brain tissue. In the present study, we found that the effect of taurine on increasing the number of ReNcells VM cells in culture occurs earlier and with a similar magnitude to that observed in brain cells. Regarding neuronal differentiation, taurine also increased the percentage of neurons formed in the cell line, although some differences were found between the cell line and brain cells. One such difference is that the maximal percentage of neurons was reached after a shorter period of differentiation and that the effect of taurine on increasing the proportion of neurons was lower in the cell line compared to the brain cells. However, these are minor differences and, in general, in terms of the influence of taurine on NPC proliferation and differentiation, the cell line may be a useful model for further studies by those investigating the mechanisms of taurine's effects.

Acknowledgements

We acknowledge the valuable technical assistance of Steven A. Buck with the flow cytometry measurements. We are grateful to Jing Li, PhD, and Jianmei Wu, PhD, from the Core Facility of Pharmacology of the Karmanos Institute for their assistance with the HPLC. We thank Dr. Ronald Thomas for his assistance with the statistical analyses. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), grant No. IN202313, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), grant No. 98952. This study was completed as a part of the requirements for Reyna Hernández-Benítez's PhD. in Biomedical Sciences (PDCB) at UNAM and was supported by a CONACyT fellowship.

References

- 1 Carletti B, Piemonte F, Rossi F: Neuroprotection: The emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Neuropharmacol* 2011;9:313–317.
- 2 Selvaraj V, Jiang P, Chechneva O, Lo UG, Deng W: Differentiating human stem cells into neurons and glial cells for neural repair. *Front Biosci* 2012;17:65–89.
- 3 Agrawal HC, Davis JM, Himwich WA: Developmental changes in mouse brain: weight, water content and free amino acids. *J Neurochem* 1968;15:917–923.
- 4 Sturman JA: Taurine in development. *Physiol Rev* 1993;73:119–147.
- 5 Sturman JA, Gaull GE: Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *J Neurochem* 1975;25:831–835.
- 6 Palackal T, Moretz R, Wisniewski H, Sturman J: Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J Neurosci Res* 1986;15:223–239.
- 7 Neuringer M, Palackal T, Kujawa M, Moretz RC, Sturman JA: Visual cortex development in rhesus monkeys deprived of dietary taurine. *Prog Clin Biol Res* 1990;351:415–422.
- 8 Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M: Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:91–99.
- 9 Pasantes-Morales H, Hernandez-Benitez R: Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? *Neurochem Res* 2010;35:1939–1943.
- 10 Parekh VS, Umrani MR, Hardikar AA: Taurine supports preservation of proendocrine cell types in human umbilical cord blood-derived mononuclear cells during cryostorage. *Transplant Proc* 2010;42:4619–4621.
- 11 Hernandez-Benitez R, Pasantes-Morales H, Saldana IT, Ramos-Mandujano G: Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 2010;88:1673–1681.
- 12 Shivraj MC, Marcy G, Low G, Ryu JR, Zhao X, Rosales FJ, Goh EL: Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. *PLoS One* 2012;7:e42935.
- 13 Hernandez-Benitez R, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H: Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Res* 2012;9:24–34.
- 14 Vangipuram SD, Grever WE, Parker GC, Lyman WD: Ethanol increases fetal human neurosphere size and alters adhesion molecule gene expression. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:339–347.
- 15 Albrecht J, Schousboe A: Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res* 2005;30:1615–1621.
- 16 Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F: Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 1997;502:609–621.
- 17 Chen XC, Pan ZL, Liu DS, Han X: Effect of taurine on human fetal neuron cells: Proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 1998;442:397–403.
- 18 Nakamichi N, Takarada T, Yoneda Y: Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J Pharmacol Sci* 2009;110:133–149.
- 19 Andang M, Hjerling-Leffler J, Moliner A, Lundgren TK, Castelo-Branco G, Nanou E, Pozas E, Bryja V, Halliez S, Nishimaru H, Wilbertz J, Arenas E, Koltzenburg M, Charnay P, El Manira A, Ibanez CF, Ernfors P: Histone h2ax-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 2008;451:460–464.
- 20 Huxtable RJ: Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992;72:101–163.
- 21 Jeon SH, Lee MY, Kim SJ, Joe SG, Kim GB, Kim IS, Kim NS, Hong CU, Kim SZ, Kim JS, Kang HS: Taurine increases cell proliferation and generates an increase in [mg2+]i accompanied by erk 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett* 2007;581:5929–5934.
- 22 Rietze RL, Reynolds BA: Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* 2006;419:3–23.
- 23 Jin W, Xing YQ, Yang AH: Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009;45:321–327.
- 24 Ostrakhovitch EA, Semenikhin OA: The role of redox environment in neurogenic development. *Arch Biochem Biophys* 2012, Epub ahead of print.
- 25 Donato R, Miljan EA, Hines SJ, Aouabdi S, Pollock K, Patel S, Edwards FA, Sinden JD: Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci* 2007;8:36.

Taurine and Brain Development: Trophic or Cytoprotective Actions?

Herminia Pasantes-Morales ·
Reyna Hernández-Benítez

Accepted: 1 September 2010 / Published online: 15 September 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract The decline of taurine content during brain maturation as well as the consequences of taurine deficiency disturbing brain development, suggest its involvement in basic processes of developing brain cells. If taurine participates in cell protection, differentiation or proliferation in the developing brain is as yet unclear. Extensive and solid evidence supports taurine cytoprotective actions, directly or indirectly related to an antioxidant effect. Since redox status and oxidative stress are now implicated in signalling processes regulating cell differentiation and proliferation, the question is raised of whether the taurine antioxidant activity is on the basis of its requirement during brain development.

Keywords Neural precursor cells · Oxidative stress · Antioxidants · Neurospheres

Taurine in Cell Physiology

Taurine is a sulphur amino acid, present in mM concentrations in most animal cell types. Some tissues such as skeletal muscle, heart, brain and retina contain remarkably high taurine levels, often up to 40 mM. The cell taurine pool results from the concerted operation of synthesis, influx and efflux. The contribution of these processes varies

among cell types and species. In general taurine has a small turnover, particularly in those tissues with the highest taurine levels. Taurine is mostly found soluble in the cytosol. It is not a protein constituent and participates in very few cell metabolic reactions. Taurocholic acid formation is one of the few cell reactions in which taurine is implicated [1]. Taurine is formed from cysteine through the sequential action of the cysteine dioxygenase and the cysteine sulfinatase decarboxylase. The decarboxylase is the rate-limiting of the pathway, and its functional expression is considered as indicative of the importance of taurine synthesis in cells or tissues. In accordance with the key role of taurine in liver function via taurocholic acid formation, in most species liver is the main site of taurine synthesis. Cysteine sulfinatase decarboxylase is expressed also in the mammary gland, in adipose tissue, and in low amounts in kidney, brain, lung and placenta [2]. There is not a metabolic machinery for taurine degradation and the amino acid is excreted as such in urine.

Taurine formed in liver as well that coming from dietary sources is exported to other organs with lower capacities for taurine formation. This transfer occurs via an energy- Na^+/Cl^- dependent taurine transporter (TauT), specific for β -amino acids, with low affinity and high capacity. TauT cDNA encodes for a protein of about 70 kDa, with high homology between tissues and species. TauT is expressed in a large variety of cells and tissues, in accordance with the ubiquitous presence of taurine in animal cells, and shows remarkable similarities in most cells of essentially all organs. The kinetic constant of TauT in brain range for V_{max} 0.39–0.67 nmoles/mg protein and for K_m between 10 and 40 μM . TauT has been cloned from a variety tissues including the rat and mouse brain [3, 4].

The high taurine concentration in some tissues and its presence in most cell types suggest its involvement in a

Special issue article in honor of Dr. Abel Lajtha.

H. Pasantes-Morales (✉) · R. Hernández-Benítez
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad
Universitaria, Circuito Exterior, 04510 Mexico DF, Mexico
e-mail: hpasante@ifc.unam.mx

general, basic function of the cell. Cell volume regulation seems to be this function. Maintenance of a constant volume is fundamental homeostatic requirement for animal cells. Also, the volume of intracellular compartments should be maintained within strict limits to allow the proper interaction of elements of signalling chains which establish the intracellular and intercellular communication. Mechanisms devised to keep cell volume constant are present in essentially all animal cells, and have been preserved along the evolution in most species, regardless of the constancy of their extracellular environment. Volume regulation occurs via mobilization of osmotically active solutes, osmolytes, which are present in the intracellular and extracellular compartments in amounts sufficiently large to drive water movements of the magnitude necessary to correct cell volume changes [5]. Taurine is one of these osmolytes, and due to its special features, it is considered as an ideal osmolyte. The high taurine cell concentration together with its low or null involvement in cell metabolism allows taurine movements across the cell compartments without modifying significantly the cellular homeostasis. In this sense, taurine is perhaps the most representative of the molecules known as compatible osmolytes. Taurine mobilization outside the cell in response to an increase in cell volume occurs via a leak pathway, with high sensitivity to swelling. Once volume has been corrected, the energy-dependent carrier leads to the taurine intracellular pool replenishment. Taurine has also a crucial role in restoring cell volume after shrinkage. In this case, the adaptive mechanism is an up-regulation of the taurine transporter, increasing taurine cell content together with osmotically driven water [6, 7]. Other organic osmolytes closely involved in this process are the polyalcohols myo-inositol and sorbitol.

Taurine in Brain Development

A role for taurine in brain development has been suggested since the early observations about the differences in taurine levels between the developing and the mature brain [8]. Taurine is the free amino acid present in the highest amount in the developing, and neonatal brain, being 3–4-times higher than in the adult. This decline is a consistent feature observed among species, regardless of their differences in taurine concentration [9, 10]. The maturation related reduction in taurine content is observed in most brain regions with the exception of the olfactory bulb in which high taurine levels persists in the adult [10]. Interestingly, the olfactory bulb is the region in which neurogenesis is preserved in the adult brain. Taurine is the free amino acid present in the highest concentrations in milk, including human milk [11]. These results suggest a

requirement for taurine when brain cells are in the process of maturation. This was supported by studies showing the consequences for brain development in taurine deficient cats [9]. Taurine deficiency is difficult to achieve, since facing a dietary taurine restriction, animals respond by suppressing taurine excretion in urine and faeces and most important, switching to glycocholic acid while taurocholic acid synthesis is suspended. It is likely also that other amino acids replace taurine as osmolyte. All these compensatory responses of the organism markedly decrease taurine turnover and maintain taurine contents during long time [9]. Cats are an exception due to their inability to form glycocholic acid and thus taurine is mobilized to liver, decreasing the taurine pool in other tissues including brain. Taurine deficiency in cats result in blindness by destruction of retinal photoreceptors and also in cardiomyopathies caused by heart taurine decrease [9].

In the developing brain, taurine deficiency greatly affects cell migration and organization in two brain regions containing high taurine concentrations, i.e. cerebellum and brain cortex. In cerebellum of taurine-deprived cats the most conspicuous feature is the persistence of cerebellar granule neurons in the external cell layer and the occurrence of numerous cells in mitotic phase, whereas cell division and migration has been completed at the same age in the brain of controls or taurine-supplemented animals. Delayed migration of neuroblasts and glioblasts is also observed in the visual cortex, resulting in a disturbed pattern of neuronal and astrocyte distribution among the cortical layers. Also noteworthy is the low number of pyramidal neurons, and the poor arborisation of those present in the cortex. Disturbed morphology of the spinal cord with abnormal alignment of the dorsal root nerves is found in taurine-deficient newborn cats [9]. Studies in monkeys fed formulas without taurine showed prominently a defective organization of cortical layers in the visual cortex [9]. Despite the fact that these effects of taurine deficiency have been published more than three decades ago, the mechanisms of the taurine requirement for optimal nervous system maturation are as yet unknown. Two main avenues can be considered, one is that taurine is required to maintain the stability and organization of cellular and subcellular membranes, by preventing oxidative deleterious reactions or directly via an effect on proliferation and maturation of developing brain cells.

Protective Actions of Taurine

The protective effects of taurine have been observed in a large number of experimental models, *in vivo* and *in vitro*, in different cells and tissues and facing a variety of injuring stimuli. Taurine protects cells from damage induced by toxic

agents such as arsenite, ozone, CCl₄, manganese, Cd, acetaminophen, methiocarb, NaF, and ammonia. Taurine has also protective actions from injury caused by peroxynitrite, ethanol, bleomycin, streptozotocin. Taurine protection has been found also in cells damaged by β -amyloid and bilirubin. Some taurine cell protection is also reported during ischemia–reperfusion [12], tissue crushing [13], fibrosis [14] and exposure to light [15]. Cytoprotective actions of taurine have been examined in different organs, particularly lung, liver, heart, brain and kidney, but some studies also report taurine protective actions in spinal cord, urinary bladder, retinal pigment epithelium, erythrocytes, and stomach.

Oxidative stress seems to be a common condition in most models in which taurine exhibits a protective action [16]. The detrimental effects of oxidative stress are well known. One of them is the membrane lipid peroxidation, which has profound disturbing effects on the cell function. Ion overload, cell swelling, and excessive Ca²⁺ influx, make an autopropagated chain of deleterious effects, often with fatal consequences for the cell. Possible mechanisms for taurine protective actions include a direct effect as a free radical scavenger, or indirectly, preventing generation of reactive oxygen species and/or protecting cell membranes from ROS damage [16]. Few studies support the direct action of taurine as a free radical scavenger, suggesting rather indirect mechanisms of protection. The old concept of taurine as “membrane stabilizer” [1] is still contemporary, and may provide a common factor to the apparently dissimilar effects of taurine. It is noteworthy that taurine protective effects occur only at very high taurine levels, in the mM range, often as high as 20 mM. This requirement of high concentrations for the protective effects of taurine do not favour actions such as modulating the activity of enzymes, or modifying signalling pathways. A low-affinity interaction of taurine with phospholipids in the membrane, particularly with the charged head groups of the neutral phospholipids, may contribute to protect cell membranes [1]. The high concentrations of taurine required for its protective actions are not present in physiological conditions at the extracellular space. However, in most pathologies or experimental conditions in which taurine shows a protective action, swelling is concurrent factor. Under these conditions, taurine is released from the usually large intracellular pool, and may reach very high concentrations at the extracellular space, as high as required for its protective actions.

Taurine and Cell Proliferation

Studies about taurine and cell proliferation are not numerous and contain conflicting results, showing effects of taurine either increasing or decreasing cell proliferation. Taurine

increases cell proliferation in human fetal neurons [17], in rabbit and human retinal pigment epithelium [18] and in human osteoblasts [19]. Taurine reverses the antiproliferative effect of high glucose and glycosylation end products in the glomerular mesangial and in renal tubule epithelial cells, two cell types which play a central role in the pathogenesis of diabetic nephropathy [20, 21]. Taurine effects decreasing cell proliferation have been found in hepatic stellate cells [22], aortic smooth muscle cells [23] and mice osteoclasts [24]. Some of the proliferative effects of taurine may result from indirect actions as antioxidant as suggested for its effects in mesangial and renal tubule cells [20, 21]. In these models, taurine and other antioxidants restore the antiproliferative action of advanced glycation-end products. Taurine effects on cell proliferation appear mediated by increasing the phosphorylation of the MAPKs ERK1/2 [19].

Neural Progenitor Cells

In a recent study we found a proliferative effect of taurine in cultured embryonic progenitor cells (NPC) obtained from the mouse mesencephalon (13.5-embryonic) [25]. NPC isolated from embryonic brain regions proliferate in vitro as spherical free-floating aggregates termed neurospheres [26]. NPC in neurospheres are able to proliferate, self-renew, and further differentiate into astroglia, oligodendroglia and neurons. Our study showed a consistent effect of taurine increasing neurosphere size and NPC number (Fig. 1). To obtain cultures highly enriched in NPC the excised, dispersed tissue is maintained in a serum-free medium, in the presence of EGF and bFGF, which are the trophic factors sustaining growth and proliferation of NPC [26]. Under these conditions, other cells from the dispersed tissue are not responsive to these factors and die. Consequently, neurosphere-forming cells are exposed to noxious agents derived from the dying cells, and presumably require protective mechanisms for survival and proliferation, which may be provided in part by taurine. Results of our study on the effect of taurine in NPC did not support a cytoprotective action of taurine on NPC, but rather showed an effect increasing cell proliferation. Taurine consistently increased the number of BrdU-positive cells, in all conditions, but did not induce NPC proliferation nor neurospheres generation in the absence of the growth factors [25]. It seems, therefore, that the effect of taurine increasing cell proliferation occurs only when the proliferative process has been initiated, and in this respect, it cannot be considered a proliferative agent per se, but only as a modulator of proliferation. This effect of taurine is as yet unknown, but may be related to taurine influence on antioxidant generation or directly by its antioxidant properties.

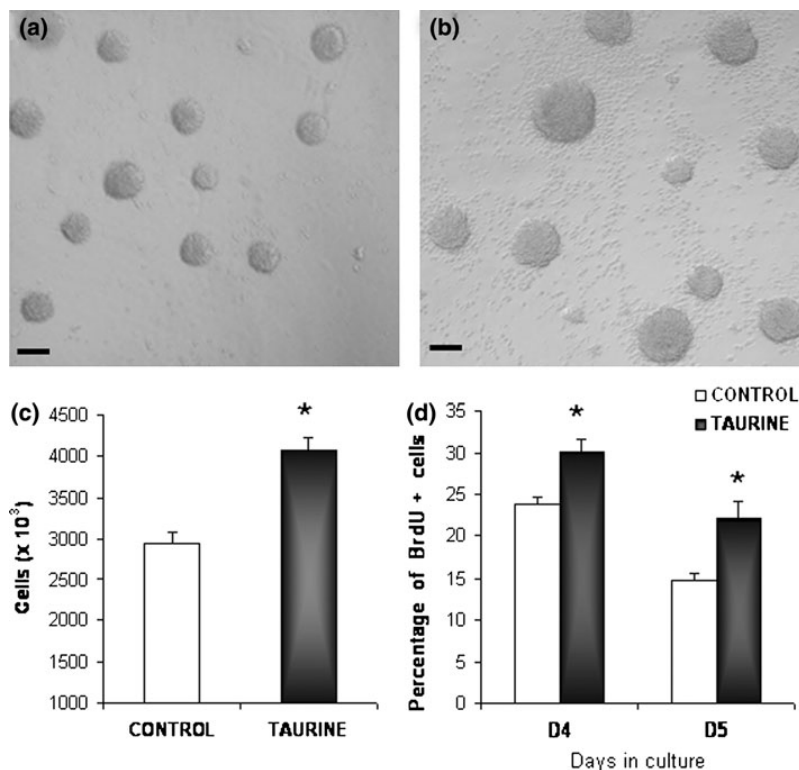


Fig. 1 Effects of taurine on neural precursor cells (NPC). Cells were obtained from the mesencephalon of 13.5 days mice. Tissue was disaggregated and cultured in a serum-free media containing epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (bFGF), 20 ng/mL each. This condition sustains the NPC growth while all other cells die. Within 5 days in culture, NPC form floating spheres (neurospheres). After 5 days in culture, neurospheres were disaggregated and their size and number of neurosphere-forming cells were measured. **a** Neurospheres formed in control condition (EGF + bFGF) or **b** plus taurine (10 mM); photographs were visualized at

4× magnification, scale bar = 100 μm. **c** Number of neurosphere-forming cells grown in conditions described in **a** (white bar) and **b** (dark bar). **d** Proliferation of NPC in neurospheres formed over day 4 and 5 in control cultures (white bars) or plus taurine (dark bars). Proliferation in cultures was determined by BrdU incorporation assay, identifying BrdU+ cells by immunocytochemistry (Details in 25). Results are expressed as percentage of BrdU+ cells present in a pool of 200 cells by each condition. Bars are means ± SEM from 6 experiments, with a significant effect at $P < 0.05$ (*)

There is growing evidence about a role for reactive oxygen and nitrogen species regulating cell proliferation [27–29]. Oxygen reactive species such as H₂O₂ appear to serve as co-stimulatory signals for cell proliferation in various cell types, including neural stem cells [30]. The signaling chain which involves reactive oxygen species implicates ERK1/2, as well as the expression of cell cycle associated proteins such as cyclins and p21 (Cip1) [30–33]. Taurine may then have an influence on cell proliferation through antioxidant effects or an indirect effect cell via the synthesis of taurine chloramine [34].

Conclusion

All these considerations open the intriguing possibility of a convergent point for the cytoprotective and proliferative

actions of taurine. Providing evidence for this notion is a most interesting future research avenue.

Acknowledgments Work from our laboratory was supported by grants from UNAM IMPULSA-03, DGAPA IN203410 and from CONACYT 98952. This study is part of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Reyna Hernández-Benítez at the Universidad Nacional Autónoma de México, with a CONACYT, Mexico fellowship.

References

- Huxtable RJ (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:101–163
- Ueki I, Stipanuk MH (2007) Enzymes of the taurine biosynthetic pathway are expressed in rat mammary gland. *J Nutr* 137:1887–1894
- Smith KE, Borden LA, Wang CH et al (1992) Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 42:563–569

4. Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S et al (1993) Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 268:22802–22808
5. Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G et al (2006) Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* 119:S4–S11
6. Sánchez-Olea R, Morán J, Pasantes-Morales H (1992) Changes in taurine transport evoked by hyperosmolarity in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 32:86–92
7. Bitoun M, Tappaz M (2000) Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in brain of rats with acute or chronic hyperosmotic plasma. A comparative study with gene expression of myo-inositol transporter, betaine transporter and sorbitol biosynthetic enzyme. *Brain Res Mol Brain Res* 77:10–18
8. Agrawal HC, Davies J, Himwich WA (1968) Developmental changes in mouse brain: weight, water content and free amino acids. *J Neurochem* 15:917–923
9. Sturman JA (1993) Taurine in development. *Physiol Rev* 73:119–147
10. Miller TJ, Hanson RD, Yancey PH (2000) Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125:45–56
11. Rassin DK, Sturman JA, Guall GE (1978) Taurine and other free amino acids in milk of man and other mammals. *Early Hum Dev* 2:1–13
12. Kingston R, Kelly CJ, Murray P (2004) The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 10:2401–2410
13. Gupta RC, Seki Y, Yosida J (2006) Role of taurine in spinal cord injury. *Curr Neurovasc Res* 3:225–235
14. Schuller-Levis G, Gordon RE, Wang C et al (2009) Protection of bleomycin-induced fibrosis and inflammation by taurine. *Int Immunopharmacol* 9:971–977
15. Pasantes-Morales H, Cruz C (1985) Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain Res* 330:154–157
16. Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M (2009) Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 87:91–99
17. Chen XC, Pan ZL, Liu DS et al (1998) Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 442:397–403
18. Gabrielian K, Wang HM, Ogden TE et al (1992) In vitro stimulation of retinal pigment epithelium proliferation by taurine. *Curr Eye Res* 11:481–487
19. Jeon SH, Lee MY, Kim SJ et al (2007) Taurine increases cell proliferation and generates an increase in $[Mg^{2+}]_i$ accompanied by ERK 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett* 581:5929–5934
20. Trachtman H, Futterweit S, Bienkowski RS (1993) Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 191:759–765
21. Huang JS, Chuang LY, Guh JY et al (2008) Effect of taurine on advanced glycation end products-induced hypertrophy in renal tubular epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 233:220–226
22. Chen YX, Zhang XR, Xie WF et al (2004) Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3:106–109
23. Yoshimura H, Nariai Y, Terashima M et al (2005) Taurine suppresses platelet-derived growth factor (PDGF) BB-induced PDGF-beta receptor phosphorylation by protein tyrosine phosphatase-mediated dephosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1745:350–360
24. Yuan LQ, Liu W, Cui RR et al (2010) Taurine inhibits osteoclastogenesis through the taurine transporter. *Amino Acids* 39:89–99
25. Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Saldaña IT et al (2010) Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 88:1673–1681
26. Rietze RL, Reynolds BA (2006) Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* 419:3–23
27. Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM et al (2009) Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther* 122:97–108
28. Stone JR, Collins T (2002) The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 9:231–238
29. Martín V, Herrera F, García-Santos G et al (2007) Signaling pathways involved in antioxidant control of glioma cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 42:1715–1722
30. Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES et al (2002) H_2O_2 induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 277:13761–13770
31. Kim J, Wong PK (2009) Loss of ATM impairs proliferation of neural stem cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK signaling. *Stem Cells* 27:1987–1998
32. Burch PM, Heintz NH (2005) Redox regulation of cell-cycle re-entry: cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. *Antioxid Redox Signal* 7:741–751
33. Ranjan P, Anathy V, Burch PM et al (2006) Redox-dependent expression of cyclin D1 and cell proliferation by Nox1 in mouse lung epithelial cells. *Antioxid Redox Signal* 8:1447–1459
34. Park E, Schuller-Levis G, Quinn MR (1995) Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. *J Immunol* 154:4778–4784