

11281  
5  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Alteraciones en Tejidos Excitables en  
Animales Deficientes en Taurina

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biomédicas

presenta

Octavio Quesada García

Febrero de 1990

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN

La taurina, ácido 2-amino etansulfónico, es un componente universal de los tejidos animales, que se encuentra particularmente concentrado en aquellos con propiedades de excitabilidad y cuya participación en la fisiología celular aún no ha sido establecido con precisión. A partir de la descripción en gatos de que una disminución de los niveles de taurina en la retina, provoca la desestabilización y muerte celular de los fotorreceptores, el efecto ha sido reproducido en varias especies aunque no se le ha caracterizado ni comprendido en su totalidad. Otros tejidos que expresan alteraciones durante una deficiencia en taurina incluyen el cerebro, en donde algunos procesos de su maduración se ven afectados. Además, en gatos se ha observado un desarrollo ontogenético anormal generalizado cuando la deficiencia ocurre in utero. No obstante, las consecuencias de tal condición no han sido exploradas en la mayoría de los tejidos, a pesar de que algunos de ellos, como el tejido muscular incluyendo el cardíaco, contienen grandes pozas del aminoácido.

En el presente trabajo, se implementaron dos modelos animales de deficiencia en taurina: el gato, sometido a una dieta libre del aminoácido, y la rata tratada con el análogo de la taurina, guanidinoetano sulfonato. En el primer modelo, se avanzó en la caracterización del proceso degenerativo en la retina, en donde se alcanzaron las siguientes conclusiones: a) La desestabilización de los fotorreceptores (FR) es independiente de los procesos de fotoactivación y fototransducción, ya que la alteración se expresa aún en ausencia de estimulación luminosa. Lo anterior fue comprobado también en el segundo modelo estudiado, en donde se estableció una correlación directa entre el grado de desgaste de la poza retinal de taurina y la intensidad de la alteración funcional de ese órgano. b) El colesterol y la Vit-E no coadyuvan a la expresión de la degeneración retineana, a pesar de que la absorción intestinal de dichos compuestos podría estar muy disminuida. Se considera que en el caso del primer elemento, ocurre un balance homeostático a través de la síntesis de novo del lipido. c) Otros compuestos con propiedades estabilizantes no previenen la desorganización de los FR, indicando la alta especificidad del requerimiento de estas células por la taurina, además de señalar que el mecanismo operante en la acción estabilizadora de la taurina es distinto en cada caso con el de los compuestos probados.

Por otra parte, en un sistema aislado de segmentos externos de fotorreceptores, se caracterizó el efecto estabilizante de la taurina sobre estas estructuras, cuando son alterados por una exposición prolongada a luz o a un medio libre de cationes divalentes. En estos estudios se revisaron tanto la especificidad del aminoácido en sus efectos estabilizantes, como las dependencias iónicas de ambos fenómenos. Se concluyó, por una parte, que sólo compuestos estrechamente relacionados con el aminoácido ejercen protección, y además que los dos grupos funcionales de la taurina son necesarios para expresar efectivamente dicho efecto.

En otros estudios, se exploraron los efectos de una reducción en los niveles de taurina sobre la actividad contráctil, tanto basal como estimulada, en dos preparaciones de músculo liso: el íleo y la tráquea. Los resultados indican que la deficiencia en taurina no afecta la actividad basal en ninguna preparación, sin embargo provoca un fenómeno similar a la supersensibilidad por denervación. Dichas respuestas aunque semejantes en ambas preparaciones, fueron cuantitativamente mayores en la preparación intestinal. Los datos son discutidos en términos de un efecto facilitatorio de la taurina sobre el movimiento de calcio al interior celular.

Las alteraciones observadas en distintos tejidos bajo una condición de deficiencia en taurina, parecen ocurrir a nivel de los flujos iónicos que ocurren a través de la membrana plasmática; por ello y con base en el presente y otros estudios, se discute la posibilidad de que el aminoácido pueda estar interactuando en condiciones normales con los fosfolípidos de la membrana, confiriéndoles una estabilidad estructural. En el caso de una deficiencia entonces, se provocarían flujos iónicos anormales que se expresarían en cada tejido de manera específica, y de acuerdo con su propia naturaleza y función.

## ABSTRACT

Taurine, -2-amino ethanesulfonic acid- is a free amino acid present in most tissues of every animal so far studied. It is highly concentrated in excitable tissues, i.e. brain, heart, muscle and in liver. In spite of its wide distribution and high concentrations, no specific physiological role has been ascribed to taurine.

It has been established that a decrease of taurine levels beyond a critical value in the cat retina, results in a severe structural damage to photoreceptors (PR), and retinal dysfunction leading to blindness. Such an effect has been reported to occur also in other species, however the phenomena has not been fully characterized nor understood. Other processes reported to be altered by taurine deficiency include several maturation events in brain and a generalized perturbation of development when deficiency occurs in utero. Consequences of taurine-deficiency have not been explored in most tissues, although some of them have large taurine pools, for instance, the heart and the skeletal and smooth muscle.

In the present study two animal models of taurine deficiency were used: the cat fed with a taurine-free diet, and the rat treated with guanidinoethane sulfonate, a taurine analog. In the first model some aspects of the retinal degeneration produced by taurine deficiency were studied and the following conclusions were reached: a) The PR distabilization is a phenomenon independent of the photoexcitation and phototransduction processes. The cell alteration occur regardless of light stimulation. This was demonstrated also in taurine-deficient rats, where a direct correlation between taurine pool size and PR dysfunction was established. b) Although the intestinal absorption of cholesterol and Vit-E should be severely impaired because of the decreased hepatic taurine pool, it seems that these compounds are not involved in the retinal degeneration genesis nor in any other expression of taurine deficiency. c) Other compounds with stabilizing properties were unable to prevent the PR dysfunction, pointing out the high specificity of the taurine requirement by these cells, and suggesting as well that the mechanisms subserving membrane stabilization are differente in each case with that of taurine.

The stabilizing effect of taurine was studied in vitro in a preparation of frog rod outer segments. Two conditions wich lead to cell disruption were tested: exposure to intense illumination and to a  $Ca^{++}/Mg^{++}$  -free medium, characterizing in both cases the specificity of taurine protective effect and their ionic requirements. It was observed that only very close taurine analogs exert a protective action on outer segments structure, and that both functional groups of the molecule (amine and sulfonate) are necessarily to efectively protect cell structure.

7

In other studies, the effects of taurine depletion on muscular performance were explored in two smooth muscle preparations from taurine-deficient cats: the ileal portion of intestine and the trachea. Results shows that taurine depletion do not alter basal contractility nor muscular tone, however it increase the responssiveness to acetylcholine, in a similar way to that observed in supersensitivity by denervation. Taurine per se induced muscle contraction, a response augmented in the experimental condition. The effects were similar in both muscle preparations although more pronounced in ilea. Data are discussed in terms of taurine interactions with calcium fluxes at the plasmalema.

The range of alterations observed in tissues from taurine-deficient animals, although different among them, seems to involve an initial modification in plasma membranes. Due to this, a general hypotesis which consider a possible interaction between chrged groups of taurine and membrane phospholipids is disscused.

## INDICE

### I INTRODUCCION

- 1) Generalidades acerca de la taurina ..... 1
- 2) Biosíntesis y Degradación ..... 1
- 3) Distribución regional y recambio ..... 3

### II PRESENCIA, DISTRIBUCION Y FUNCIONES PROPUESTAS EN LOS TEJIDOS EXCITABLES

- 1) Tejido Nervioso.
  - 1.1) Sistema Nervioso Central.
    - a) Distribución Regional ..... 5
    - b) Distribución subcelular ..... 5
    - c) Funciones Propuestas ..... 6
  - 1.2) La retina.
    - a) Organización Morfológica y Funcional ..... 12
    - b) Taurina en la Retina ..... 14
- 2) Tejido Muscular.
  - 2.1) Corazón.
    - a) Biosíntesis ..... 23
    - b) Efectos Fisiológicos y Farmacológicos ..... 24
  - 2.2) Músculo liso y esquelético ..... 27
- 3) Tejido Hepático ..... 28

### III OBJETIVOS ..... 32

### IV METODOS ..... 34

V ESTUDIOS EN TEJIDOS EXCITABLES EN ANIMALES DEFICIENTES EN TAURINA

1) Estudios en Retina

1.1 Effect of light deprivation on the ERG responses of taurine-deficient rats.. 37

1.2 Taurine and photoreceptor structure: Biochemical and electrophysiological studies..... 45

2) Estudios en Músculo liso

2.1 Alterations in the isolated duodenum and intestine responsiveness to acetylcholine and taurine in taurine-deficient animals..... 56

3) Estudios en Hígado y Otros Estudios

3.1 Niveles de colesterol en hígado y eritrocitos de gatos deficientes en taurina..... 64

V CONCLUSIONES ..... 73

VI LITERATURA CITADA ..... 76



## INTRODUCCION

### I Generalidades acerca de la taurina

La taurina es un aminoácido substituido que presenta un grupo sulfonato en la posición del carboxilo en la estructura común de los aminoácidos. En condiciones de pH fisiológico, 7.4, la taurina se comporta como un switerión, es decir, sus grupos funcionales amino y sulfonato se encuentran ionizados mostrando una carga positiva y una negativa, y sin una carga molecular neta.

A partir de su descripción en 1827 en la bilis del toro (Tiedeman y Gmelin), la taurina fué sucesivamente identificada en distintos tejidos de diversos phyla, tanto de Invertebrados como de Vertebrados, así como en protozoarios, estableciéndose su distribución ubicua en el reino animal (Jacobsen y Smith, 1968). Particularmente, la taurina se presenta en los tejidos y en los distintos grupos siempre en forma libre, y a excepción de algunos tripéptidos recientemente descritos en el cerebro de roedores (Marnela, 1984), no es un componente estructural de macromoléculas. Sus concentraciones no obstante, son en ocasiones muy elevadas, alcanzando niveles de concentración del orden milimolar en algunos tejidos.

Resulta notable que a más de un siglo y medio de su identificación y de su carácter ubicuo en el reino animal, la función o funciones que la taurina desempeñe en la fisiología de los organismos, aún no hayan sido establecidas con precisión. La literatura científica que denota los esfuerzos tendientes a resolver esta pregunta es vasta y diversa, como lo son los procesos fisiológicos con los que se ha relacionado a la taurina; una participación en la función membranal de los tejidos muscular y nervioso, el control de la temperatura corporal, la osmorregulación, la neurotransmisión y el control del ritmo cardiaco son, sólo por mencionar algunos, procesos en los que se ha propuesto una participación taurinérgica, pero en donde también la demostración clara de la posición en donde se inserta el aminoácido en el dinámico contexto de los procesos fisiológicos no ha sido alcanzado aún.

### Biosíntesis y Degradación

La biosíntesis de taurina a partir de precursores endógenos no ha sido del todo esclarecida, no obstante la amplia gama de tejidos que la realizan. Sin embargo, se han descrito varias vías metabólicas a través de las cuales es posible generar de novo el aminoácido, y en donde se han identificado tanto los intermediarios como las enzimas involucradas en la ruta.

El precursor de la taurina es la cisteína, la cual se forma principalmente por la transulfuración enzimática de la serina, teniendo a la cistationina como producto intermediario. Dichas

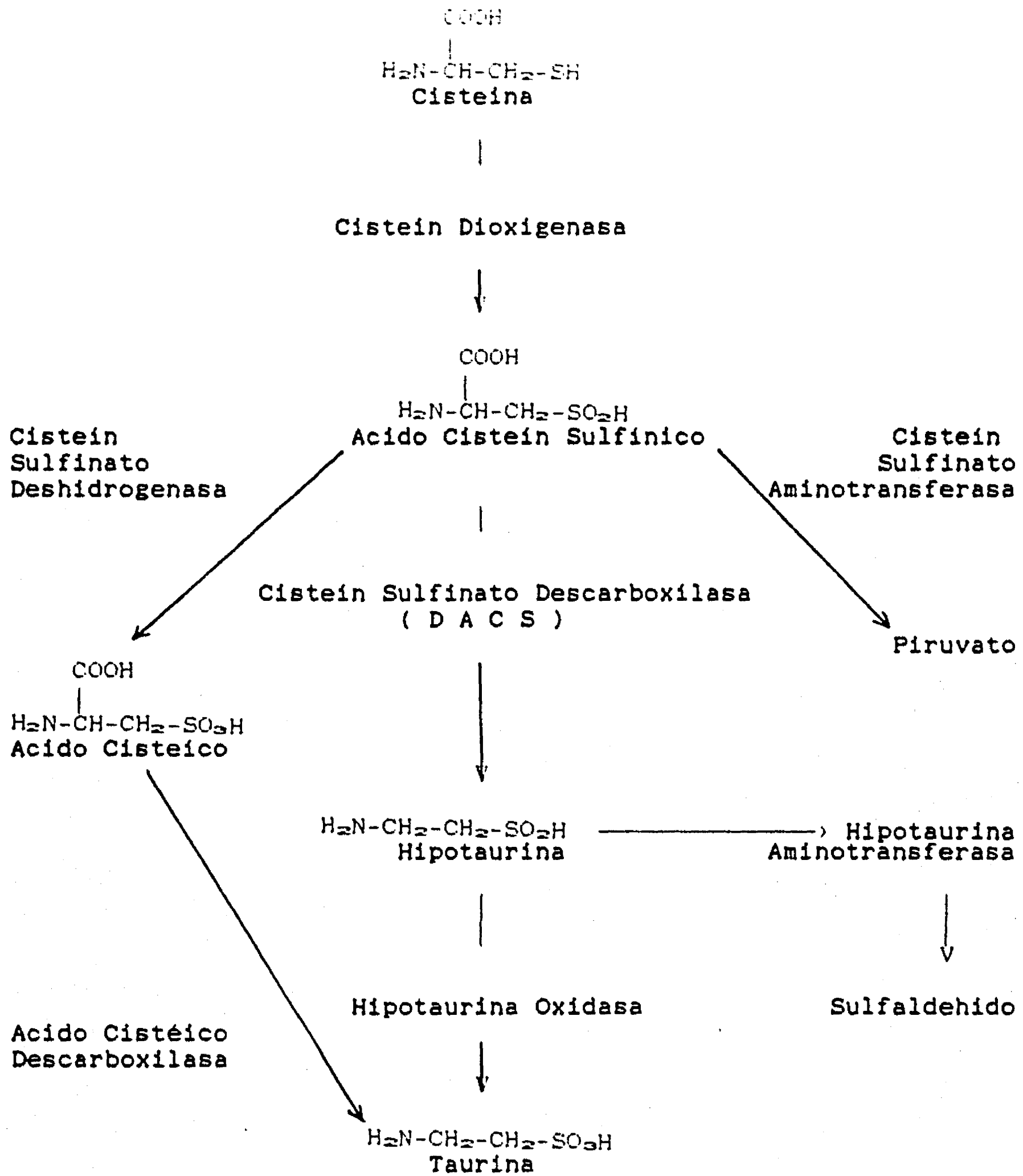


FIG 1.- Metabolismo de la Taurina a partir de la Cisteina.

(Pasantes-Morales, 1986).

transformaciones son catalizadas por las enzimas cistationina sintetasa primeramente, y después por la cistationasa. Esta vía podría ser la operante para la formación de la cisteína precursora de la taurina en tejidos como el riñón y el hígado.

Se ha demostrado, por otra parte, que la metionina puede ser convertida en cisteína y eventualmente en taurina *in vivo* (Peck y Awapara, 1964), así como en rebanadas y homogenados de cerebro en ensayos *in vitro* (Gaitonde y Richter, 1957), viniendo a ser entonces, el precursor inicial de la taurina. Sin embargo, tal proposición no excluye la vía de transulfuración descrita inicialmente.

La conversión de la cisteína en taurina ocurre por la oxidación inicial de la primera para producir el ácido cisteín sulfínico. La transformación de este precursor ácido tiene dos alternativas, ambas demostradas en diversos tejidos como el hígado, el riñón y el cerebro. La primera y mas utilizada, según indica la evidencia experimental utilizando precursores radioactivos, es una descarboxilación catalizada por la descarboxilasa del ácido cisteín sulfínico (DACs). Esta enzima se ha identificado en riñón, hígado y cerebro, aunque entre estas últimas es posible que se trate de isoenzimas con algunas diferencias entre sí (Pasantés-Morales, et al., 1976; Rassin y Sturman, 1975). La DACs no ha sido descrita en músculo esquelético ni cardíaco.

La actividad de la DACs tiene como producto el ácido 2-amino etan sulfínico o hipotaurina. Esta última es transformada en taurina por la hipotaurina deshidrogenasa, cuya actividad ha sido demostrada en hígado, riñón y músculo de rata (Cavallini et al., 1954; Sumizu, 1962) y se ha sugerido su acción en tejido nervioso (Peck y Awapara, 1964).

Alternativamente, el ácido cisteín sulfínico puede ser convertido en ácido cisteico por una oxidación y eventualmente en taurina por una descarboxilación posterior. Este último proceso puede ser catalizado por la descarboxilasa del ácido cisteico o incluso por la DACs, quien puede reconocerlo como sustrato y transformarlo.

En los tejidos donde no se ha demostrado actividad de la DACs, se ha sugerido como vía alternativa la biosíntesis de taurina a partir de la cisteamina y con la hipotaurina como intermediario. Esta vía se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* en distintos órganos de la rata, el cobayo y el ratón, entre los cuales, el corazón y el pulmón mostraron las actividades más altas, mientras que las menores fueron determinadas en hígado, cerebro y plasma (Huxtable y Bressler, 1976).

Los mecanismos de degradación de la taurina son prácticamente inexistentes y a pesar de conocerse algunos compuestos biológicos derivados de ella entre los mamíferos en particular, al parecer la mayor proporción del aminoácido después

de su biosíntesis o ingestión, es utilizada, recambiada y excretada a través de la orina principalmente, sin sufrir modificaciones químicas.

Entre los productos conocidos derivados de la taurina, destacan por su importancia los ácidos biliares taurocólico, taurodeoxicólico, tauroquenodeoxicólico y otros menores, los cuales son formados por la conjugación de la taurina con los ácidos biliares correspondientes y siendo el primero el más abundante. Es esta una reacción que ocurre en el hígado y que se encuentra ampliamente distribuida entre los vertebrados en general. Muestra una dependencia importante de la disponibilidad de taurina exógena proveniente de la dieta y está interrelacionada con la tasa de biosíntesis hepática del aminoácido. En ratas, por ejemplo, la suplementación de la dieta con taurina, modifica el metabolismo de las sales biliares, incrementando su conjugación con ella; simultáneamente, la tasa de síntesis hepática del aminoácido disminuye, mientras que la tasa de excreción se ve incrementada (Spaeth y Schneider, 1976). Además, se ha establecido una correlación interespecífica entre la tasa de síntesis hepática de taurina (estimada por la actividad de la DACS) y la proporción de sales conjugadas con el aminoácido en la rata, el cobayo y el conejo (Spaeth y Schneider, 1976).

Otros productos derivados de la transformación química de la taurina incluyen el sulfato inorgánico, documentado en ratas y bacterias, la taurociamina en algunos invertebrados, así como algunos derivados metilados como la metil y dimetil taurina, y la taurobetaina, descritos en organismos simples como algas rojas, esponjas y celenterados (Jacobsen y Smith, 1968).

El ácido isetiónico finalmente, es un anión muy abundante en moluscos y constituyente principal del axoplasma del axón gigante del calamar, del cual se pensó fuera el producto de la transaminación de la taurina, sin embargo, evidencia posterior ha puesto en duda tal aseveración (Hoskin y Kordik, 1977). En tejidos de mamíferos, dicha transformación se ha reportado que ocurre en corazón de perro (Welty y Read, 1962) y en cerebro de rata (Peck y Awapara, 1967). Sin embargo, la velocidad de transformación estimada es demasiado lenta para considerarse como una vía de degradación importante del aminoácido. Además, en otros estudios, utilizando taurina marcada con tritio en dos posiciones, no fue posible demostrar tal reacción en corazón de perro ni en corazón o cerebro de rata, tanto en rebanadas como en homogenados de tejido (Fellman et al., 1978).

### Transporte y Recambio

Las pozas tisulares de taurina son alimentadas por dos vías: 1) la biosíntesis endógena, y 2) la captura de la poza plasmática, siendo la proporción particular para cada tejido. Con respecto a la captura, por estudios in vitro se ha sugerido que la taurina puede ingresar a las células por dos mecanismos: a) a través del sistema de transporte activo específico para los

aminoácidos y b) por un tipo de difusión simple. En el primer caso el sistema es saturable, dependiente de la presencia de un gradiente de sodio y sensible a temperatura y venenos metabólicos, mientras que el tercero no es saturable y depende por supuesto de un gradiente de concentración. El transporte activo, sin embargo, podría ser el sistema preferente de captura de taurina en muchos tejidos si se consideraran los elevados gradientes que éstos mantienen con respecto al plasma. En los fotorreceptores de la retina, por ejemplo, el gradiente de concentración se sitúa normalmente cerca de 400:1 con respecto al plasma, y en el corazón las proporciones pueden ser aún mayores: entre 500 y 1000:1.

No obstante la eficiencia de los sistemas activos de transporte, la participación del componente difusional podría ser importante bajo ciertas condiciones metabólicas, en combinación con altos niveles plasmáticos derivados de la ingesta.

El recambio de las pozas tisulares de taurina ocurre a muy distintas velocidades. En términos generales, se han distinguido tres grupos de tejidos dependiendo de la rapidéz del recambio, estimada ésta por la actividad específica cuantificada en cada tejido después de introducir en el animal íntegro una carga de taurina radioactiva (Spaeth y Schneider, 1976). Así, se considera que órganos como el riñón, el hígado, el páncreas y las glándulas suprarrenales presentan un recambio rápido de taurina, de alrededor de 24 horas, mientras que el proceso es intermedio en el bazo, el pulmón, el intestino y las gónadas (3 días, aproximadamente). Finalmente, en tejidos como el músculo, el corazón y el cerebro, la taurina se recambia más lentamente, mostrando una vida media cercana a los siete días (Spaeth y Schneider, 1976).

## II Presencia, Distribución y Funciones Propuestas de la Taurina en los Tejidos Excitables

No obstante la amplia distribución que presenta la taurina en los tejidos animales, sus contenidos varían en un amplio rango aún en la misma especie, oscilando desde huellas o concentraciones nanomolares en el hígado de conejo, hasta valores en la escala milimolar en la retina o el corazón del mismo animal (Awapara, 1955). Además, los niveles de taurina son influidos por diversos factores que incluyen la edad, el sexo, los hábitos alimenticios, en ocasiones el estado estacional y hormonal, así como la etapa del desarrollo embrionario, siendo este último un factor que puede determinar diferencias en un mismo tejido de hasta 5 veces un valor en distintas etapas del desarrollo, como por ejemplo en el cerebro de primates al término de la gestación con respecto al estado adulto (Sturman y Gaul, 1976).

Un denominador común en la mayoría de los vertebrados, es la presencia de cantidades relativamente abundantes de taurina en sus tejidos excitables: músculo liso, esquelético y cardíaco, tejido nervioso y glándulas de secreción, tanto endócrinas como exócrinas (Jacobsen y Smith, 1968).

## 1.- TEJIDO NERVIOSO

### 1.1 Sistema Nervioso Central.

#### a) Distribución Regional

La taurina se encuentra ampliamente distribuida en el tejido nervioso de prácticamente todas las especies estudiadas. Es además, uno de los aminoácidos más abundantes ya que sus concentraciones, en la escala milimolar, son sólo inferiores a las del ácido glutámico.

La distribución regional de la taurina en el SNC es heterogénea. Así, para el cerebro de la rata, se han reportado valores de 4.5 a 6.2  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  en el cerebelo y de 4.2 a 11  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  en la corteza cerebral (Shank y Aprison, 1970; Crabai et al., 1974; Lombardini, 1976). En un margen similar oscilan las concentraciones de taurina reportadas para cuerpo estriado, diencefalo y lóbulos olfatorios (4.4 a 9.3  $\mu\text{mol}/\text{gr}$ ), mientras que distintos autores coinciden en que los niveles en el tallo cerebral y la médula espinal, no alcanzan las 2  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  (idem). La hipófisis es probablemente la región del SNC con los niveles más elevados de taurina; en ella se han determinado valores de 109  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  para la neurohipófisis y de casi 18  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  en la adenohipófisis. Asimismo, en la glándula pineal, el contenido de taurina estimado fue de 60  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  (Crabai et al., 1974).

Dentro de una misma región anatómica, los niveles de taurina pueden ser distintos. Esto ha sido particularmente estudiado en el cerebelo de la rata, en donde se ha postulado a la taurina como el neurotransmisor inhibitor liberado por las células estrelladas; así, los niveles de taurina son menores en el estrato de las células excitadoras granulares en comparación con las inhibitorias estrelladas (Nadi et al., 1977). En los colículos superiores del cerebro de gato, la región posterior contiene los niveles más altos del aminoácido en esa estructura, mientras que la región anterior presenta los más bajos (Guidotti et al., 1972).

#### b) Distribución Celular

La taurina se encuentra presente tanto en neuronas como en células gliales. Cuando el tejido es sometido a un fraccionamiento celular, la mayor proporción del aminoácido se recupera en la fracción soluble (Rassin et al., 1977). En un estudio de distribución subcelular de taurina en varias regiones cerebrales en la rata, se encontró que no obstante las distintas concentraciones de las regiones estudiadas, las fracciones mitocondrial, microsomal y sinaptosomal contienen concentraciones de taurina aproximadamente iguales, con excepción de la corteza y el cerebelo, en donde la fracción sinaptosomal mostró niveles más elevados (Lombardini, 1976).

Se ha observado que las vesículas sinápticas son estructuras con una abundancia particular de taurina. Lo anterior se ha determinado en vesículas aisladas de diversas regiones del cerebro de bovinos (Kontro et al., 1980), así como en aquellas aisladas de la corteza cerebral de la rata (De Belleruche y Bradford, 1973).

A diferencia de otros aminoácidos como el GABA, la taurina es transportada axonalmente en el sistema visual de la carpa, a una velocidad similar a la del transporte rápido de proteínas (Ingoglia et al., 1978), mientras que en mamíferos en esta misma vía, el transporte ocurre aunque no asociado con proteínas y alcanza un máximo antes y durante la mayor proliferación sináptica (Politis e Ingoglia, 1979).

### c) Funciones Propuestas

En el Sistema Nervioso, la taurina ha sido involucrada en diversos eventos fisiológicos que van desde un posible papel como neurotransmisor, como neuromodulador, así como un factor actuante en la regulación de la temperatura corporal y la excitabilidad membranar. Se han descrito asimismo ciertos efectos tróficos de la taurina y se ha postulado su participación en los procesos de maduración membranar. En el presente capítulo se revisa brevemente la evidencia experimental más significativa que ha llevado a la postulación de una actividad taurinérgica en estos procesos particulares.

### Neurotransmisor o Neuromodulador

\*\*\*\*

La taurina ejerce un efecto inhibitorio sobre la tasa de disparo neuronal en la mayoría de las regiones del SNC. Dicho efecto generalizado es ejercido a través de la hiperpolarización de las membranas por medio de modificaciones en la permeabilidad iónica, principalmente al cloro (Curtis y Johnston, 1974; Oja et al., 1977). Estas acciones, junto con su distribución heterogénea en el SNC, su acumulación en terminales nerviosas, así como la presencia de sistemas de transporte de alta afinidad en estas estructuras y su liberación en respuesta a estímulos despolarizantes, han conducido a la postulación del aminoácido como un posible neurotransmisor inhibitorio en regiones como la corteza cerebral (Hösli et al., 1973) y la corteza cerebelar (Okamoto y Sakai, 1980).

Sin embargo, existe una amplia base experimental en contra de dicha proposición entre la que se puede mencionar la siguiente: En la corteza cerebral, los efectos hiperpolarizantes de la taurina, y aquéllos depresores de la generación de espigas en células individuales, así como las modificaciones en respuestas eléctricas poblacionales, son bloqueados por la bicuculina y la estricnina (Curtis et al., 1971), agentes que antagonizan específicamente la interacción y los efectos postsinápticos del ácido gama aminobutírico (GABA) y la glicina, respectivamente. De manera análoga, la bicuculina bloquea los efectos inhibitorios de la taurina sobre neuronas del tálamo



(Curtis y Tebecis, 1972) y del cerebelo (Okamoto y Sakai, 1980). En el tallo cerebral y en la médula espinal, la taurina deprime la actividad neuronal por medio de una acción despolarizante, y en ambos casos, sus efectos son bloqueados reversiblemente por picrotoxina, otro antagonista del receptor al GABA, así como por la bicuculina y la estriquina (Haas y Höslí, 1973; Höslí et al., 1975). Estos resultados, aunados al hecho de que no se ha identificado ningún agente que antagonice selectivamente los efectos postsinápticos de la taurina, han llevado a concluir que las acciones transinápticas inhibitorias del aminoácido, son mediadas por una interacción de éste con los receptores a la glicina y el GABA, dada la estrecha semejanza estructural que guarda con ellos.

Por otra parte, la liberación de neurotransmisores de manera dependiente de calcio es una condición ampliamente documentada para prácticamente todos los neurotransmisores conocidos, no obstante que para algunos aminoácidos como el GABA y el ácido glutámico, tal dependencia en algunas regiones sólo sea parcial. Para el caso de la liberación de taurina en respuesta a estímulos despolarizantes (altas concentraciones de potasio, presencia de alcaloides del tipo de la veratrina y veratridina, estimulación eléctrica), la dependencia de calcio no ha sido claramente establecida- siendo los resultados en ese sentido variables y aún contradictorios. Así, la liberación de taurina *in vivo*, estimulada por todas las condiciones arriba mencionadas, depende de manera importante de la presencia de calcio extracelular en la corteza cerebelar de gato (Davidson, 1979) pero no en la corteza cerebral (Clarck y Collins, 1976), en donde un incremento *per se* de calcio intracelular dispara la liberación del aminoácido (Kaczmarek y Adey, 1974). Más aún, en rebanadas de cerebro y cerebelo, así como en sinaptosomas aislados, la ausencia de calcio extracelular atenúa sólomente la liberación de taurina estimulada por alto potasio (Okamoto y Namina, 1978; Placheta et al., 1979) o por estimulación eléctrica (Wheeler et al., 1979); no es afectada en rebanadas de corteza cerebral estimulada por alto potasio (Collins y Topiwala, 1974) y aún es incrementada cuando se desencadena por estimulación eléctrica en rebanadas de corteza cerebral e hipotálamo, en la rata (Orrego et al., 1976).

Otras evidencias que no apoyan, al menos en diversas regiones del SNC, un papel para la taurina como mediador sináptico incluyen: a) Un curso temporal de liberación distinto (lento y sostenido) al patrón típico de neurotransmisores (rápido y de pronta inactivación); b) La falta de correlación entre su distribución regional y las zonas de mayor sensibilidad a sus efectos; c) su presencia en muchas y muy diversas regiones fuera de la sinapsis, con frecuencia en altas concentraciones; d) su presencia y acumulación activa en células gliales, y e) la falta de receptores sinápticos específicos a través de los cuales ocurran sus efectos.

A manera de balance final, se puede decir que no obstante que en algunas regiones del SNC la posibilidad de que la taurina pueda participar como un mediador sináptico no pueda descartarse



- Por ejemplo, en la corteza cerebelar mediando la comunicación entre las células estrelladas y de Purkinje -, es claro que las características de muchas pozas taurinérgicas dentro del SNC no se ajustan a dicho papel, incluyendo algunas sinápticas, por lo que buena parte de la investigación en torno a su participación fisiológica se ha orientado a la exploración de hipótesis alternativas.

Por otra parte, se ha considerado que la taurina podría ejercer una acción moduladora sobre la transmisión sináptica. En general, se considera que un neuromodulador es aquel compuesto que facilita o inhibe la manifestación de las respuestas postsinápticas derivadas de la actividad del neurotransmisor, en una misma sinapsis. Sus acciones pueden ocurrir a varios niveles: a) Presináptico, modificando los sistemas de síntesis, almacenamiento, secreción y/o inactivación del neurotransmisor; b) Postsináptico, modificando la unión del neurotransmisor con su receptor o el sistema de decodificación de señales, y/o c) Extrasináptico, influyendo el estado interno de las neuronas, al incidir sobre factores como la regulación interna de calcio libre, la de niveles de mensajeros endógenos como AMPc o GMPC o la actividad de la bomba de Na/K.

En este contexto, se ha descrito que la taurina suprime la liberación de norepinefrina y acetilcolina del ganglio cervical superior y de rebanadas de corteza cerebral de rata, estimuladas por alto potasio (Muramatzu et al., 1978). Cuando se inyecta intraventricularmente, la taurina incrementa la síntesis de dopamina y norepinefrina en todas las regiones estudiadas, inhibe el disparo de las células dopaminérgicas y excita a neuronas noradrenérgicas (García de Yébenes et al., 1978). En este sentido, se ha sugerido que la taurina podría ejercer sus efectos sobre la conducta motora y la temperatura corporal a través de sus efectos sobre neuronas catecolaminérgicas (García de Yébenes et al., 1978). Asimismo, la taurina potencia la liberación estimulada de GABA de la corteza cerebral sin afectar su recaptura (Leach, 1979) y se cuenta con evidencia de una interacción con el receptor GABAérgico, en el sitio de unión de las benzodiazepinas (Williams et al., 1980).

Por otra parte, varios estudios han mostrado una interacción entre la taurina y los movimientos y concentración de calcio, ya sea desde el espacio extracelular al medio interno, o modificando las pozas intracelulares del catión. La taurina entonces, podría modular las concentraciones intracelulares de calcio y por este medio modificar la excitabilidad neuronal. La evidencia experimental que sustenta tal aseveración incluye lo siguiente: En sinaptosomas de cerebro de rata, la taurina inhibe la liberación y recaptura de calcio, y bajo una condición de bajo calcio extracelular puede estimular su transporte (Pasantes-Morales y Gamboa, 1980; Kuriyama et al., 1978; Rentulla et al., 1979). Más aún, en una preparación de microsomas de cerebro de ratón, la taurina inhibe la unión de calcio bajo condiciones despolarizantes, mientras que no tiene efecto en ausencia de estimulación (Izumi et al., 1978).

La taurina podría modular la concentración intracelular de calcio interactuando con los mecanismos mitocondriales de retención del catión (Nakagawa y Kuriyama, 1978). En este organelo, la taurina incrementa la asociación de calcio a las membranas en corazón - y en consecuencia, la capacidad de unión y retención del mismo -, e interfiere con el transporte y unión de calcio en el sarcolema y en el retículo sarcoplásmico, tanto en este órgano como en el músculo esquelético (Dolara et al., 1976; Chohan et al., 1979, 1980; Read et al., 1980).

En la retina, la taurina estimula específicamente el transporte de calcio dependiente de ATP en los discos de segmentos externos de fotorreceptores (Kuo y Miki, 1980), mientras que en fracciones subcelulares inhibe su transporte, principalmente en aquéllas que contienen los segmentos externos y células del epitelio pigmentario (Pasantas-Morales et al., 1979).

No obstante todos los resultados arriba resumidos, los mecanismos moleculares de la interacción calcio-taurina no se han identificado y continúan siendo objeto de investigación.

#### Actividad Anticonvulsiva

Las primeras correlaciones que se establecieron entre la taurina y actividad epileptogénica fueron descritas por Van Gelder y colaboradores, quienes reportaron una disminución significativa de algunos aminoácidos en el foco epileptogénico con respecto al tejido perifocal en la corteza de gatos (Van Gelder, 1972). Los aminoácidos modificados incluían a la taurina, el GABA, la glicina y los ácidos aspártico y glutámico. Poco después, el mismo grupo reportaba resultados análogos en pacientes epilépticos (Van gelder et al., 1972). Posteriormente, fueron descritas sucesivamente reducciones en la concentración de taurina, GABA y ácido glutámico en una amplia gama de modelos experimentales de epilepsias (Kayama, 1972; Craig y Hartman, 1973; Joseph y Emson, 1976; Emson, 1978). Además, se reportó que en focos epileptogénicos inducidos por aplicación tópica de cobalto y penicilina en gatos, la taurina es el primer aminoácido cuyas concentraciones disminuyen significativamente -precediendo cambios similares del GABA- aún antes del inicio de la actividad convulsiva (Mutani et al., 1977). Sin embargo, es necesario mencionar que algunas observaciones en muestras de autopsias o en biopsias de focos epileptogénicos en humanos, han dado resultados contradictorios en el contenido de aminoácidos, incluyendo los valores de taurina (Perry et al., 1975; Van Gelder et al., 1976).

Como consecuencia de estos primeros reportes, se iniciaron los estudios tendientes a revertir la actividad convulsiva por la administración de taurina exógena. Los resultados fueron exitosos en una amplia gama de modelos de la más diversa etiología, incluyendo los ya mencionados inducidos por aplicación directa de penicilina y cobalto, aquéllos producidos por administración sistémica de 4-aminopiridina y estrógenos, e incluso en modelos de epilepsias con un componente genético en donde las crisis

convulsivas son disparadas por factores externos, como son las convulsiones audiogénicas en ratas y las desencadenadas por estimulación luminosa intermitente en monos *Papio papio*. Sin embargo, existen asimismo, numerosos reportes de resultados negativos en donde la taurina no modificó ninguno de los parámetros cuantificados, electroencefalográficos o motores (Joseph y Emson, 1976; Wada et al., 1975; Laird y Huxtable, 1976; Burningham et al., 1978).

Los resultados anteriores, condujeron a la evaluación de la actividad anticonvulsiva de la taurina en epilepsias humanas. Varios estudios se han realizado en ese sentido, la mayoría de los cuales se han realizados en pacientes refractarios al tratamiento y sin interrumpir el plan terapéutico al cual se hallaban sujetos (Barbeau y Donaldson, 1973; 1974; Bergamini et al., 1974; Penetta et al., 1977; Pasantés-Morales et al., 1981).

En todos los casos, en cada estudio se han obtenido resultados exitosos en diferentes grados, así como negativos, existiendo una gran variabilidad de respuesta entre pacientes aún con dosis de taurina similares o idénticas. En los casos de mejoría, usualmente los signos clínicos se atenuaron más rápidamente y en mayor grado que la actividad encefalográfica, la cual también se vió positivamente modificada (Penetta et al., 1977; König et al., 1977).

Al parecer, uno de los problemas centrales que limita considerablemente los efectos benéficos de la taurina como anticonvulsivo, radica en su limitada capacidad para arribar al cerebro debido a las restricciones de la barrera hematoencefálica que bloquea eficientemente su acceso al sistema nervioso central (SNC). Así, mientras que la inyección intraventricular de taurina en modelos animales de epilepsia, con frecuencia resulta en una mejoría del cuadro anormal, cuando es introducida por vía intraperitoneal, intravenosa u oral, los resultados han sido en ocasiones completamente inefectivos (Ambrosi et al., 1974; Laird y Huxtable, 1976).

De manera similar a otras acciones de la taurina, los mecanismos moleculares de sus efectos anticonvulsivo están poco aclarados. No obstante, se han sugerido algunas explicaciones posibles de sus efectos. Entre ellas, se ha propuesto que la reversión en el patrón anormal de aminoácidos en distintos modelos de epilepsias, pudiese constituir la base de sus efectos (van Gelder, 1972; Mutani et al., 1975; Carruthers-Jones y van Gelder, 1978). Con estas bases se propuso que la disminución en los niveles de taurina en alguna población neuronal, podría producir un incremento generalizado de la excitabilidad neuronal, propiciando así el inicio de actividad convulsiva.

Se ha observado en particular que la taurina disminuye los niveles anormalmente elevados de glutamina en el líquido cefalorraquídeo (Airaksinen et al., 1980), por lo que se ha sugerido que sus acciones pueden darse a través del mantenimiento de un balance adecuado entre las concentraciones de ácido

glutámico y glutamina en los compartimientos neuronal y glial (van Gelder, 1978).

Otras explicaciones incluyen el efecto depresor generalizado de la taurina sobre la actividad neuronal, por medio de sus acciones sobre la conductancia membranal al cloro, así como su relación con los flujos de calcio (Izumi et al., 1975; Okamoto et al., 1976).

La amplia variedad de modelos de epilepsias contra los cuales la taurina ha probado su capacidad de aminorar y revertir la actividad neuronal y/o motora anómala, que implican una gama etiológica muy diversa, sugieren que la acción del aminoácido se sitúa en un proceso básico de la fisiología celular, como el control de la excitabilidad neuronal o el amortiguamiento efectivo de los niveles extracelulares de potasio por las células gliales, niveles que durante un *status epilepticus* se pueden ver incrementados considerablemente.

Los efectos de la taurina en los sistemas de convulsiones estudiados, han sido evaluados desde un punto de vista farmacológico -administrando taurina exógena, con frecuencia en concentraciones muy elevadas, con el fin último de inferir una posible actividad fisiológica de sus pozas endógenas. Otros estudios se han diseñado con el propósito de establecer un vínculo más directo y funcional entre las pozas endógenas de taurina y el control de la excitabilidad neuronal. En todos los casos se ha utilizado un modelo de deficiencia en taurina en el cual es posible agotar parcialmente el contenido de taurina cerebral (Huxtable et al., 1979). Los resultados han demostrado un incremento en la susceptibilidad convulsiva frente a agentes como el pentilentetrazol (Bonhause et al., 1983), ácido cisteín sulfínico (Iwata et al., 1983) y la 4-aminopiridina (Pasantes-Morales et al., 1987). En este último modelo, tal efecto se expresa como una reducción en el umbral a convulsiones tónicas, una incidencia mayor de convulsiones clónicas, así como un índice de mortalidad postconvulsiva más elevado en los animales deficientes en taurina (Pasantes-Morales et al., 1987).

En otro estudio, se observó que no obstante que la deficiencia en taurina no modificó significativamente el umbral a convulsiones inducidas por descargas eléctricas, sí redujo la eficiencia antiepiléptica de compuestos como la fenitoína o el fenobarbital (Izumi et al., 1985). Todos estos resultados sugieren una participación de las pozas endógenas de taurina en el control de la excitabilidad neuronal; sin embargo resta aún por establecer un esquema claro de la naturaleza de este vínculo.

## 1.2 La Retina

### a) Organización morfológica y funcional.

La retina es un órgano que desde el punto de vista ontogenético, morfológico y funcional es considerado como una extensión del Sistema Nervioso Central (SNC). En ella, la taurina alcanza sus niveles de concentración más elevado en comparación con otros tejidos en los que se encuentra presente (Pasantes-Morales et al., 1972; Starr, 1973).

Las células que constituyen la retina son básicamente cinco tipos de neuronas y un tipo de célula glial. Entre las neuronas se encuentran los fotorreceptores, las células bipolares, las horizontales, las amacrinas y las células ganglionares. En primates y en algunos grupos de peces se ha descrito un sexto tipo neuronal denominado células interplexiformes (Dowling y Ehinger, 1975; Dowling et al., 1976).

La citoarquitectura de la retina se encuentra organizada en estratos claramente definidos y relativamente constantes en los distintos grupos de vertebrados. Así, los cuerpos celulares de las neuronas constituyen las capas nucleares externa, interna y de células ganglionares, mientras que las zonas donde se establecen sus contactos sinápticos conforman las capas plexiformes externa e interna (Fig. 2).

Los fotorreceptores se encuentran localizados en la zona más profunda de la cámara ocular, en estrecho contacto con el epitelio pigmentario; sus somas forman la capa nuclear externa y sus terminales establecen contacto sináptico de tipo químico con los procesos de las células horizontales y bipolares. Estas conexiones, junto con las establecidas entre las células horizontales entre sí, definen la capa plexiforme externa. Los cuerpos neuronales de las células horizontales, bipolares y amacrinas constituyen la capa nuclear interna, y sus contactos sinápticos con las células ganglionares y entre sí, conforman la capa plexiforme interna. En la zona más interna de la retina, se distribuye, en una banda discreta, el pericarion de las células ganglionares, cuyos axones constituyen el nervio óptico o vía aferente de la información visual hacia los centros de relevo e integración en el encéfalo.

Las principales células gliales de la retina son las células de Muller, cuyas dimensiones alcanzan casi el grosor total de la retina, extendiéndose desde la membrana limitante externa, a nivel de los segmentos externos de los fotorreceptores, hasta el humor vítreo en su zona más interna.

En la retina, la luz debe viajar a través de las capas más proximales antes de alcanzar los primeros elementos de la vía visual, es decir los fotorreceptores. De acuerdo a su morfología y fisiología, se distinguen dos tipos de células fotosensibles; los conos, que median la visión en color y son funcionales a intensidades de luz relativamente altas, y los bastones, los

\* A \*

\* B \*

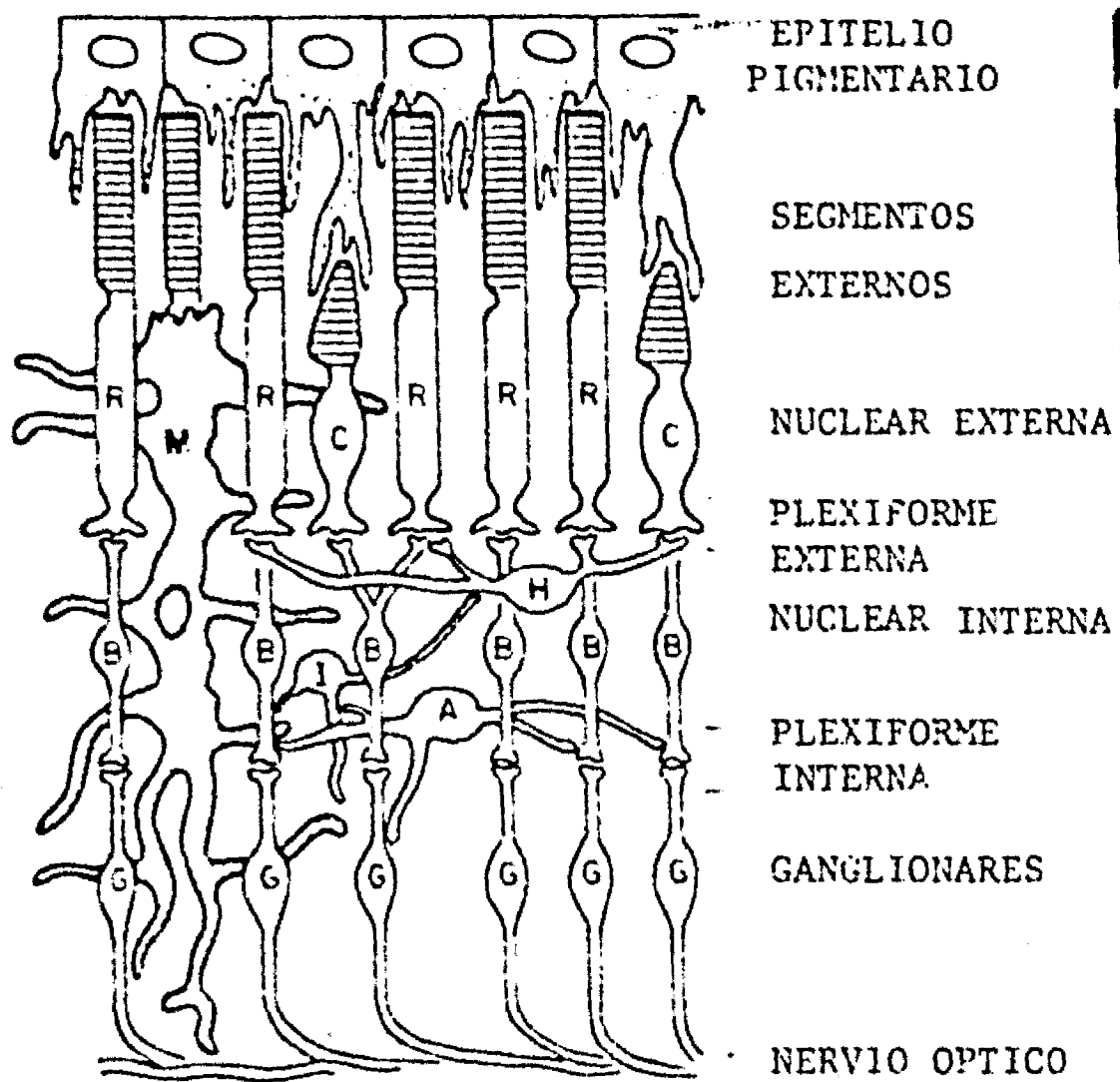


Fig. 2.- (A) Diagrama esquemático de una retina de Vertebrado. Se muestra la citoarquitectura organizada en bandas discretas las cuales se señalan. Se identifican los diferentes tipos celulares: Fotorreceptores, conos (C) y bastones (R); Células horizontales (H); Células bipolares (B); Células Ganglionares (G); Células interplexiformes (I); Célula de Muller (M).  
(B) Corte histológico de retina de sapo (*Xenopus laevis*) 641 X.



## CONDUCCIÓN DE LA INFORMACIÓN VISUAL

cuales son funcionales a bajas intensidades de iluminación y poseen una gran sensibilidad a la luz verde-azul (visión escotópica). Las diferencias entre las respuestas de ambos tipos de receptores se deben en parte al pigmento fotosensible utilizado por cada uno, así como al patrón de conexiones que establecen con el resto de elementos neuronales de la retina (Bailey, 1981). (Fig.3)

Los estudios basados en los registros intracelulares del fotorreceptor, han demostrado que durante la obscuridad la membrana plasmática de éste se mantiene despolarizada debido a una entrada continua de iones sodio a nivel del segmento externo, denominada "corriente oscura de sodio". Cuando la luz incide sobre los pigmentos fotosensibles alojados en los discos membranosos del segmento externo, dicha corriente se suprime y provoca que el fotorreceptor se hiperpolarice (Yoshikami y Hagins, 1973). La respuesta de los fotorreceptores ante la estimulación luminosa posee las características de un potencial sostenido inhibitorio, con una amplitud proporcional a la intensidad del estímulo. Estas respuestas nunca generan potenciales de acción. La reducción de la corriente oscura de sodio se produce primariamente por una disminución de los niveles de GMP cíclico, provocada por la actividad de una fosfodiesterasa activada durante la fotoexcitación (Farber y Brown, 1978).

Aunque los mecanismos finos que operan durante la fototransducción no se conocen con exactitud, se sabe que en obscuridad el estado despolarizado del fotorreceptor lleva a una liberación sostenida de un transmisor desde su terminal sináptica (Trifonov, 1968). En este sentido, se ha demostrado que en ausencia de luz, se produce un aumento considerable en el recambio de las vesículas sinápticas del receptor (Schasher et al., 1974), mientras que la presencia de iones  $Mg^{++}$ ,  $Co^{++}$ , y  $Mn^{++}$ , quienes bloquean la liberación de neurotransmisores por interacción con los flujos de calcio, producen una hiperpolarización de las células horizontales, semejante al efecto fisiológico de la luz (Dowling y Ripps, 1972).

Los resultados anteriores, además de probar la liberación tónica del transmisor proveniente de los fotorreceptores, sugieren la naturaleza excitadora del mismo. Otras evidencias en apoyo de tal proposición incluyen la observación de que, en presencia de luz y cuando disminuye la liberación del transmisor, ocurre un incremento en la resistencia de la membrana de las células bipolares y horizontales (Tomita, 1970; Nelson, 1973), implicando que durante la obscuridad la conductancia de las membranas postsinápticas es mayor, manteniéndose a su vez despolarizadas (Werblin, 1979).

La información visual traducida al lenguaje de potenciales propagados, es transmitida a lo largo de una vía neuronal central constituida por los fotorreceptores, las células bipolares y las ganglionares, siendo modulada en la intersección con los sistemas laterales de las neuronas inhibitorias: las células horizontales y las amacrinas. A estos niveles de la retina se establecen al

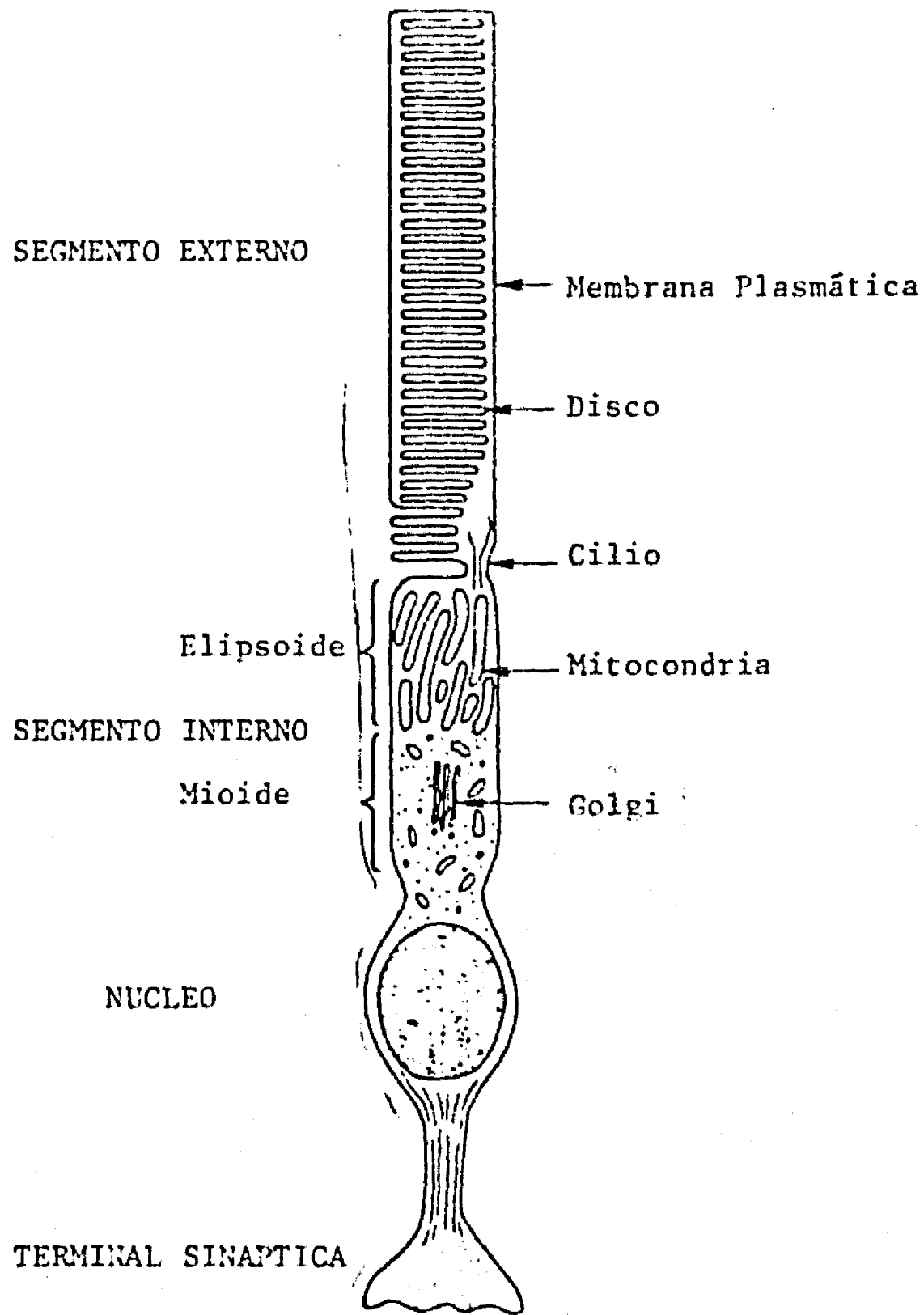


Fig. 3.- Diagrama esquemático de un fotorreceptor de Vertebrado (bastón).



7

menos dos tipos de circuitos locales, cada uno de los cuales puede ser activado por distintas características del estímulo visual, teniendo consecuentemente un efecto diferente y específico sobre la sensibilidad de la vía central.

El electroretinograma es el registro poblacional de la actividad eléctrica de la retina. Cuando la retina es estimulada por un destello luminoso, se produce una onda rápida y negativa, denominada onda "a", que corresponde a la hiperpolarización de los fotorreceptores; la onda "a" es seguida por una onda lenta, de mayor amplitud y signo opuesto llamada onda "b", la cual es originada en las capas internas de la retina. Con frecuencia es posible registrar una tercera deflexión tardía de curso temporal muy lento, que es dependiente de la presencia del epitelio pigmentario (Brown, 1968).

#### b) Taurina en la Retina

##### Presencia y distribución

La taurina es el componente mayoritario de la poza de aminoácidos libres en la retina de todas las especies hasta ahora estudiadas, constituyendo del 40 al 50% del contenido total. Los diferentes estudios acerca de la distribución de la taurina en la retina de varias especies, han coincidido en que dicho compuesto alcanza un máximo de concentración en el estrato de los fotorreceptores. En especies como la rata, el gato y el conejo, la taurina alcanza en esta zona celular valores particularmente elevados, del orden de 50 y hasta 80 nM, superando en todos los casos los valores estimados para las capas internas de la retina (Voaden et al., 1977; Cohen et al., 1973). Tales valores representan del 60 al 70% del contenido total del aminoácido en el tejido completo.

Estos resultados son consistentes con un estudio realizado por Orr y col. en la retina de cinco especies (1976). En dicha investigación se estableció que para todas las especies estudiadas, los valores más altos de concentración de taurina correspondían a las capas nuclear y plexiforme externas y a las correspondientes a los segmentos externos e internos también de los fotorreceptores (Orr et al., 1976). La distribución diferencial que muestra la taurina en los diferentes estratos de la retina, es sugerente de que las distintas poblaciones celulares, y aún algunas estructuras de éstas, podrían tener diferentes necesidades del aminoácido para ejercer normalmente su función.

##### Acciones de la taurina en la retina y funciones propuestas

Como se mencionó, la aplicación iontoforética de taurina provoca un efecto depresor de la actividad eléctrica sobre la mayoría de las neuronas del SNC, incluida la retina; en este órgano, dicho efecto se manifiesta particularmente sobre las

celulas de las capas internas, estimado por analisis del electroretinograma (Pasantes-Morales et al., 1973a). Estos resultados junto con otras características del comportamiento de la taurina, tales como su liberación en respuesta a estímulos despolarizantes y de ésta, su dependencia al calcio, así como la existencia de sistemas metabólicos de biosíntesis y de transporte con características de alta afinidad (Pasantes-Morales et al., 1977; Lombardini, 1977), han planteado la posibilidad de que dicho aminoácido pudiese participar en la fisiología de la retina como un neurotransmisor (Mandel et al., 1976). Sin embargo se han acumulado nuevas evidencias que, aunque no excluyen definitivamente tal posibilidad, han reorientado la investigación en el campo hacia la búsqueda de funciones alternativas, en particular de la poza de fotorreceptores, de los cuales se sugiere que liberan un transmisor excitador y en los que, como se ha mencionado, la taurina se encuentra preferencialmente concentrada.

#### Taurina en Fotorreceptores

A pesar de las elevadas concentraciones de taurina presentes en los fotorreceptores, su participación específica en los fenómenos que en ellos ocurren aún es incierta.

Los estudios acerca del efecto de la iluminación ambiental sobre el contenido de aminoácidos en la retina, han demostrado que sólo las pozas de algunos de ellos son afectadas por las condiciones de luz imperante. En la retina de pollos expuestos a luz continua, por ejemplo, el GABA y la glicina incrementan sus valores de concentración con respecto a los de animales mantenidos bajo un ciclo regular de oscuridad-luz o bajo oscuridad total. La taurina, por el contrario, se acumula en la retina de animales sometidos a oscuridad continua, lo cual sugiere una influencia directa de la luz sobre el tamaño de la poza retinal del aminoácido (Pasantes-Morales et al., 1973b).

En este sentido, se describió más adelante que un estímulo luminoso produce una liberación lenta de taurina de la retina aislada de pollo, seguida con trazadores radioactivos (Pasantes-Morales et al., 1979). Este mismo efecto fué descrito en la retina de la rata y del conejo, aunque con algunas diferencias cuantitativas entre las especies (Schmidt, 1978; Neal y Massey, 1980). La liberación de otros aminoácidos como el GABA y la glicina, no se afecta por la estimulación luminosa, al menos bajo las condiciones en las que se movilizan las pozas de taurina (Pasantes-Morales et al., 1979).

El movimiento de taurina en respuesta a la luz, disminuye de manera importante en ausencia de iones calcio en el medio extracelular; sin embargo, algunos agentes que se conoce que bloquean la entrada de calcio a las células, como el rojo de rutenio o el verapamil, no modifican la salida del aminoácido (López-Colomé et al., 1976). Por el contrario, la liberación de taurina inducida por un estímulo despolarizante es casi abatida

por completo por estos mismos agentes (López-Colomé et al., 1976), lo cual sugiere que ambos estímulos desencadenan respuestas que difieren en el mecanismo de liberación del aminoácido y probablemente del locus celular que les da origen.

La determinación del sitio de origen de la respuesta de la taurina a la luz, es una condición necesaria para el establecimiento de una correlación entre el fenómeno y un proceso fisiológico específico. En una primera aproximación, se observó que en una preparación de segmentos externos aislados de fotorreceptores (ROS) de rana, la estimulación luminosa produce un importante incremento en la salida de taurina, aunque con un curso temporal diferente al descrito para la retina completa (Salceda et al., 1977). Posteriormente se utilizó un modelo de degeneración selectiva con ácido kainico (Pasantes-Morales et al., 1981), el cual inyectado intracocularmente, produce una notable reducción en la población de varios tipos neuronales sin afectar importantemente a otros. En el caso del pollo en particular, a las dosis y tiempos establecidos en ese estudio, el efecto del tratamiento se manifestó como una disminución de más del 50% del espesor de la retina, siendo las capas más afectadas la plexiforme interna, reducida en un 80% aproximadamente, y la nuclear interna, afectada en más del 70% de su dimensión original (Pasantes-Morales et al., 1981).

En estas condiciones, la respuesta de la taurina a la luz no se vió modificada por el tratamiento con ácido kainico, indicando que ésta es originada por aquellas células insensibles al agente neurotóxico (Pasantes-Morales et al., 1981). Los estudios autorradiográficos acerca de la acumulación de taurina en la retina, han demostrado que la marca radioactiva se localiza principalmente en los fotorreceptores y en menor grado en las capas nuclear y plexiforme internas (Lake et al., 1977), un alto porcentaje de las cuales se afecta por el tratamiento con ácido kainico. Coyle y col. (1978) observaron que entre las distintas subpoblaciones de células amacrinas existe una sensibilidad diferencial al ácido kainico; aparentemente, las células GABAérgicas y colinérgicas son completamente destruidas por el agente neurotóxico, mientras que aquellas dopaminérgicas son menos sensibles. Luego entonces, las células amacrinas sobrevivientes al tratamiento probablemente son dopaminérgicas.

Este estudio (Pasantes-Morales et al., 1981), aunque basándose en evidencia indirecta, sugiere el estrato de fotorreceptores como posible sitio de origen de la liberación de taurina en respuesta a un estímulo luminoso. Finalmente, otra serie de estudios apuntan en ese mismo sentido al probarse que una gran variedad de agentes que se conoce que bloquean específicamente la transmisión sináptica mediada por glicina, GABA, acetil colina, ácido aspártico, ácido glutámico así como de algunas catecolaminas, no modifican sensiblemente la liberación de taurina inducida por luz, sugiriendo que esta respuesta no está mediada por relevos sinápticos (Salazar et al., 1986).

## La Taurina y el Concepto de Estabilizador Membranal

Uno de los problemas de tipo experimental que han dificultado la investigación orientada a establecer el papel fisiológico de la taurina, radica en la resistencia inherente a los organismos a modificar sus niveles endógenos del aminoácido. En efecto, distintas especies privadas de taurina y/o de sus precursores en la dieta, en un intento por disminuir sus niveles endógenos, manifiestan como respuesta una estimulación de su maquinaria biosintética paralela a una disminución en la tasa de excreción vía el sistema renal, sin detectarse modificaciones importantes en los niveles basales del compuesto (Hoopes, 1957; Sturman, 1973). Igualmente infructuosas han sido las suplementaciones excesivas de taurina por diferentes vías de administración en las que sólo se produce un incremento transitorio en la concentración circulante del aminoácido, la cual es restaurada rápidamente por una tasa de excreción incrementada (Sturman, 1973).

Queda claro entonces que la mayoría de los organismos hasta ahora estudiados poseen una amplia capacidad de control de sus niveles endógenos de taurina, los cuales son rigidamente mantenidos a través de modificaciones en sus tasas de síntesis y excreción. Semejante control, por otra parte, podría estar enfatizando la importancia que tiene el aminoácido en la fisiología de los tejidos, importancia que apenas recientemente se empieza a comprender.

### Estudios in vivo

El concepto de estabilizador de membranas, utilizado inicialmente para la taurina por Huxtable al describir sus efectos en corazón (Huxtable y Bressler, 1973), vino a ser retomado con base en los estudios en animales deficientes en taurina que se describen inmediatamente.

El primer diseño experimental exitoso en la modificación de los niveles tisulares de taurina in vivo, fué realizado por Hayes y colaboradores utilizando el gato como modelo de experimentación. Esta especie posee una pobre capacidad de síntesis del aminoácido y depende en gran medida del abastecimiento exógeno, a través de la dieta, para cubrir sus requerimientos de taurina. Como se ha mencionado, el tejido muscular es rico en taurina, por lo que el gato como carnívoro natural que es, obtiene suficiente taurina a través del alimento.

Un tratamiento con una dieta deficiente únicamente en taurina, suplementada con caseína como fuente protéica, produjo una disminución progresiva en los niveles endógenos tisulares de taurina sin afectar los de otros aminoácidos (Hayes et al., 1975a). Paralelamente a estos cambios, se detectaron alteraciones morfológicas en la retina, particularmente a nivel de los fotorreceptores; éstos mostraban hinchamiento y desorganización membranar en sus segmentos externos, así como vesiculación y

7

edema celular. En etapas posteriores al tratamiento, las alteraciones incluían al segmento interno y a la región nuclear de los fotorreceptores (Hayes et al., 1975a; Schmidt et al., 1976). Estos efectos correlacionaban satisfactoriamente con los registros de la actividad eléctrica, en donde se observó una disminución progresiva de la amplitud del electroretinograma, en particular de la onda "a" del mismo (Schmidt et al., 1977).

La prolongación del tratamiento por varios meses, condujo a una progresiva desestabilización del fotorreceptor, involucrando estructuras más internas y desembocando finalmente en la muerte celular y con ésta, la pérdida irreversible de la función visual (Hayes et al., 1975a; Schmidt et al., 1976).

Por otra parte, fué demostrado que si el tratamiento se suspendía en un estadio intermedio de la degeneración retinal, suplementándose la dieta con taurina, las alteraciones se detenían obteniéndose la reversión completa del efecto, lo cual no se observó al sustituir la taurina por otros aminoácidos, incluidos sus precursores en las rutas metabólicas más comunes de su biosíntesis (Hayes et al., 1975b).

Es importante demostrar que la relación entre el mantenimiento de concentraciones fisiológicas de taurina en la retina y la integridad de la estructura del fotorreceptor es un fenómeno general, que explicaría la presencia constante de concentraciones elevadas del aminoácido en los fotorreceptores de todas las especies, independientemente de los mecanismos de aprovisionamiento de taurina en la retina.

Las fuentes de abastecimiento de taurina para los diversos componentes celulares en la retina no se conocen con precisión. Esto es cierto en particular para la poza de los fotorreceptores, en donde la taurina se concentra preferencialmente en comparación con estratos más internos de la retina. Sin embargo, las enzimas responsables de la síntesis del aminoácido se encuentran ausentes de la banda de células fotosensibles y se localiza principalmente en regiones como las capas nuclear y plexiforme internas (Mathur et al., 1976).

Por el contrario, el transporte exógeno de taurina al interior celular al parecer ocurre principalmente en los fotorreceptores. En estudios autorradiográficos utilizando taurina radioactiva, ha sido posible observar como la densidad de marca acumulada por las células fotosensibles supera en todos los casos a la retenida en los estratos internos de la retina (Lake et al., 1977). La determinación de marca radioactiva en las distintas bandas celulares utilizando técnicas de microdissección, confirma los datos anteriores ampliándolos para especies como la rana, el gato y la rata (Kennedy y Voaden, 1974; Schmidt, 1981).

Por otra parte, los estudios tendientes a evaluar la capacidad de biosíntesis de taurina por la retina, ha mostrado que las enzimas involucradas en la ruta metabólica están presentes en ese tejido en varias especies (Pasantes-Morales et

al al., 1975; Macalione et al., 1980). Se ha demostrado incluso que en homogenizados de retina es posible observar la formación de taurina a partir de cisteína radiactiva (Nishima et al., 1983), lo cual constituye una evidencia directa de la funcionalidad de la vía. Sin embargo, tal capacidad de biosíntesis de novo del aminoácido, al parecer no es una característica de todos los tipos celulares de la retina. Así, se ha demostrado en retinas microdisecadas, que la DACS, enzima limitante de la vía, se encuentra predominantemente localizada, en las capas internas de la retina, mientras que está prácticamente ausente en el estrato que paradójicamente contiene la poza retinal mayor del aminoácido, es decir los fotorreceptores (Mathur et al., 1986).

Lo anterior ha sido confirmado en estudios en los que, después de obtener la DACS semipurificada, fue posible desarrollar anticuerpos contra ella. La distribución intrarretinal de la DACS estimada por inmunohistoquímica, mostró su predominancia en los estratos internos de la retina. En la retina de conejo, la enzima fue localizada principalmente en las capas nuclear interna y en la de células ganglionares mientras que en la retina de rata su predominancia se situó en la región plexiforme interna. En ambos casos, la DACS se observa, en forma inconsistente, en la región nuclear de los fotorreceptores, mientras que en regiones como los segmentos interno y externo de estas mismas células, la enzima está prácticamente ausente (Lin et al., 1985).

Estos resultados están en concordancia y se complementan con aquéllos obtenidos en retinas degeneradas, tanto genética como experimentalmente, en donde la ausencia del estrato de fotorreceptores disminuye considerablemente el transporte de taurina de alta afinidad (Kennedy y Voaden, 1974; Salceda et al., 1979). Luego entonces, el mantenimiento de la poza endógena de taurina en las células fotosensibles, parece depender fundamentalmente del aporte exógeno y no de la síntesis *in situ*.

El sistema de transporte de taurina en la retina es un proceso activo, dependiente de sodio y energía, que presenta dos componentes que difieren fundamentalmente en sus características cinéticas. Muestra un alto grado de especificidad y es inhibido únicamente por analogos estructurales estrechamente relacionados con su sustrato. Entre estos compuestos, se ha descrito que el guanidinoetanosulfonato (GES) inhibe eficientemente el transporte de taurina en terminales nerviosas aisladas (Hruska et al., 1978).

En un estudio posterior, y trabajando en un sistema *in vivo* con amplia capacidad de síntesis de taurina como es el de los tejidos de la rata, se demostró que un tratamiento crónico con GES es capaz de producir un decremento substancial en los niveles endógenos de taurina en diferentes órganos, incluyendo el corazón, el hígado, el pulmón y el músculo esquelético, así como varias regiones del SNC (Huxtable et al., 1979).



Esta estrategia experimental, que por otra parte no modifica los niveles de ningún otro aminoácido, ofrece un método sencillo de agotamiento de taurina en un sistema normalmente reactivo a modificar sus niveles tisulares del aminoácido.

Asimismo, se ha observado en diferentes especies la capacidad de la  $\beta$ -alanine (análogo carboxílico de la taurina) de movilizar las pozas intracelulares de taurina. La administración de  $\beta$ -alanine por vía intraperitoneal, oral o subcutánea en ratas, ratones y cobayos, produce un decremento en los niveles endógenos de taurina, encontrándose diferencias entre especies así como una sensibilidad diferencial al compuesto entre los distintos órganos estudiados. En la rata en particular, se ha encontrado que la administración intraperitoneal de  $\beta$ -alanina resulta ser la más efectiva para reducir las pozas de taurina, registrándose simultáneamente un importante incremento en la tasa de excreción del aminoácido (Shaffer y Kocsis, 1981).

Con estos antecedentes, se realizaron más adelante estudios tendientes a evaluar si las consecuencias deletéreas descritas en la retina de gatos deficientes en taurina pudiesen ocurrir también en una especie con amplia capacidad de síntesis del aminoácido, es decir, establecer en que medida los resultados observados en el gato correspondían a una respuesta específica o si pudiese ser un efecto aplicable a otras especies.

Así, en un estudio inicial con ratas tratadas con GES, se demostró que dicho tratamiento producía, paralelamente a una reducción parcial de las pozas retinales de taurina, alteraciones en el electroretinograma que consistían básicamente en un retraso en la aparición de las ondas "a" y "b", así como una disminución generalizada en la amplitud de las señales eléctricas. Dichos cambios se detectaron cuando el contenido del aminoácido en la retina había sido abatido en un 40% (Lake, 1982). Más adelante, y utilizando la misma estrategia experimental, pudo demostrarse una degeneración selectiva de los fotorreceptores cuya apariencia histopatológica, progresión temporal y espacial, reproducían estrechamente el cuadro degenerativo descrito en los gatos deficientes en taurina (Pasantés-Morales et al., 1983). Además, se demostró que la  $\beta$ -alanina produce también una reducción en los niveles del aminoácido en la retina, así como la desestabilización de los fotorreceptores (Pasantés-Morales et al., 1983). De estos resultados se obtuvo la conclusión de que cualquier estrategia experimental que conllevara una disminución de los niveles de taurina en los fotorreceptores, por debajo de un nivel crítico, daría lugar a su desestabilización, y sugería asimismo una participación de la taurina en el mantenimiento de la estructura y función de estas células.

#### Estudios in vitro

El concepto de estabilizador de membranas para la taurina, se vio apoyado más adelante por una serie de investigaciones que mostraban la capacidad estabilizante del aminoácido en una

preparación de segmentos externos aislados de fotorreceptores (ROS), expuestos a una gran variedad de condiciones experimentales que producen daño celular y cambios profundos en la alta organización morfológica de estas estructuras.

Inicialmente se describió que la exposición de los ROS a iluminación continua y de alta intensidad (5000 lux), causa la desorganización de estas estructuras de manera dependiente del tiempo de exposición. Después de 2 horas de iluminación, los ROS aparecen hinchados y han perdido su forma regular cilíndrica, mientras que los discos membranosos internos, altamente organizados en condiciones normales, se observan profundamente desorientados (Pasantés-Morales et al., 1981). La presencia de taurina en el medio de incubación, previene completamente el fenómeno, conservando íntegros los ROS e incluso preservándolos en mejores condiciones que aquellos mantenidos en la oscuridad (Pasantés-Morales et al., 1981).

Otra condición que produce daño celular a los fotorreceptores tanto in vivo como in vitro, es la exposición del tejido a sales de hierro u otros sistemas generadores de radicales libres. En la preparación de ROS aislados, la presencia de sulfato ferroso provoca en pocos minutos el hinchamiento de las estructuras fotosensibles y un alto grado de desorganización membranar, propiciando la formación de agregados de ROS profundamente alterados. La presencia de taurina por sí sola en el medio de incubación no previene la desestabilización; sin embargo en presencia de Zn, el cual por sí mismo tampoco muestra ningún efecto, se obtiene una efectiva protección de más del 50% de las estructuras en la preparación (Pasantés-Morales y Cruz, 1984).

Los mecanismos que subyacen al efecto protector de la taurina sobre la estructura de los fotorreceptores no son claros. De los dos sistemas previamente descritos, la exposición a luz y  $Fe^{++}$ , se ha propuesto que la peroxidación lipídica podría ser el proceso responsable de la alteración membranar. Con respecto al primero, se han establecido correlaciones en estudios in vivo, entre el daño producido por la luz y una reducción en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son el sustrato químico de las reacciones de lipoperoxidación, así como con la formación de radicales peróxido (Kagan et al., 1973; Wiegand et al., 1983). En la preparación de ROS aislados, la exposición a la luz produce un incremento en la tasa de peroxidación lipídica, el cual no se observa en presencia de taurina (Pasantés-Morales y Cruz, 1984), de donde se podría pensar que el compuesto pudiese estar actuando como un antioxidante; sin embargo, cuando se estimó la tasa de peroxidación en ROS expuestos a sulfato ferroso, la taurina no previno la reacción química, pero fue capaz de mantener estable la estructura (Pasantés-Morales y Cruz, 1984).

De estos resultados se concluyó que, en el modelo de daño celular por luz, el proceso de lipoperoxidación ocurre posteriormente a la desestabilización estructural. Así, la



taurina previene la expresión de la reacción oxidativa al evitar la desestabilización estructural. Si se considera la elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados que componen las membranas de los ROS, se vuelve evidente el alto riesgo de ocurrencia de reacciones peroxidativas en estas estructuras en particular. Ya que estas reacciones son capaces de propagarse y autoperpetuarse, el evento que las dispara puede ser de muy diversa índole para posteriormente continuar con un curso temporal y características propias. La exposición a la luz podría entonces producir sólo un daño estructural inicial, que a su vez por liberación de fragmentos membranales o descompartmentalización de enzimas, por ejemplo, provocaría el desencadenamiento de reacciones de lipoperoxidación, acentuando el daño celular. La taurina prevendría estas reacciones al conferirle estabilidad a la estructura e impidiendo sus consecuencias secundarias. La capacidad de la taurina de estabilizar la estructura y organización de los ROS, sin ser capaz de prevenir la lipoperoxidación, es sugerida asimismo, por los resultados obtenidos en el modelo del sulfato ferroso.

Con respecto a los mecanismos que podrían subyacer a estos efectos de la taurina, se han considerado varias posibilidades. Es de interés, por ejemplo, que tanto en el modelo de exposición a la luz como a la sal de fierro, la presencia de albúmina tenga efectos similares a los de la taurina, es decir, en el primero proteja la estructura y evite la expresión de una tasa incrementada de peroxidación lipídica, mientras que en el segundo estabilice la estructura celular aún cuando la peroxidación ocurra. Muchos de los efectos de la albúmina en preparaciones *in vitro* se han atribuido a su capacidad de unir ácidos grasos libres, por lo que se considera que una liberación de ácidos grasos libres durante la fase inicial de desestabilización celular, podría ser el evento disparador de reacciones en cadena que explicarían las altas tasas de peroxidación lipídica. En este sentido, existe la posibilidad de que la protección por taurina ante la desestabilización celular y las reacciones peroxidativas, opere también vía una interacción con ácidos grasos libres. Tal interacción podría ocurrir indirectamente a través del transportador membranal del aminoácido, del cual se ha mostrado que es altamente susceptible a ser modificado al cambiar la composición de ácidos grasos poliinsaturados en células de retinoblastoma (Yorek et al., 1984).

Alternativamente, la taurina podría ejercer sus efectos por medio de modificaciones en la permeabilidad membranal a distintos iones. La taurina es capaz de modificar la unión de calcio a membranas de retina incrementando su transporte dependiente de ATP o bloqueando su permeabilidad pasiva (Pasantes-Morales et al., 1979; Pasantes-Morales, 1982). En ROS expuestos a iluminación continua en particular, la taurina disminuye la entrada de bicarbonato y agua propiciada por la luz. Por medio de estas acciones, la taurina podría controlar o modular la sobrecarga iónica y la entrada excesiva de agua en membranas alteradas, por ejemplo, por eventos de lipoperoxidación.

### 3.- TEJIDO MUSCULAR

El tejido muscular contiene, como todos los tejidos excitables, una poza abundante de taurina. Sin embargo, dada la masa total del tejido en comparación con la de otros, por ejemplo el tejido nervioso o el hepático, la poza muscular de taurina viene a ser en términos absolutos la mayor en los tejidos de los vertebrados. El contenido de taurina en cada uno de los tipos de tejido muscular es heterogéneo, ya que existe una gran diferencia entre el tejido cardíaco y la musculatura lisa o esquelética. En efecto, mientras que la poza cardíaca de taurina se ha estimado que oscila entre las distintas especies en una escala de 3 hasta 40 mM (Huxtable, 1976), el contenido del aminoácido en la musculatura esquelética se ha situado entre 1 y 10 mM (Jacobsen y Smith, 1968). La poza de taurina en la musculatura lisa ha sido la menos estudiada; sin embargo algunos reportes permiten situar la abundancia del aminoácido en un rango similar al del músculo esquelético.

Dada la notable abundancia de la taurina en el corazón de todas las especies estudiadas, en donde constituye en promedio el 50% del contenido total de aminoácidos libres, así como una diversidad de efectos farmacológicos del aminoácido sobre la función de este órgano, éste ha sido con mucho el sistema más estudiado.

#### Biosíntesis

Entre otras peculiaridades, se ha observado que en el corazón, la vía metabólica de biosíntesis de taurina, descrita y confirmada en diversos tejidos incluyendo el cerebro y el hígado, al parecer no es operante. En efecto, la ruta que involucra la oxidación de cisteína a ácido cisteín sulfínico y la posterior descarboxilación de éste a hipotaurina, no ha podido ser demostrada en el corazón. En particular, la actividad descarboxilante de la DACS, paso limitante de la vía, no fue detectada en el tejido cardíaco de la rata, el perro y el gato (Jacobsen y Smith, 1963; 1964), resultados confirmados más recientemente por otros autores (Yamaguchi et al., 1973).

Alternativamente, se ha propuesto que la cisteamina podría ser el intermediario entre la cisteína y la hipotaurina. La vía involucraría entonces la descarboxilación de la cisteína a cisteamina así como la posterior oxidación de ésta para dar hipotaurina. Desde el inicio de los '60 era conocido que se podía obtener taurina marcada inyectando cisteamina radioactiva. Posteriormente, se demostró en el riñón la presencia de una enzima, la cisteamina dioxigenasa, capaz de convertir cisteamina en hipotaurina (Cavallini et al., 1961). La actividad de esta enzima fue más tarde encontrada en el corazón de varias especies (Dupré y De Marco, 1964; Huxtable y Bressler, 1976).

Actualmente se considera que en el corazón el precursor de la taurina es la cisteamina, teniendo a la hipotaurina como intermediario, sin embargo no es claro aún el origen metabólico

de la cisteamina. En este sentido, se considera muy probable que ésta provenga de la cisteína, aunque tal transformación no fuese directa e involucrase varios pasos intermedios (Huxtable y Bressler, 1976).

#### Modificaciones de la Poza Cardíaca de Taurina

Como ocurre en otros tejidos, la poza cardíaca de taurina es en extremo resistente a modificar su tamaño ante una diversidad de condiciones experimentales. Una dieta deficiente en vitamina B6 (cofactor de la mayoría de las descarboxilasas) o una suplementada con taurina, no modifican substancialmente la poza del aminoácido (Sturman, 1973); tampoco lo hacen el ayuno (Awapara, 1956), la hipofisectomía, la adrenalectomía, la castración o la administración de estrógenos (Huxtable, 1976).

En contraste, los niveles de taurina se incrementan durante una falla cardíaca congestiva, tanto inducida experimentalmente en perros (Peterson et al., 1973) como en pacientes fallecidos por esa causa (Huxtable y Bressler, 1974 a,b). La falla cardíaca congestiva es caracterizada por una hipertrofia muscular, que en el caso del modelo experimental provoca un incremento en peso del tejido de un 100%; en estas condiciones, la concentración de taurina se ve incrementada casi 4 veces (Peterson et al., 1973). Mas aún, en ratas hipertensas, en donde también se observa una hipertrofia cardíaca mediana, ocurre un incremento en el contenido de taurina del 100%, sin detectarse cambio en las pozas de otros tejidos (Huxtable y Bressler, 1974a).

Otros estudios han sugerido también una correlación entre cambios en la masa muscular cardíaca y el contenido de taurina, incluyendo atrofia cardíaca y una reducción neta en el contenido del aminoácido, aunque se ha concluido que los cambios en la poza de taurina siempre son secundarios a los de la masa muscular (Huxtable, 1976), es decir, serían procesos secundarios al proceso patológico, más que causales.

#### Efectos Fisiológicos y Farmacológicos

La taurina administrada in vivo no provoca per se ningún cambio en el ritmo cardíaco, la presión sanguínea o sobre algún parámetro del electrocardiograma. Sin embargo, en distintas condiciones patológicas es capaz de prevenir y aún revertir algunas expresiones cardíacas anormales. Así, una dosis de 0.5 mmolas/Kg en perros, previene el desarrollo de contracciones ventriculares tempranas inducidas por digoxina o epinefrina, mientras que a dosis mayores puede revertir las ya existentes (Read y Welty, 1963). Además, la presencia de taurina previene la pérdida de potasio inducida por estos mismos agentes en rebanadas de corazón de perro, así como en el corazón completo expuesto a epinefrina (Read y Welty, 1963).

Este efecto modulador de la taurina sobre la salida de potasio, se ha observado también en el corazón aislado de cobayo, donde perfusión del órgano con un medio libre del catión,

provoca su pérdida celular y fibrilación. Ambos efectos son revertidos o bloqueados en presencia de taurina (Chazov et al., 1974).

Otras acciones del aminoácido sobre el sistema cardiovascular incluyen un efecto antiarrítmico, hipotensivo, un inotropismo positivo a bajas concentraciones de calcio y un inotropismo negativo a concentraciones elevadas del catión, potenciación del inotropismo producido por digitalidos, así como acciones protectoras o estabilizantes de la función cardíaca, como el antagonismo a la llamada "paradoja del calcio" o el retraso en el desarrollo de lesiones cardiomiopáticas por sobrecarga de calcio (Revisado en Huxtable y Sebring, 1983).

El efecto inotrópico positivo de la taurina ha sido observado en diferentes especies y es al parecer, dependiente de la concentración extracelular de calcio libre. En efecto, en el corazón de cobayo, una concentración baja de calcio (0.5 mM), provoca inotropismo negativo, el cual se ve aminorado en presencia de taurina (Dietrich y Diacono, 1971). Otros estudios demuestran más directamente esta relación: en corazones aislados de sapo y cobayo así como en secciones longitudinales de ventrículo de cobayo, se ha observado claramente que el efecto inotrópico de la taurina se ve acentuado cuando la concentración de calcio externo se reduce de 2.5 a 0.5 mM (Read et al., 1980; Khatter et al., 1981; Franconi et al., 1982 a,b), con una relación inversamente proporcional entre la intensidad de la fuerza desarrollada y la concentración del catión (Khatter et al., 1981).

Por otra parte, diversos reportes coinciden en que la taurina potencia el inotropismo positivo inducido por digitalidos como la ouabaina (Dietrich y Diacono, 1971) o la estrofantina-K (Guidotti et al., 1971) en el corazón de cobayo. Asimismo, se han descrito efectos similares en el corazón de perros (Dolara et al., 1973; Chazov, et al., 1974). En estos estudios, cuando se ha evaluado la participación del calcio, de nuevo se observa que los efectos de la taurina se potencian a concentraciones bajas del catión.

El fenómeno conocido como la "paradoja del calcio" se refiere a las alteraciones que ocurren cuando se perfunde un corazón con un medio libre de calcio y se expone de nuevo a concentraciones fisiológicas del catión. En estas condiciones se produce un daño celular debido al parecer a un incremento en la permeabilidad de la membrana celular, lo cual provoca una sobrecarga neta de calcio. Sobre este fenómeno se ha reportado que, en secciones longitudinales de ventrículo de cobayo, la presencia de taurina durante el periodo de reperfusión incrementa la velocidad de recuperación de la fuerza contráctil (Dolara et al., 1978; Kramer et al., 1981).

Los distintos efectos cardiovasculares de la taurina han sido explicados, en mayor o menor medida, a través de sus acciones sobre los movimientos y/o unión de calcio a sitios

específicos en la membrana plasmática. Entre estos, Dolara describe en el corazón aislado de cobayo, que la presencia de taurina en un sistema de perfusión incrementa la salida de calcio así como su contenido celular (Dolara et al., 1973). Estos resultados fueron posteriormente confirmados en el corazón de la rata utilizando calcio radioactivo (Chubb y Huxtable, 1978), sugiriéndose que la taurina provoca un incremento en la tasa de transporte de calcio.

En cuanto a los estudios de unión de calcio a la membrana plasmática (plasmalema), los resultados sobre el efecto de la taurina son diversos y en ocasiones divergentes; sin embargo y de manera similar a lo observado en el inotropismo, la dirección del efecto (incremento o disminución de la unión) depende en gran medida de las concentraciones de calcio extracelular empleadas en cada estudio. Así, a concentraciones extracelulares bajas del catión ( $0.5 \text{ mM}$ ), la taurina incrementa la unión de calcio en membranas de corazón de sapo (Read et al., 1980), rata (Huxtable y Sebring, 1983), hamster (Welty y Welty, 1981) y cobayo (Khatler, 1981), mientras que a concentraciones fisiológicas y mayores del catión ( $2.5 \text{ mM}$ ), el efecto es el inverso en rata (Azari y Huxtable, 1980) y en cobayo (Franconi et al., 1982c).

La conclusión general de estos y otros estudios ha sido que, en términos generales, la taurina se comporta como un amortiguador de los flujos de calcio al interior celular, incrementándolos cuando la concentración del catión es baja, y disminuyéndolos en la situación opuesta. En esta propuesta quedarían englobados los datos referentes a los efectos de la taurina sobre la contractilidad cardíaca en todos los casos en los que este parámetro aumenta o disminuye como consecuencia de cambios en la disponibilidad de calcio para la contracción. Dichos cambios han sido alcanzados por la manipulación directa de su concentración extracelular o mediante condiciones que interieren con su transporte. En este orden de ideas, se ha postulado también que la taurina podría modular la concentración de calcio interno libre a través de sus efectos sobre las pozas intracelulares del catión, básicamente la mitocondria, ya que los estudios encaminados a estimar la influencia de la taurina sobre la capacidad y tasa de unión de calcio al retículo sarcoplásmico, han arrojado resultados negativos (Remtulla et al., 1978; Khatler et al., 1981; Welty y Welty, 1981).

#### Las Pozas Musculares no Cardíacas

En la actualidad no hay duda acerca del elevado contenido de taurina en la musculatura lisa y esquelética, ni de que estos músculos posean los mecanismos requeridos para su síntesis; sin embargo los estudios acerca de la participación fisiológica y efectos farmacológicos del aminoácido son aún escasos y dispersos.

A nivel de la actividad eléctrica muscular, se ha reportado que la taurina produce una hiperpolarización del potencial de

membrana en preparaciones de rata y rana (Gruener et al., 1976). Estos efectos del aminoácido son similares a los encontrados en el axón de calamar, en un estudio comparativo en esta preparación y en la de músculo de vertebrado (Gruener et al., 1976). La taurina incrementa la conductancia de la membrana a los iones Cl y K, expresándose esto último como una reducción en la duración del potencial de acción, en particular sobre su fase repolarizante. Los autores proponen que un mecanismo iónico similar podría ocurrir en el músculo, en donde la hiperpolarización sería consecuencia del incremento en la conductancia a Cl (Gruener et al., 1976).

Dichos estudios fueron recientemente confirmados y ampliados utilizando la misma preparación, el músculo extensor digitorum longus de la rata. En efecto, Conte-Camerino y col. (1987) reportan el efecto hiperpolarizante de la taurina y además, como ocurre en el axón, la reducción en el curso temporal del potencial de acción y el incremento en la conductancia al Cl. Estos autores detectaron efectos muy pequeños (incrementos) sobre los flujos de potasio. De hecho, el bloqueo específico de canales de cloro en la misma preparación, antagoniza el efecto hiperpolarizante de la taurina (Bryant et al., 1985), sustentando la interpretación inicial de un incremento en el transporte de cloro como factor causal de la hiperpolarización.

En el retículo sarcoplásmico, se ha observado que la taurina, a diferencia de lo que ocurre en corazón, incrementa la capacidad total y tasa de unión de calcio (Huxtable y Bressler, 1973), además de disminuir la tasa de pérdida de transporte del catión producido por la fosfolipasa-C. Estos datos, aunados a la observación de que la presencia de taurina mejora el rendimiento y preservación de la preparación, condujo a los autores a proponer por vez primera una acción para la taurina como estabilizador membranal (Huxtable y Bressler, 1973).

Por otra parte, se mencionaba ya que en el músculo distrófico de pollo ocurre un incremento considerable en el contenido de taurina (Wilson et al., 1965). Dado que en el músculo distrófico se presenta miotonía, posteriormente se evaluaron los efectos de la taurina sobre esta última patología en humanos, encontrándose que un tratamiento oral con el aminoácido aliviaba considerablemente el cuadro miotónico (Durelli et al., 1983).



## 2.- TEJIDO HEPATICO

Desde el punto de vista del contenido y utilización de taurina, el hígado presenta una serie de peculiaridades. Primeramente, su contenido de taurina es alto, similar al de tejidos como el músculo esquelético o el tejido nervioso, y en su interior se realiza una de las tasas más altas de biosíntesis del aminoácido (Spaeth y Schneider, 1974). En el hígado se ha demostrado la presencia y transformación de cada uno de los intermediarios de la vía metabólica de síntesis de la taurina a partir de la cisteína, incluyendo la identificación de las enzimas involucradas prácticamente en cada caso. De hecho, durante la década de los 50 y aún de los 60, el hígado fue el tejido más utilizado para la dilucidación detallada de la vía, siendo posteriormente confirmada o rechazada en otros tejidos. Así, en el hígado se ha identificado la presencia de cisteína, ácido cisteín sulfínico, ácido cystéico, hipotaurina y taurina, así como las actividades enzimáticas de oxidación de la cisteína y de descarboxilación de los ácidos cystéico y cisteín sulfínico (Véase para este particular la revisión de J. Awapara, 1976).

En segundo lugar, una parte de la poza hepática alimenta lo que constituye la única fracción de taurina en mamíferos que es transformada metabólicamente y más aún, de la cual se ha establecido con suficiente claridad su participación en un proceso fisiológico. En efecto, aparte de la orina, la única vía de excreción de taurina con significancia fisiológica conocida lo constituye la bilis, en donde la taurina se encuentra conjugada con los ácidos biliares en un proceso que ocurre en el hígado (Jacobsen y Smith, 1968). Posteriormente, tales conjugados son vertidos en la luz intestinal permitiendo la absorción de los distintos tipos de lípidos y grasas debido a sus propiedades emulsificantes. Finalmente, el hígado es el primer órgano que tiene acceso a la taurina proveniente de la dieta, vía la vena portal.

Los ácidos biliares más comunes y normalmente presentes en la bilis de diversas especies incluyendo a el hombre son los ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico y litocólico. Todas las especies hasta ahora estudiadas conjugan sus ácidos biliares con taurina, con glicina o con ambos (Haslewood y Wootton, 1950) para dar lugar a los ácidos taurocólico, glicocólico, taurodeoxicólico, glicodeoxicólico, etc.

Usualmente el patrón de conjugación se expresa como el cociente entre los conjugados con taurina y los conjugados con glicina, o más simplemente como el porcentaje de conjugados con taurina (%T). Este patrón de conjugación varía de especie a especie y es influido por los hábitos alimenticios. Así, mientras que los ácidos biliares se conjugan exclusivamente con taurina en la mayoría de los peces, anfibios y reptiles (Haslewood, 1967; Schertsen, 1971), los hervívoros como el conejo, son predominantemente glico-conjugantes (%T 5%) (Spaeth y Schneider, 1976), los carnívoros como el gato son tauro-conjugantes (%T 95%) (Rentshler et al., 1986), mientras que los omnívoros como la

rata y el hombre pueden oscilar entre los dos extremos, por lo que el XT puede incrementarse o disminuir dependiendo básicamente de la disponibilidad de taurina para la conjugación.

El caso del gato viene a ser único ya que no sólo es una especie casi puramente tauroconjugante, sino que además, su capacidad para conjugar sus ácidos biliares con glicina es muy limitada cuando el aporte de taurina exógeno es cancelado experimentalmente con una dieta libre del aminoácido, no es capaz de modificar su patrón de conjugación hacia una predominancia de glico-conjugados (Stipanuk et al., 1987), por lo que tiene una demanda constante de taurina que continuamente gasta la poza del aminoácido. Aunado a lo anterior, la baja capacidad de síntesis de novo de taurina inherente a esta especie (Sturman y Hayes, 1980) la particularmente sensible a la privación dietaria de taurina, y posiblemente la más susceptible a sufrir una reducción de sus pozas endógenas por la simple manipulación de su dieta.

Entre las especies con capacidad para modular su patrón de conjugación, se ha documentado en la rata y el hombre que el cociente de conjugados taurina/glicina es gobernado fundamentalmente por la concentración de taurina en el hígado, o más precisamente, por la disponibilidad de taurina hepática para la conjugación. En efecto, los estudios de Hardison y col. han sustentado lo anterior al demostrar en ensayos in vitro en el hígado de rata que la reducción de la poza de taurina por infusión del tejido con ácidos biliares, provoca un cambio paralelo en el patrón de conjugación tendiente a la predominancia de glico-conjugados (Hardison et al., 1977). En el caso del hombre ocurriría algo similar. En pacientes con obstrucción biliar, no hay pérdida de taurina hepática y sus concentraciones son por tanto muy elevadas. En estas condiciones, la predominancia de tauro-conjugados rebasa aún aquella del grupo control (Hardison, 1978). Más aún, en pacientes con fistula biliar, la administración de taurina oral provoca un incremento de XT de 9 a 50% en 7 horas con una dosis de 1 gr de taurina, y de 10 a 33% en 6 horas con sólo 250 mg del aminoácido (Hardison, 1978), mientras que en individuos normales, la administración de dosis repetidas de taurina producen un cambio promedio del XT de un 33% inicial a un 66% después de recibir el aminoácido (Hardison, 1982).

Otros estudios en el hombre acerca del efecto de la disponibilidad de taurina sobre el patrón de conjugación de ácidos biliares, se llevaron a cabo en niños prematuros alimentados con fórmulas lácteas artificiales libres de taurina, en comparación con niños alimentados con leche materna. Debe mencionarse aquí, que la leche de todas las especies hasta ahora estudiadas incluyendo la leche humana, es rica en taurina, particularmente durante los primeros días de la lactancia (Gaul, 1982). El análisis de la composición de aminoácidos en plasma y orina, indicó que la mayoría de estos componentes se incrementaba o permanecía sin cambio en niños alimentados con las fórmulas artificiales, siendo la taurina la notable excepción (Rassin et al., 1977a,b). En efecto, las concentraciones de taurina en estos



infantes decrecía progresivamente con el tiempo, tanto en la orina como en el plasma (Gauli et al., 1977).

Este efecto de las fórmulas comerciales sobre el patrón plasmático de aminoácidos, se había demostrado también en niños sometidos a dietas parenterales totales libres de taurina (Rigo y Senterre, 1977). El requerimiento dietario de taurina en el hombre es congruente con la baja actividad hepática de la DACS, enzima limitante de la vía metabólica de biosíntesis, que se detecta tanto en el hígado fetal como en el adulto (Gauli et al., 1977).

Con estos antecedentes, posteriormente se estudió el patrón de conjugación de ácidos biliares en niños alimentados con dichas fórmulas cuyo contenido de taurina es mínimo o nulo, en comparación con aquéllos alimentados con leche materna. En esos estudios se observó que los niños alimentados con fórmulas libres de taurina cambiaban radicalmente su patrón de conjugación, pasando de ser predominantemente tauro-conjugantes a glico-conjugantes mientras que aquéllos alimentados con leche humana o con la misma fórmula que el primer grupo pero suplementada con la concentración de taurina hallada en la leche, no modificaban su patrón de conjugación, es decir, permanecían siendo esencialmente tauro-conjugantes (Brueton et al., 1978; Watkins et al., 1979).

Esta capacidad del hombre de modificar su patrón de conjugación de ácidos biliares, dependiendo del aporte dietario de taurina, podría representar un mecanismo de ahorro del aminoácido cuando el abastecimiento exógeno es deficiente.

Una de las mayores diferencias entre las especies tauro-conjugantes con aquéllas predominantemente glico-conjugantes, es la susceptibilidad de estos últimos a sufrir arteroesclerosis (Truswell et al., 1965). En efecto, el conejo, por ejemplo, es altamente susceptible a presentar una hiperlipidemia inducida por dietas altas en colesterol y ácidos grasos saturados, mientras que las especies tauro-conjugantes como el gato, el perro y la rata son en extremo resistentes a expresar tal condición. Al parecer, esta distinción está relacionada con la capacidad inherente a cada especie de metabolizar el colesterol. Así, los carnívoros, con su dieta alta en grasas y colesterol, se han adaptado metabólicamente para controlar la sobrecarga de lípidos, mientras que los herbívoros no han desarrollado tal capacidad.

La ventaja implícita que tendrían las especies tauro-conjugantes puede tener que ver con las propiedades emulsificantes de los conjugados con taurina, las cuales son superiores a sus equivalentes con glicina, debido en parte a que los primeros son más difícilmente desconjugados en el intestino al pH ácido comúnmente encontrado en la región proximal del mismo. Más aún, ya que los conjugados con taurina se encuentran totalmente ionizados al pH corporal, se previene su absorción pasiva, por lo que se mantiene una concentración intraluminal mayor, facilitando así su actividad emulsificante (Hofmann et al., 1967).

De los estudios arriba mencionados se desprende la influencia decisiva que la disponibilidad de taurina ejerce sobre el patrón de conjugación de ácidos biliares. Así, cuando el contenido de taurina en el hígado es alto (condición normal), se expresa una predominancia de conjugados biliares con este aminoácido, mientras que cuando su disponibilidad se reduce, por ejemplo al disminuir el aporte dietario, el patrón de conjugación tiende hacia la predominancia de glico-conjugados. El %T nunca llega a ser cero, pues aunque el aporte exógeno sea nulo siempre persiste el proveniente de la síntesis endógena. El caso del gato entonces, con una limitada capacidad de biosíntesis de taurina aunada a su reducida habilidad para formar glico-conjugados, representa una especie con una demanda externa obligada del aminoácido. Como ya ha sido mencionado, la privación de taurina en este animal, junto con la reducción de sus pozas tisulares, provoca profundas alteraciones en el tejido nervioso, especialmente en la retina.

## OBJETIVOS

Debido al requerimiento dietario de taurina inherente a el gato, esta especie constituye un modelo único en el que es posible provocar una reducción neta en las pozas tisulares de taurina. Tal condición permite no sólo evaluar la importancia del aminoácido en el desempeño de cada tejido, sino además, puede arrojar luz sobre su papel funcional en los diversos tejidos en los que esta presente.

Por otra parte, el estudio de diferentes tejidos bajo una condición de deficiencia en taurina podría permitir el establecimiento de homologías entre las respuestas de cada tejido, permitiendo así delinear funciones comunes o específicas de la taurina en cada caso. Para ello, en la presente investigación se decidió realizar estudios en gatos deficientes en taurina, en tres tejidos distintos: la retina, el músculo liso y el hígado; en el caso de la retina en particular, se realizaron estudios complementarios en un segundo modelo de deficiencia en taurina *in vivo*, la rata tratada con guanidinoetanosulfonato, así como en una preparación de segmentos externos aislados de fotorreceptores de rana.

Las investigaciones en la retina tienen como objetivos generales la comprensión del vínculo funcional entre la poza endógena de taurina y el mantenimiento de la estructura y función del fotorreceptor. Para ello, se eligieron dos estrategias: 1) la caracterización tanto del proceso degenerativo que ocurre *in vivo* como consecuencia de la depleción de las pozas de taurina, como 2) del efecto estabilizante *in vitro* de este aminoácido sobre la estructura del fotorreceptor cuando ésta es alterada por factores externos.

Las metas específicas de estos estudios incluyen:

a) Establecer en que medida el estado fotoactivado o inactivo del fotorreceptor determina la expresión del proceso degenerativo inherente a la deficiencia retinal de taurina.

b) Estimar el efecto que sobre dicho proceso pudiesen tener compuestos como el zinc, la Vitamina E y el GABA y la glicina, con propiedades de estabilizadores de membrana en otros sistemas, con el fin de caracterizar el mecanismo que subyace al requerimiento de taurina por el fotorreceptor.

c) En la preparación de Segmentos Externos aislados, caracterizar el efecto protector de la taurina cuando estas estructuras son desestabilizadas por exposición a la luz o a un medio libre de cationes divalentes, incluyendo la especificidad del efecto de la taurina y sus requerimientos iónicos.

En una segunda parte, los estudios realizados en dos preparaciones de músculo liso se orientaron a establecer el tipo de consecuencias, magnitud y características, que un estado de

deficiencia en taurina pudiese tener sobre este tejido en particular, lo cual hasta la fecha no ha sido documentado. Por ello, los objetivos se circunscribieron a evaluar las propiedades basales de contracción muscular así como su excitabilidad en respuesta a taurina y Acetil colina.

Finalmente, se exploró la posibilidad de que la deficiencia en taurina pudiese repercutir sobre los niveles circulantes y tisulares de colesterol, dada la dependencia que la absorción intestinal de este lípido muestra a la poza hepática de taurina. En estos estudios, una consideración central fué que algunas de las expresiones patológicas de la depleción tisular de taurina, por ejemplo, la degeneración de los fotorreceptores en la retina, fuesen debidas o acentuadas por un aporte anormal de colesterol a las células. Para ello, se cuantificaron los niveles plasmáticos de colesterol en gatos sometidos a una dieta deficiente en taurina durante 6 meses, así como la concentración del lípido en hígado al término de un año de tratamiento. A los 6 meses de tratamiento asimismo, se estimaron los niveles de colesterol en eritrocitos y su resistencia a un proceso lítico.

## MÉTODOS

La metodología y las técnicas, así como los materiales y preparaciones biológicas utilizadas en cada serie de estudios, se describen en la sección correspondiente de cada uno de los manuscritos anexos. Por ello, en el presente capítulo se detallan solamente los métodos utilizados en los estudios referentes al contenido de colesterol en hígado, eritrocitos y plasma de gatos deficientes en taurina, así como los concernientes a las medidas de lisis espontánea de eritrocitos de gatos bajo la misma condición.

El desarrollo de la colonia de gatos deficientes en taurina está descrito en la sección de métodos del manuscrito 3. Después de 6 meses de tratamiento con una dieta libre de taurina, y cuando la condición de deficiencia se había establecido, se obtuvieron muestras de 3 ml de sangre por punción cardíaca colectadas en recipientes con 0.3 ml de EDTA 10%. Pevio a la colección de las muestras, los animales fueron sedados ligeramente con una inyección intramuscular de hidrocioruro de xilacina (Rompum) a una dosis de 3 mg/Kg de peso. En todos los estudios aquí descritos, se obtuvieron simultáneamente muestras tanto de animales deficientes en taurina como de aquéllos suplementados con el aminoácido (0.5% de taurina en la dieta).

Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente a baja velocidad (3000 rpm) y temperatura ambiente durante 10 min, separándose la fase celular de la plasmática. Esta última se centrifugó a 9500 rpm por 25 min obteniéndose una fracción plasmática libre de células. Del sedimento inicial se recuperaron 1.5 ml de eritrocitos, los cuales constituyeron la preparación para los ensayos tanto de lisis celular espontánea como para las estimaciones de colesterol.

### Lisis Celular Espontánea en Eritrocitos

El método de cuantificación de lisis de eritrocitos se basa en la detección espectrofotométrica de la hemoglobina liberada al medio de incubación. Los resultados se expresan como el porcentaje de hemoglobina liberada en cada período de incubación con respecto al contenido total.

Se utilizó 1 ml de suspensión de eritrocitos, tanto de gatos suplementados como deficientes en taurina, la cual fué diluido con 2 ml de medio Krebs normal (MKN, Tabla 1) y dividido en dos partes iguales (duplicados). De cada muestra se tomaron alicuotas de 250  $\mu$ l (Tiempo cero, T=0), se diluyeron con 2 ml de MKN y centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min. Al término se recuperaron 1.5 ml del sobrenadante que se diluyó con 2 ml de agua. El resto de la fracción se incubó a 37 C con agitación suave y se tomaron alicuotas por duplicado de 250  $\mu$ l a los 60 (T=60) y 120 min (T=120), las cuales fueron procesadas igual que la muestra T=0.

TABLA 1  
COMPOSICION IONICA DEL MEDIO KREBS NORMAL

COMPUESTO	CONCENTRACION ( mM )
Na Cl	118
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
K Cl	5.6
Ca Cl <sub>2</sub>	2.5
Mg SO <sub>4</sub>	1.1
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	25
Glucosa	5

Al final de la incubación se colectaron 25 ul de cada muestra y se lizaron las células agregando 2 ml de agua, seguido de agitación vigorosa. Posteriormente, las fracciones se centrifugaron a 9000 rpm por 15 min y se recuperaron 100 ul del sobrenadante. De estas últimas alícuotas se obtuvo el valor de lisis total contra la cual se refieren los resultados de  $T=0$ ,  $t=60$  y  $T=120$ . Todas las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-6, a 410 nm.

### **Niveles de Colesterol en Plasma, Eritrocitos e Hígado**

En los estudios en plasma aquí descritos, se analizaron muestras de los animales bajo dos condiciones de alimentación: en ayuno y sin ayuno. En ambos casos, los animales fueron sometidos primeramente a un periodo de ayuno durante 12 hrs, al término del cual se tomaron las muestras para la condición de ayuno, mientras que para la segunda condición, los animales fueron alimentados con su dieta normal, tomándose las muestras de 4 a 6 hrs después. Para los estudios de lisis celular en eritrocitos, las muestras utilizadas fueron colectadas siempre bajo la condición de no ayuno.

### **Plasma y Eritrocitos**

Los lípidos de 500 ul de plasma o de la suspensión de eritrocitos obtenidos como arriba se describe, se extrajeron con 9 volúmenes de cloroformo:metanol (2:1) y un lavado de un medio del volumen de extracción inicial. Estos extractos se evaporaron a sequedad con Nitrógeno y se resuspendieron en un volumen conocido de acetona:etanol (1:1).

La concentración de colesterol se determinó por un ensayo enzimático (Allain et al., 1974), cuyos reactivos incluyen: Fenol, 6 mmolas/l; 4-amino-antipirina, 1.6 mmolas/l; Peroxidasa, 4 000 U/l; Colesterol oxidasa, 150 U/l y Colesterol esterasa, 120 U/l. Brevemente, el método consiste en: 1) la hidrólisis de los ésteres de colesterol por la colesterol esterasa; 2) la oxidación enzimática del lípido por la colesterol oxidasa con la producción de peróxido de hidrógeno, y 3) la formación del compuesto colorido quinoneimina a partir de los reactantes 4-aminoantipirina, fenol y peróxido de hidrógeno, en una reacción catalizada por la peroxidasa.

Las alícuotas de cada extracto se incubaron por duplicado con 200 ul de la mezcla de reactivos mencionados durante 15 min a 37 C con agitación suave. Paralelamente, se desarrollaron muestras blanco, libres de tejido, así como una curva patrón con concentraciones crecientes de colesterol. Al término de la incubación se midió la absorbancia en cada tubo a 500 nm en un espectrofotómetro Beckman, mod. DU-6.



**Higado**

Al tiempo de sacrificio de los animales, después de un año de tratamiento con dieta deficiente en taurina, se obtuvieron muestras de hígado, tanto de animales control como deficientes en taurina.

Las muestras se homogenizaron con 3 volúmenes respecto al peso del tejido, de solución salina isotónica. Posteriormente, se realizó una extracción lipídica con 20 volúmenes de éter dietílico, el cual fué pesado, evaporado a sequedad con N y pesado de nuevo para obtener el peso total de la fracción de lípidos en el tejido. A continuación el extracto se resuspendió en un volumen conocido de éter dietílico y se realizó el ensayo de contenido de colesterol, siguiendo el procedimiento antes descrito.

## Effect of Light Deprivation on the ERG Responses of Taurine-Deficient Rats

O. QUESADA, A. PICONES AND H. PASANTES-MORALES\*

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510 México D.F., México*

(Received 19 October 1986 and accepted 22 May 1987)

The decrease of taurine levels in the retina of taurine-depleted rats treated with guanidinoethane sulfonate (GES) reduced the amplitude of the a- and b-waves of the electroretinogram, registered as a function of the log relative intensity stimulus. The effect was observed either in rats exposed to a light-darkness cycle or to continuous darkness; this effect was somewhat more pronounced in retinas of rats exposed to light. Values obtained from the Naka-Rushton equation for the  $V \propto I$  curve for the a-wave showed that the half-saturating intensity was unchanged but  $V_{max}$  was decreased by GES treatment. Implicit times for the b-wave delayed whereas those for the a-wave were unaffected by the treatment.

*Key words:* taurine; ERG; light deprivation.

### 1. Introduction

The presence of physiological levels of taurine in the retina seems essential for the normal function of retinal cells. Retinal taurine depletion results in a marked decrease in the amplitude of the a- and b-waves of the electroretinogram (ERG), which are eventually abolished (Schmidt, Berson and Hayes, 1976). Severe damage of photoreceptor structure is also observed, characterized by disruption and twisting of the otherwise highly ordered structure of the discs membranes. Vesiculation and swelling of both outer and inner segments of photoreceptors also characterizes the pathology of taurine deficiency. At the advanced stages, the photoreceptor layer is shortened and cell loss occurs (Hayes, Rabin and Berson, 1975).

These effects of taurine deficiency have been demonstrated in cats and monkeys fed a taurine-free diet (Rabin, Hayes and Berson, 1973; Sturman, Wan, Wisniewski and Neuringer, 1984), and in rats treated with a structural analogue of taurine, guanidinoethane sulfonate (GES) (Lake, 1982; Pasantes-Morales, Quesada, Cárabez and Huxtable, 1983), which is a potent blocker of taurine transport and decreases the taurine retinal content by 50-70%.

The mechanism involved in the retinal degeneration induced by taurine deficiency is still unclear. It is also unknown whether this deficiency affects the cells directly, regardless of their functional state or if the damage is associated with the physiological stimulation of light. Photoreceptors are, among the retinal cells, those being more affected by taurine deficiency. Taurine may be required by these cells for a function linked to photoexcitation or conversely, taurine may be playing a more direct role in membrane structures, unrelated to the photoexcitation process. In order to clarify this point, in the present work we examined the effect of light deprivation on the ERG of rats made taurine deficient by treatment with GES.

\* To whom all correspondence should be addressed.

## 2. Materials and Methods

### *Animal treatment*

Albino rats (Wistar strain) were used in this study. GES was synthesized by the procedure of Huxtable, Laird and Lippincott (1979) and administered to pregnant rats in the drinking water (1%) a few days before delivery, as described by Lake (1982). All animals were kept in the dark during weaning and then half of the rats of one litter were maintained in standardized lighting conditions of 12 hr light and 12 hr dark. The dark room was provided with a double door, ventilated and with controlled temperature. A dim red light was turned on for feeding and cleaning the animals. Dark conditions were continuously monitored with an undeveloped film in the dark room, replaced every week.

### *ERG recording*

For the ERG recording, rats were dark-adapted (light group) for 1-3 hr, anesthetized by i.p. injection of sodium pentobarbital ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$  body wt) and fixed with a stereotaxic dispositive. The eye was made to protrude by drawing the eyelids apart with adhesive tape and the pupil fully dilated by local application of 1% atropine. All procedures were carried out under dim red light. The ERG was recorded differentially. The recording electrode was a saline-filled glass pipette mounting in an Ag-AgCl holder provided with a black cotton wick in contact with the corneal surface. The reference and ground electrodes were steel needles inserted subcutaneously behind the eye and between the ears, respectively.

The voltage signal was fed to a Grass P511 d.c. amplifier (bandpass 0.1-300 Hz) monitored continuously with a HP 1201B oscilloscope and stored in a magnetic tape with a HP 3000 FM instrument recorder. The stimulus (10  $\mu\text{sec}$  diffuse white flash) was provided by a Grass PS 22 photostimulator positioned at 0.25 m from the animal, attenuated by neutral density filters (Kodak Wratten No. 90) and calibrated with a Gossen Lunasix 3 photometer at 50-Hz flash frequency. The intensity of flashes at this frequency, monitored by the voltage output of a photocell, was found to remain constant. The response to different light stimulus intensity relationship ( $V$ -log  $I$  curve) was determined in an increasing intensity sequence of flashes at 1-min intervals. Typically, the entire range of intensities was run twice and both response curves appeared the same.

### *Taurine analysis*

The concentration of taurine in the retina was determined at the end of treatment (7-9 weeks) in perchloric acid extracts as previously described (Pasantes-Morales, Klethi, Urban and Mandel, 1972; Pasantes-Morales, Dominguez, Campomanes and Pacheco, 1986).

### *Data analysis*

$V$ -log  $I$  curves were fitted to the equation (1) by means of the Simplex algorithm according to Cacci and Cacheris (1984).

## 3. Results

Taurine levels in rats kept in the dark were higher in both untreated and GES-treated animals, as compared with groups exposed to light (Fig. 1). GES treatment decreased taurine levels by 40% in rats exposed to a light-darkness cycle and by 39% in rats kept in darkness (Fig. 1).

Representative ERG responses obtained from the different groups of animals are shown in Fig. 2. The GES-treated animals showed a marked decrease in the a- and b-wave amplitudes, regardless of the lighting condition. The effect of GES seems less pronounced in rats kept in the dark as compared with those exposed to light-darkness.

Figure 3 shows the graphical representation of the b-wave amplitude as a function of the log relative intensity (log  $I$ ) in controls and GES-treated rats, in conditions of

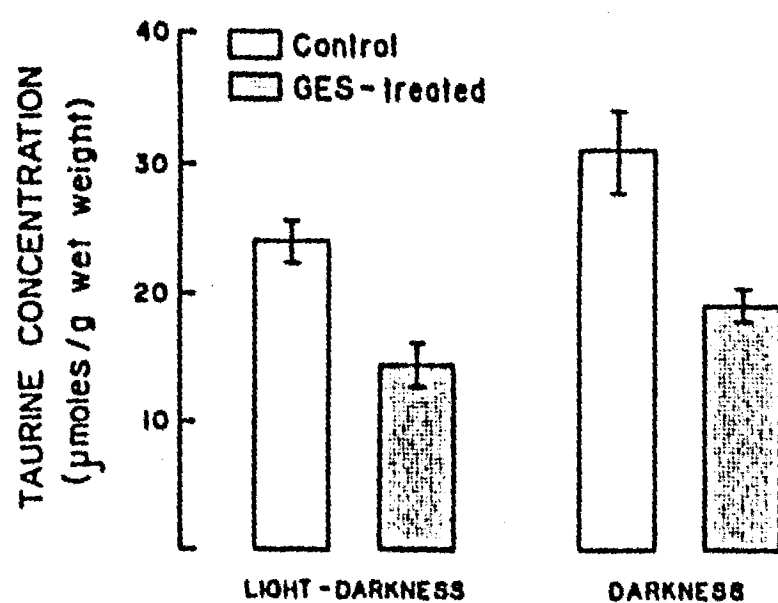


FIG. 1. Taurine concentration in the retina of rats exposed to a light-darkness cycle or to continuous darkness, treated or untreated with GES. Results are the mean  $\pm$  S.E.M. of the number of animals indicated in parenthesis.  $P < 0.001$ , GES vs. control, light-darkness;  $P < 0.01$ , GES vs. control, darkness;  $P < 0.05$ , controls, light-darkness vs. darkness and GES-treated, light-darkness vs. darkness.

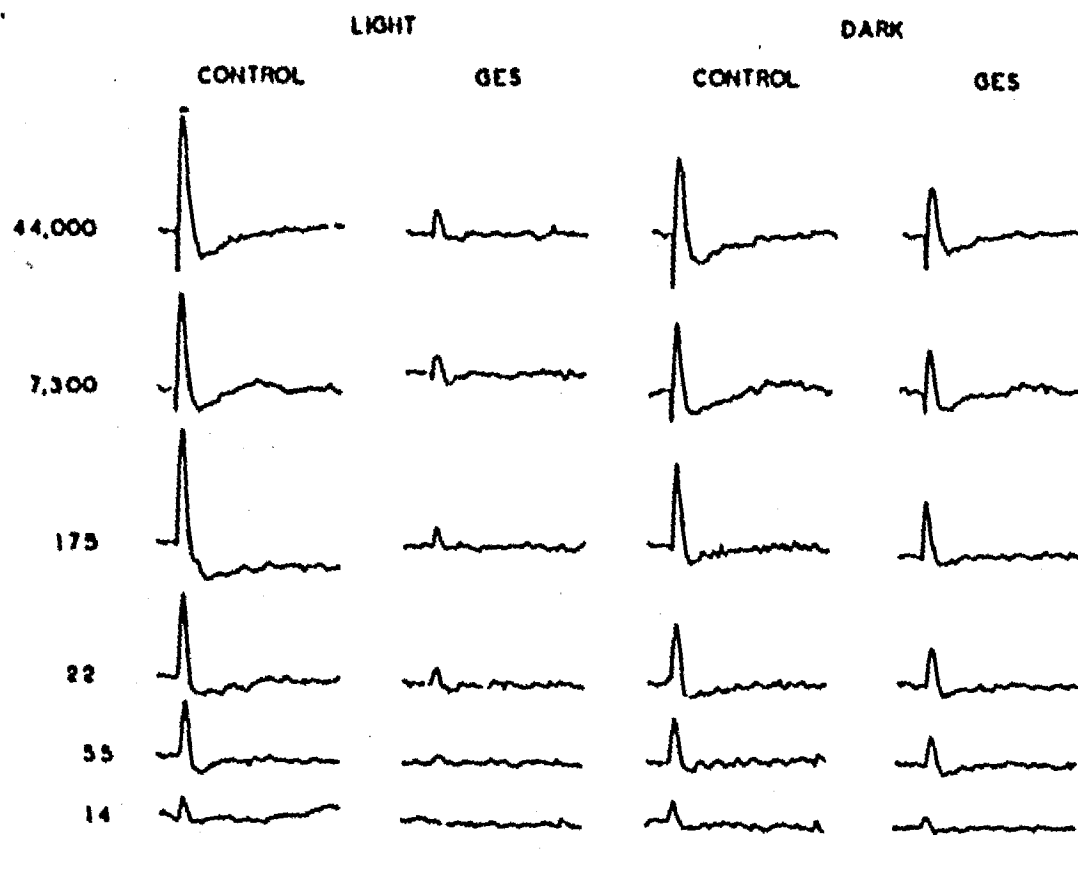


FIG. 2. Typical records of the ERG from rats treated with GES or from normal control rats exposed to different illumination conditions. The stimulus intensity in lx is indicated by the numbers on the left. The scale bars are 0.5 mV and 400 msec.

light-darkness or of continuous darkness. The response of untreated rats was not significantly affected by lighting conditions. GES-treated animals showed a marked decrease in the b-wave amplitude, which was more pronounced at high stimulus intensities (2-5 log units). The decrease in the light-exposed group was more pronounced, ranging from 75 to 85% whereas the decrease in the group reared in darkness was 50-60%. Figure 3 also shows that GES-treated animals exposed to light have a lower sensitivity, indicated by a higher stimulation threshold.

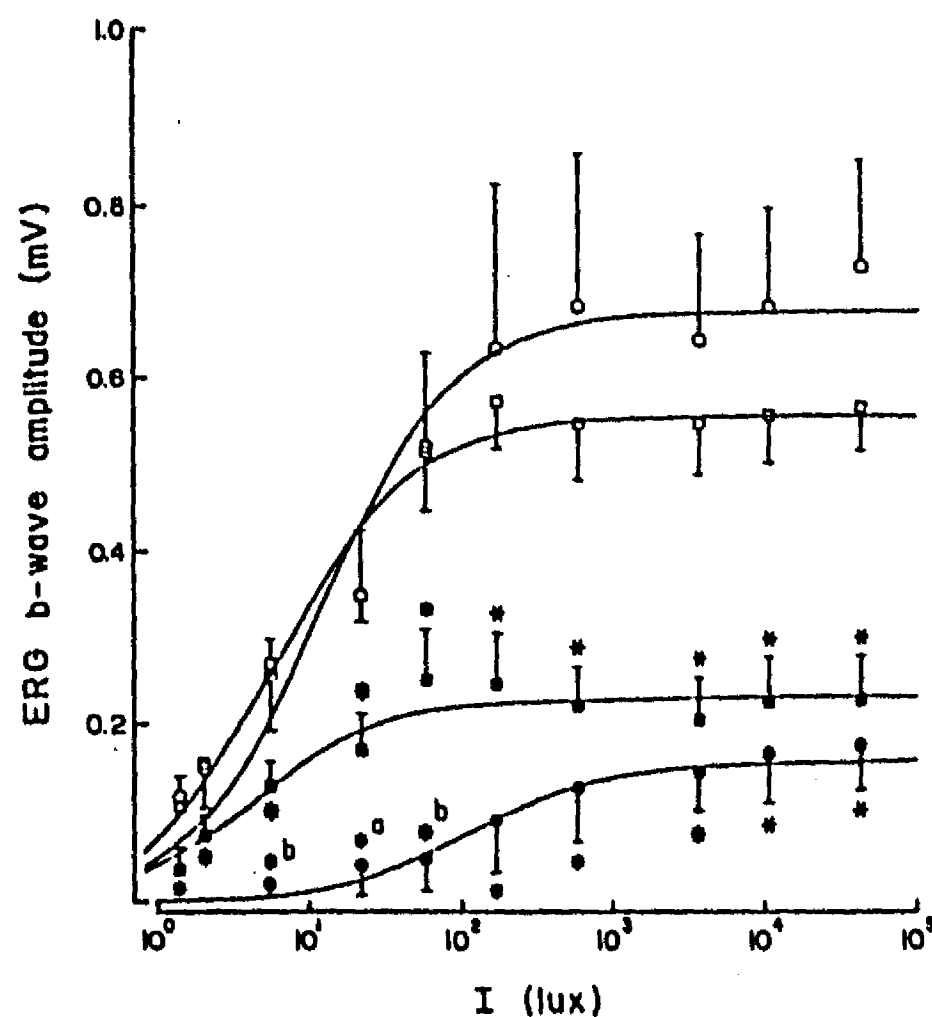


FIG. 3.  $V$ -log  $I$  curves for the ERG b-wave amplitude of the different rat groups. The symbols are the same as for Fig. 4. The continuous lines are equation (1) of the text fitted to the calculated mean values for each intensity of the four groups using the Simplex method (see text). In any case, the estimated error of the function was less than  $1.1 \times 10^{-2}$ . Statistical analysis was performed by Student's  $t$  test and symbols denote significance as follows: \*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; •,  $P < 0.02$ : GES-treated vs. their corresponding control, \* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.02$ : (GES-treated), darkness vs. light-darkness. Control darkness vs. light-darkness not statistically different.

Figure 4 describes the  $V$ -log  $I$  curve for the a-wave. The points fit a curve defined by the following relation, originally described for the S-potential by Naka and Rushton (1966) and which characterizes the vertebrate photoreceptor response (Baylor and Fuortes, 1970; Tomita, Kaneko, Murakami and Pautter, 1977):

$$V = V_{\max} \frac{I}{I + I_0}$$

where  $V$  represents the response amplitude,  $V_{\max}$  is the maximal response,  $I$  is the stimulus intensity and  $I_0$  is a constant representing the half-saturating intensity.

The a-wave amplitude at all stimulus intensities was lower in rats exposed to a light-darkness cycle than in light-deprived rats. GES treatment markedly decreased the response amplitude in both groups, although GES-treated rats exposed to light showed the lowest response (Fig. 4).  $I_0$  values were similar for all groups, whereas  $V_{\max}$  values were markedly lower in GES-treated animals in both light-exposed and dark-reared groups of rats (Fig. 4, Table 1). Again the light-exposed animals showed the lowest value (Table 1).

Implicit times, defined as the time interval between the stimulus onset and the peak

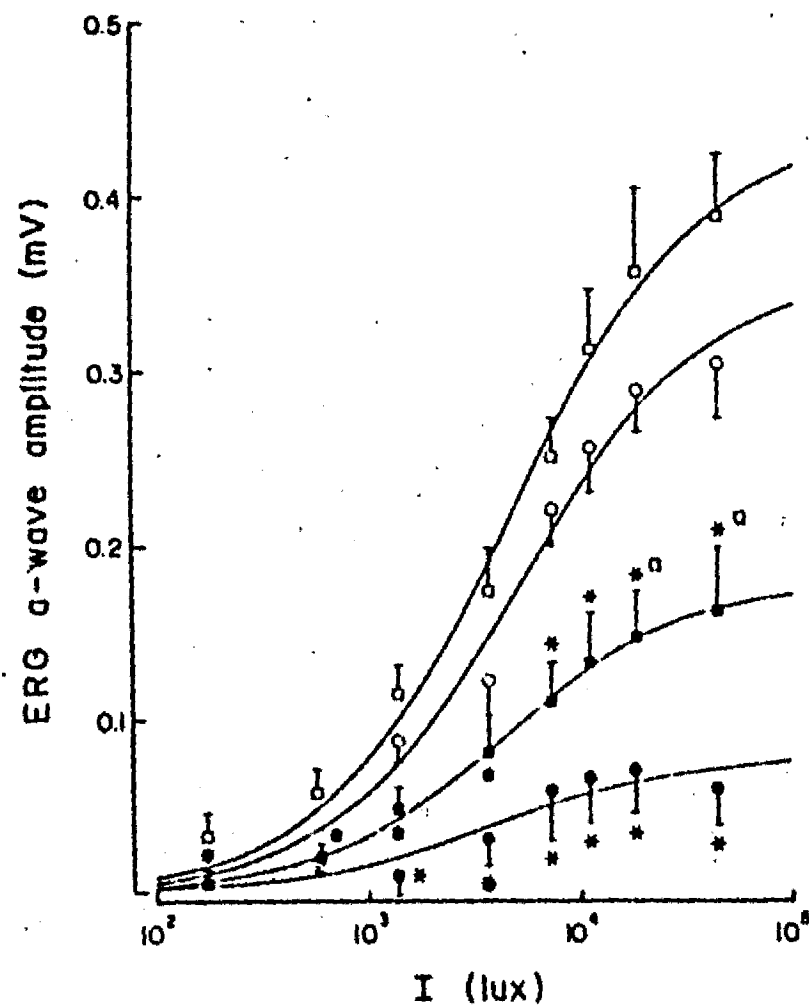


FIG. 4.  $V$ -log  $I$  curves for the ERG a-wave amplitude of the different rat groups. (□) Dark control, (○) light-dark control, (■) dark GES, (●) dark-light GES. The continuous lines are equation (1) of the text fitted to the calculated mean values for each intensity of the four groups using the Simplex method (see text). In all cases the estimated error of the function was less than  $7.1 \times 10^{-3}$ . The vertical bars are s.e.m.s for the represented means. Statistical analysis was performed by Student's  $t$  test. Symbols and superscripts denote significance as follows: \*,  $P < 0.001$ ; •,  $P < 0.02$ ; ••,  $P < 0.01$  for GES-treated vs. their corresponding control, •••,  $P < 0.05$ , for GES-treated, darkness vs. light-darkness. Control darkness vs. light-darkness not statistically different.

TABLE I

Numerical values for the equation parameters of the theoretical  $V$ -log  $I$  curve for the a-wave

	$V_{max}$	$I_0$ (lx)
Control		
Darkness	$400.7 \pm 45.0$	$4837.0 \pm 484.3$
Light	$357.1 \pm 32.0$	$5341.0 \pm 1505.3$
GES-treated		
Darkness	$178.4 \pm 32.8^*$	$4540.0 \pm 1412.3$
Light	$84.8 \pm 25.8^*$	$5238.8 \pm 1301.7$

The figures represent the average values for  $I_0$  and  $V_{max}$  calculated from the fitting of equation (1) (see text) by the Simplex method, of each individual experimental  $V$ -log  $I$  curve. The numerical values obtained differ slightly from those shown in Fig. 3. Results are the means  $\pm$  s. & m. of three to four animals for each group.

\* Significantly different of the corresponding controls  $P < 0.001$  (Student's  $t$  test).

TABLE II

*Implicit times of a-wave and b-wave of control and GES-treated rats at different light conditions.*

Condition	Implicit times (msec)	
	a-wave	b-wave
Control		
Light-darkness	22.4 ± 0.92	50.7 ± 5.23
Darkness	23.0 ± 0.51	51.4 ± 0.70
GES-treated		
Light-darkness	25.6 ± 2.01	73.3 ± 10.7*
Darkness	24.8 ± 1.18	60.7 ± 10.3†

Results are the means ± S.E.M. of 3-4 animals for each group.

\*  $P < 0.05$  compared with control light darkness.

†  $P < 0.05$  compared with control, darkness.

of a- and b-waves, were calculated. No significant changes were observed for the a-wave between the four groups of animals, whereas a delay for the b-wave was observed in the GES-treated rats (Table II).

#### 4. Discussion

GES treatment decreased taurine levels in the retina of rats reared in the dark and in those exposed to light-darkness by about the same extent. The concentration of taurine in the four groups of animals is somewhat different, however, since light deprivation resulted in all cases in higher retinal taurine levels. This observation confirms previous findings in chick and frog retina, in which prolonged maintenance in the dark increased taurine retinal levels (Pasantes-Morales, Kleithi, Ledig and Mandel, 1973; Nishimura, Ida and Kuriyama, 1983).

Lighting conditions also caused some differences in the ERG of control rats. The a-wave amplitude is lower in animals exposed to light as compared with those maintained in darkness. This may be due to some injury in photoreceptors caused by normal room light. The average cage illumination of our rats was about 13 ft-candles. Although this seems a mild illumination, it is well known that photoreceptors in albino rats are extremely sensitive to light damage (Noell, Walker, Kang and Berman, 1966). The b-wave amplitude also showed some tendency to be higher in the light-darkness group, at the high stimulus intensities. These differences were found statistically not significant and probably have no physiological meaning.

GES treatment and the associated taurine decrease in the retina resulted in a significant reduction in the a-wave amplitude. This decrease was more pronounced in the group exposed to light as compared with that kept in darkness. These results may be interpreted as if the absence of light were somewhat protecting photoreceptors from the deleterious effect of taurine deficiency. This interpretation entails some uncertainty, however, since the extent of taurine deficiency is not the same in all groups. Higher taurine levels are found in rats kept in the dark and this may contribute to the better response observed in these animals as compared with those



exposed to light, having lower taurine levels. In cats, Schmidt, Berson and Hayes (1976) found a close correlation between the time course of the fall in retinal taurine and the decrease of the a-wave amplitude. Although the mechanism of this requirement for taurine is unclear, it may be related to the protective effect of taurine on photoreceptor structure. From the  $V$ -log  $I$  curve, we observed that  $V_{max}$  was the parameter affected by light as well as by GES treatment, while  $I_0$  remains unchanged. This observation suggests that the sensitivity of the registered response is not significantly affected by illumination conditions or by GES treatment, but rather that the number of intact photoreceptors contributing to the response is lower in rats exposed to light and in taurine-deficient animals. This interpretation is in line with studies showing that photoreceptors in taurine-deficient animals show a loss of structural integrity in both their outer and inner segments (Hayes, Rabin and Berson, 1975; Pasantes-Morales, Quesada, Cárabez and Huxtable, 1983). Also, a certain morphologic damage of photoreceptors in albino rats is known to occur by exposure to physiological levels of illumination (Gorn and Kuwabara, 1967; Noell, Walker, Kang and Berman, 1966). From these results it is suggested that taurine participates in the generation of a normal functional response through its effects in preserving the structural integrity of photoreceptors.

An observation which might oppose this interpretation is that in cats, photoreceptor abnormalities are initially greatest in the area centralis even though reductions of retinal taurine concentration are similar throughout the central and peripheral retina (Hayes, Rabin and Berson, 1975). A possible explanation for this finding is that cones, which are maximally concentrated at the central retina, may be more sensitive to taurine deficiency. Also, in the monkey retina, cones are clearly more affected than rods by taurine deficiency (Sturman, Wan, Wisniewski and Neuringer, 1984).

The decrease of taurine retinal levels induced a marked reduction in the b-wave amplitude. This association has been previously documented in rats and cats (Schmidt, Berson and Hayes, 1976; Lake, 1982). In taurine-deficient cats, the decrease in b-wave amplitude also closely parallels the time course of the retinal taurine depletion (Schmidt, Berson and Hayes, 1976). As for the a-wave, the decrease in b-wave amplitude was more pronounced in rats exposed to light as compared with those kept in darkness.

The observed reduction in the b-wave amplitude might only follow the decrease of the a-wave amplitude. However, Schmidt, Berson and Hayes (1976) described a delay in b-wave implicit times, which was also observed in the present study. These observations raise the possibility that taurine deficiency is associated with alterations in the functioning of cells at the inner retina, particularly the Müller cells in which the b-wave probably originates. Taurine effects on Müller cells are not documented but a protective action of the amino acids on the cell membrane may be the basis of its requirement for the generation of a normal bioelectrical response. There is a large number of reports relating taurine with the maintenance of the structural and functional integrity of cell membranes, including an involvement in ionic permeabilities directly related to nerve cell excitability [see Pasantes-Morales and Cruz (1985) and Gaull, Pasantes-Morales and Wright, (1985) for reviews]. A drastic reduction in physiological taurine levels may then result in an alteration of normal cell membrane functioning.

In summary, the present results suggest that although taurine is necessary for the normal retinal function in processes occurring in either unstimulated or stimulated

cells, the possibility that physiological illumination exacerbates to some extent the deleterious effect of taurine deficiency cannot be ruled out.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Grants Nos EY02540-07 from NIH, PCSABNA 030776 from CONACYT and by funds of Programa Universitario de Investigación Clínica, UNAM. We thank Ms Yolanda Diaz de Castro for typing the manuscript.

#### REFERENCES

- Baylor, D. A. and Fuortes, M. G. (1970). Electrical responses of single cones in the retina of the turtle. *J. Physiol. (London)* **207**, 77-92.
- Caccci, M. S. and Cácheris, W. P. (1984). Fitting curves to data. The Simplex algorithm is the answer. *Byte* **9**, 340-62.
- Gaul, G. E., Pasantes-Morales, H. and Wright, C. E. (1985). Taurine in human nutrition: overview. In *Biological Actions and Clinical Perspectives* (Eds Oja, S. S., Ahtee, L., Kontro, P. and Poasonen, M. K.). Pp. 3-21. Alan R. Liss: New York.
- Gorn, R. A. and Kuwabara, T. (1967). Retinal damage by visible light: a physiological study. *Arch. Ophthalmol.* **77**, 115-19.
- Hayes, K. C., Rabin, A. R. and Berson, E. L. (1975). An ultrastructural study of nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats. *Am. J. Pathol.* **78**, 605-18.
- Huxtable, R. J., Laird, H. E. and Lippincott, S. E. (1970). The transport of taurine in the heart and the rapid depletion of tissue taurine content by guanidinoethyl sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 465-71.
- Lake, N. (1982). Is taurine an essential amino acid? *Retina* **2**, 261-4.
- Naka, K. and Rushton, W. A. (1966). S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). *J. Physiol. (London)* **185**, 587-99.
- Nishimura, C., Iida, S. and Kuriyama, K. (1983). Biosynthesis of taurine in frog retina. Differential effects of physiological light and  $\gamma$ -ray irradiation. In *Sulphur Amino Acids. Biochemical and Clinical Aspects* (Eds Kuriyama, K., Huxtable, R. J. and Iwata, H.). Pp. 233-50. Alan R. Liss: New York.
- Noell, W. K., Walker, U. S., Kang, B. S. and Berman, S. (1966). Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **5**, 400-6.
- Pasantes-Morales, H. and Cruz, C. (1985). Taurine: a physiological stabilizer of photoreceptor membranes. In *Taurine: Biological Aspects and Clinical Perspectives* (Eds Oja, S. S., Ahtee, L., Kontro, P. and Poasonen, M. K.). Pp. 371-81. Alan R. Liss: New York.
- Pasantes-Morales, H., Dominguez, L., Campomanes, M. A. and Pacheco, P. (1986). Retinal degeneration induced by taurine deficiency in light-deprived cats. *Exp. Eye Res.* **43**, 55-60.
- Pasantes-Morales, H., Kleithi, J., Ledig, M. and Mandel, P. (1973). Influence of light and dark on the free amino acids pattern of developing chick retina. *Brain Res.* **57**, 59-65.
- Pasantes-Morales, H., Kleithi, J., Urban, P. F. and Mandel, P. (1972). Free amino acids in chick and rat retina. *Brain Res.* **41**, 494-7.
- Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Cárabez, A. and Huxtable, R. J. (1983). Effect of the taurine transport antagonists, guanidino ethane sulfonate and  $\beta$ -alanine on the morphology of rat retina. *J. Neurosci. Res.* **9**, 135-43.
- Rabin, A. R., Hayes, K. C. and Berson, E. L. (1973). Cone and rod responses in nutritionally induced retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **12**, 694-704.
- Schmidt, S. Y., Berson, E. L. and Hayes, K. C. (1976). Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **15**, 47-52.
- Sturman, J. A., Wan, G. Y., Wisniewski, H. M. and Neuringer, M. D. (1984). Retinal degeneration in primates raised on a synthetic human infant formula. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2**, 124-0.
- Tomita, T., Kaneko, A., Murakami, M. and Pautter, E. L. (1977). Spectral response curves of single cones in the carp. *Vision Res.* **7**, 519-31.

TAURINE AND PHOTORECEPTOR STRUCTURE: BIOCHEMICAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL  
STUDIES

H. Pasantes-Morales, O. Quesada, A. Picones and R. López-Escalera

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma  
de México Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F., México

The retina has proved to be one of the most useful experimental models for studies on the physiological role of taurine in animal cells. Some features of the retina, including its large content of taurine, the association of taurine with photoreceptors and particularly, photoreceptor vulnerability to taurine deficiency, have importantly contributed to the advancement in the search for taurine function.

There is now little doubt that taurine is involved in the mechanisms preserving the structural and functional integrity of photoreceptor cells in the vertebrate retina. The supportive evidence comes from 1) in vivo experiments, in taurine deficient animals, in which structural and functional disturbances occur in the retina following a decrease in taurine retinal levels (5,6,11,16) and 2) in vitro experiments, in preparations of isolated photoreceptor outer segments (OS) where taurine affords protection against different experimental conditions causing a disruption of the highly organized structure of the OS (10,12). Although in none of these situations has the mechanism underlying the protective action of taurine been clarified, recent morphological, physiological and biochemical studies have provided further information contributing to our understanding of the role of taurine in photoreceptors.

In this review we present our own contributions on this aspect of taurine research together with a survey of recent progress in the area. In the first part, new results on taurine-deficient animals will be described. In the second part, recent observations of taurine effects on isolated OS will be presented and discussed.

IN VIVO STUDIES: TAURINE DEFICIENT ANIMALS

It is now firmly established that a decrease of taurine retinal levels beyond a critical point results in a retinal degeneration characterized by an alteration of the structural and functional integrity of photoreceptors and other retinal cells. The bioelectrical response, the electroretinogram (ERG), is markedly affected with reduced amplitudes in both the a-wave and the b-wave. The structural organization of photoreceptors is also severely disturbed. Swelling, disorganization and vesiculation of membranes in photoreceptors characterize the retinal degeneration subsequent to taurine retinal depletion. Eventually, cell death occurs resulting in blindness. The degenerative pattern associated with taurine deficiency has been described

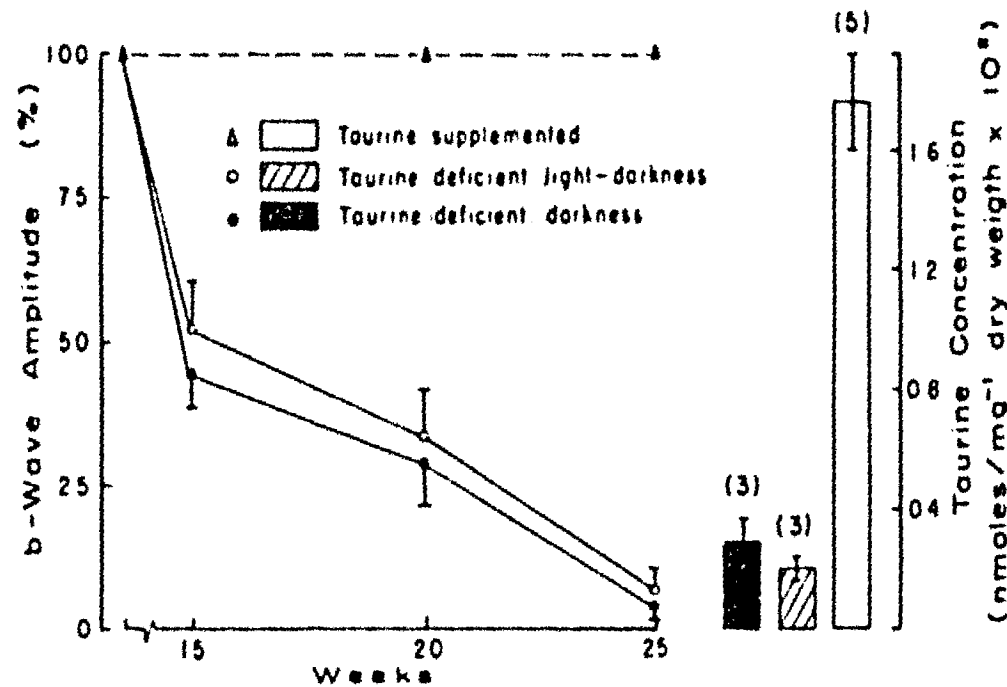


Fig. 1. The effect of light deprivation on taurine levels and on the b-wave amplitude in taurine deficient cats. Electroretinograms were recorded in the dark as described in Pasantes-Morales et al., (Exp. Eye Res., 43,55, 1986). Amplitudes of the b-wave are expressed as percentage of values in taurine-supplemented cats, exposed to a light-dark cycle. The b-wave amplitude in these cats averaged  $0.15 \pm 0.03$  mV. Taurine concentration was determined by high performance liquid chromatography of the fluorescent o-phthalaldehyde ethanol derivative, prepared in borate buffer. Results are the means  $\pm$  SEM of the number of determinations indicated in parenthesis.

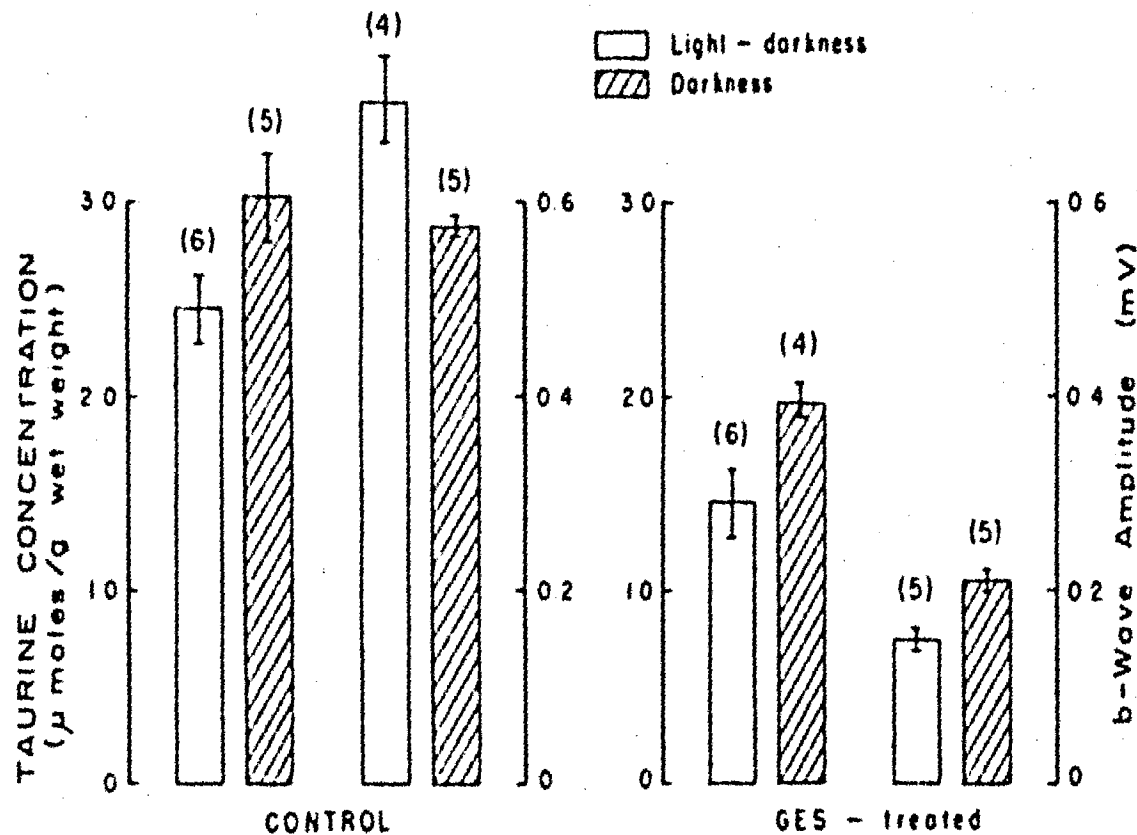


Fig. 2. The effect of light deprivation on taurine levels and on the b-wave amplitude in taurine-deficient rats. Rats were made taurine deficient by administration of GES and exposed to total darkness or to a 12 h light-dark cycle. The ERG was recorded as a function of light intensity. Bars in the figure represent the response at the highest light intensity utilized ( $10^5$  lux). Taurine retinal levels were determined as described in Fig. 1. Results are the means  $\pm$  SEM of the number of animals indicated in parenthesis.

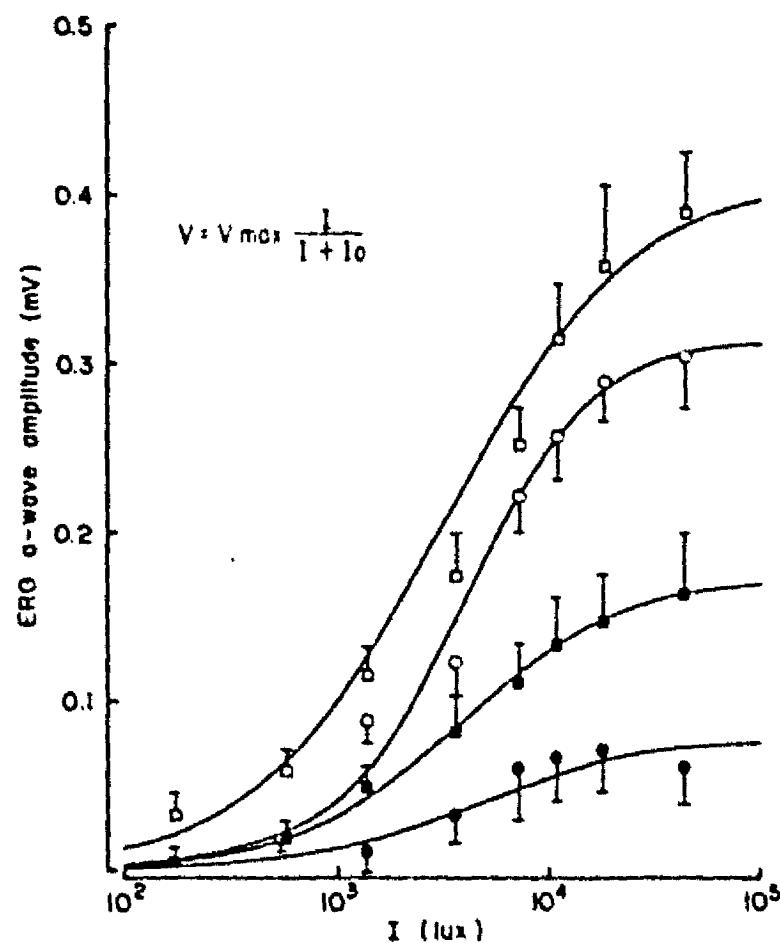


Fig. 3. The effect of light deprivation on the amplitude of the a-wave of the ERG as a function of stimulus intensity in taurine-deficient rats. The experimental conditions are as described in Fig. 2. Normal control, dark ( $\square$ ); control, light-dark ( $\circ$ ); GES-treated, dark ( $\blacksquare$ ); GES-treated, light-dark ( $\bullet$ ). The points are the means + SEM of 4 animals. The curves follow the equation shown in inset.

in several species, regardless of the experimental approach used to decrease taurine levels in the retina. Retinal degeneration is observed in cats fed a taurine-free diet (6), in monkeys fed a taurine deficient milk formula (16), in humans receiving long term total parenteral nutrition without taurine (5) and in rats treated with a taurine transport antagonist (11). This latter approach is useful in species in which, even though having a high ability to synthesize taurine, the endogenous pools of taurine in some organs or cells are maintained via an exogenous supply of taurine reaching the cell through active transport mechanisms.

#### The Effect of Light Deprivation

The mechanisms responsible for the retinal degeneration associated with taurine deficiency are still unclear. We have addressed this question by the study of the influence of illumination on the degenerative changes occurring in taurine-deficient cats and rats. By this approach it is possible to investigate whether the damage is associated with a functional state of the retina related to physiological levels of illumination or if it occurs even when the retina is unstimulated by light. The experiments were carried out in cats fed a taurine-free diet and in rats treated with the taurine antagonist, guanidinoethane sulfonate (GES). To examine the effect of light, animals were kept in a dark room provided with a double door, ventilated and with controlled temperature, with free access to food and water. A dim red light was turned on for about 10 min every day for feeding and cleaning the animals. Another group of animals was maintained under standardized lighting conditions of 12 h light and 12 h dark.

Light deprivation in cats did not modify the decrease of taurine in tissues produced by the dietary restriction. Taurine levels in the retina decreased more than 75% in both light-exposed and light-deprived cats. The amplitude of the b-wave of the ERG also decreased with an identical time course in the two groups (Fig. 1). Also, the structural damage in photoreceptors of taurine-deficient animals was the same, regardless of the lighting condition.

In rats treated with GES and exposed to different illumination conditions, it was observed that taurine levels of animals kept in the dark were higher in both untreated and GES-treated animals as compared with their respective controls exposed to light. After six weeks of light-deprivation, taurine levels in the retina were significantly higher than those in rats exposed to light (Fig. 2). GES treatment produced a similar decrease of about 40% in taurine levels in the two groups but the taurine content in animals kept in the dark were still higher than in GES-treated, light-exposed animals (Fig. 2). The amplitude of the b-wave of the ERG was markedly reduced in GES-treated rats, with similar values in the animals kept in the dark and in those exposed to light (Fig. 2).

Fig. 3 shows the amplitude of the a-wave at different light intensities. GES treatment markedly decreased the response amplitude, particularly at the high intensity stimulus. A close relationship between taurine levels in the retina and the a-wave amplitude was observed for the different groups. The best response was observed in the groups containing the highest taurine concentration, whereas the groups with lower taurine levels showed the poorest response. This was observed regardless of the lighting conditions of the different groups. The points in the  $V$ -log  $I$  graph fit a curve defined by the relation shown in Fig. 3, which characterizes the vertebrate photoreceptor response (1,8).  $V$  represents the response amplitude,  $V_{max}$  is the maximal response,  $I$  is the stimulus intensity and  $I_0$  is a constant representing the half-saturating intensity.  $I_0$  values obtained from the curves for the different groups of animals were similar for all groups, suggesting that the sensitivity of the registered response is unaffected by illumination conditions or by GES treatment. In contrast,  $V_{max}$  values were markedly lower in GES treated animals for both light-exposed and dark-reared groups of rats (Table 1). Since  $V_{max}$  is the parameter affected by light as well as by GES treatment, while  $I_0$  remains unchanged, it may be concluded that the number of intact photoreceptors contributing to the response is lower in rats exposed to light and in the taurine-deficient animals but that the response of individual photoreceptors is unaffected. The correlation observed between the functional response and the concentration of the taurine may result from the effect of taurine protecting the structural integrity of photoreceptor cells. This interpretation agrees with the well known structural damage of photoreceptors observed in taurine-deficient animals. From these observations it may be concluded that taurine participates in the generation of a normal functional response by maintaining the structural integrity of photoreceptors, but that the decrease in taurine levels is not affecting the normal functioning of those photoreceptors with an intact morphology. These results also indicate that the presence of taurine in the retina is required for preserving the cell structure and function in the dark as well as during the physiological stimulation by light.

The b-wave is most likely generated at the glial cells (Müller cells). A close relationship between taurine retinal levels and the b-wave amplitude has been reported by Schmidt et al. (15) and is confirmed in our studies in rats. Taurine effects on Müller cells are not documented but a protective action of the amino acid on the cell membrane may explain its requirement for the generation of a normal bioelectrical response.

Table 1. Numerical values for the equation parameters of the theoretical V-log I curve for the a-wave

		$V_{max}$ (uv)	$I_0$ (lux)
LIGHT	Control	315	3890
	GES	80	5012
DARK	Control	410	3548
	GES	175	3981

Calculated from least squares fit to the equation shown in Fig. 3.

### The Effect of Antioxidants and Membrane Stabilizers

Another approach that may help to clarify the mechanism underlying the requirement for taurine in photoreceptors is the investigation of the effect of conditions or compounds able to counteract the adverse effects of taurine deficiency. The conditions examined in this study include mainly the effect of compounds acting as antioxidants and of substances with a known effect as membrane stabilizers. A protective effect of taurine on membranes damaged by peroxidation processes is now well documented (9,12,23), suggesting that the requirements of taurine may be linked to processes protecting the retina against membrane lipid peroxidation. The strikingly high levels of polyunsaturated fatty acids which characterizes the photoreceptor membrane (18) makes it particularly susceptible to lipid peroxidation. This feature, together with the highly aerobic metabolism of the retina, probably requires the existence of additional protection mechanisms in the retina against the risk of membrane lipid peroxidation. In this study, we examined the effect of antioxidants including cysteine, chromium and selenium on the retinal degeneration associated with taurine deficiency. These compounds were added as supplements to the taurine free diet during the whole treatment of about 25 weeks. The structure of photoreceptors appears somewhat well preserved in these cats as compared to the alteration observed in unsupplemented cats. The question of a possible protection by these antioxidants could not be definitely solved, since taurine levels in these cats, although significantly diminished, were never as low as those in unsupplemented cats. This observation confirms an early report of Berson and coworkers (2) on the presence of higher taurine levels in the retina of cats supplemented with cysteine. An inducible activation of the cysteine sulfinate decarboxylase may account for these observed protection of cysteine against tissue taurine depletion.

The possibility of a protective effect of zinc and tocopherol on the retinal dysfunction associated with taurine deficiency was considered with the described effects of a deficiency in these compounds on the photoreceptor structure as well as on their known actions as membrane stabilizers in a variety of biological preparations (3). Zinc and tocopherol deficiency in rats produce a degeneration of the photoreceptor structure that has many similarities with that developed by taurine deficiency (7,14). Disturbance of the discs membranes, disorientation and vesiculation are observed in zinc- and tocopherol-deficient rats. Tocopherol was administered to taurine-deficient cats from the beginning of the treatment by subcutaneous injection



twice a week, whereas zinc was added in the drinking water at a concentration of 200  $\mu\text{M}$ . At the end of the treatment, the ERG was measured. As shown in Fig. 4, zinc and tocopherol provided a partial protection of the a-wave amplitude, whereas no effect was observed on the b-wave amplitude.

The effects of GABA and glycine, which are neutral amino acids occurring naturally in the retina and that are structurally similar to taurine, were examined in terms of ability to protect the retinal structure in taurine-deficient cats. The amino acids were administered in the drinking water at a concentration of 1%. The rationale for this experiment is that the Müller cells, where the b-wave originates, possess active mechanisms for accumulating GABA and glycine (17). In conditions of taurine deficiency and of a surplus of GABA and glycine, the cell might be able to replace taurine by increasing the accumulation of these amino acids. Results in Fig. 4 show that GABA and glycine provide only partial protection. Altogether, the results of these experiments, although preliminary, indicate a specific role for taurine on membrane functioning, which cannot be completely replaced by antioxidants, membrane stabilizers or structurally close amino acids.

#### ISOLATED ROD OUTER SEGMENTS

Another experimental approach which has provided strong support for an involvement of taurine in the mechanisms preserving photoreceptor structure is the study of the protective effect of taurine on isolated frog rod outer segments. This structure is easily detached from the photoreceptor by mechanical disruption. The isolated OS have a relatively simple subcellular structure, mainly constituted by the lamellar discs which are highly organized. The discs are formed from the cell membrane by invaginations, so that the outer side of the cell membrane is identical to the inner side of the discs, and the inner side of the cell membrane is the same as the outer side of the disc membranes. This observation is relevant for the interpretation of the results described below.

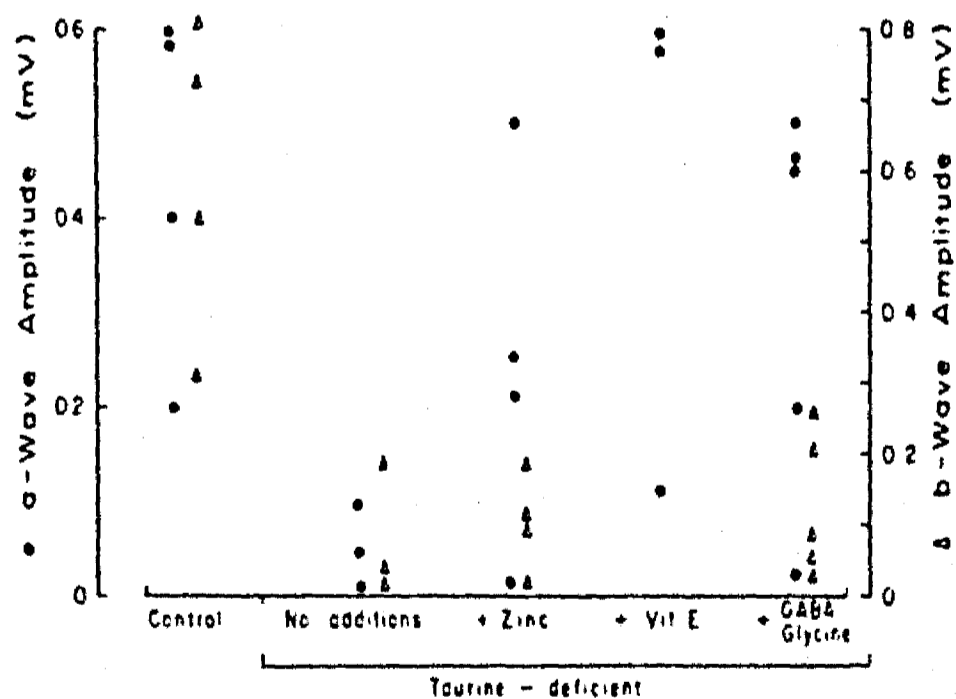


Figure 4. The effect of a taurine-deficient diet supplemented with zinc, GABA and glycine, and tocopherol on the ERG of taurine-deficient cats. Zinc (200  $\mu\text{M}$ ) and amino acids (1%) were added to the drinking water. Tocopherol was injected subcutaneously twice a week. Treatment duration was 25 weeks. The ERG recording was as described in Fig. 1. Each point represents the response of a different cat.

Table 2. Total fatty acids in phospholipids of rod outer segment membranes exposed to illumination and in the presence of taurine, hypotaurine and albumin

Fatty Acids	Dark ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Light	+Taurine	+ Hypotaurine	+ Albumin
14:0	3 + 2	3 + 2	2 + 2	3 + 2	2 + 2
16:0	127 + 15	116 + 36	117 + 23	119 + 11	112 + 30
18:0	116 + 20	110 + 35	112 + 27	122 + 40	99 + 12
18:1	69 + 17	63 + 16	63 + 12	60 + 11	54 + 24
18:2	12 + 2	10 + 3	11 + 3	10 + 2	11 + 4
20:4	33 + 6	33 + 7	33 + 7	34 + 5	35 + 13
22:5	17 + 3	20 + 6	3 + 8	23 + 8	19 + 5
22:6	267 + 56	310 + 94	319 + 95	336 + 119	287 + 55
Total	661 + 91	679 + 189	690 + 163	713 + 148	638 + 107

Lipids were extracted and purified by the procedure of Folch et al. (J. Biol. Chem., 226, 496, 1957) and free fatty acids and phospholipids were separated by gradient thickness thin-layer chromatography, according to Bazán and Bazán (Res. Methods in Neurochemistry, Plenum Press, New York pp. 309, 1985) and quantitated by gas liquid chromatography. Results are the means  $\pm$  SD of 6 separate experiments.

Isolated OS, incubated in a Krebs-bicarbonate medium in the dark, maintain their normal size and appearance during several hours. When the incubation occurs in the light (2500 lux), a disturbance of the OS structure is observed. In previous reports we have described that the presence of taurine in the incubation medium at concentrations of 5-25 mM affords a complete protection of the OS structure disturbed by light (10). Swelling of the OS and protrusion of the discs characterize the effect of light. Now we are attempting to identify the processes responsible for the disruption produced by light and in a subsequent step, to investigate the mechanisms underlying the protective effect of taurine. An increase in lipid peroxidation in the OS membranes observed after illumination was effectively counteracted by taurine (12). However on the basis of results in a number of other models of cell damage associated with lipid peroxidation, where taurine protects the structure without antagonizing the peroxidative process (13), it was concluded that the effect of taurine is primarily located at a step previous to the membrane lipid peroxidation. The hypothesis proposing that a release of free fatty acids from the membrane damaged by light might be the trigger for the chain of events leading to membrane lipid peroxidation was supported by investigations reporting increased membrane permeability and swelling in cells exposed to free fatty acids (19,20). This hypothesis proved to be wrong since the analysis of fatty acid composition in OS exposed to light and that in OS kept in the dark showed no significant differences (Table 2).

Investigation on the specificity of taurine effects, and the characteristics of other compounds also able to protect the OS structure, may provide information about the mechanism of taurine action. A number of compounds were tested for their ability to protect the OS structure from the damage caused by light. Table 3 shows that compounds with a marked protective effect comparable to that of taurine include hypotaurine, cysteine, and albumin. Compounds providing partial protection include sucrose, GABA, glycine,  $\beta$ -alanine, mercaptoethanol and mannitol. Substances without effect include amino acids, such as glutamic and aspartic acids and proline, the taurine analogue GES, strychnine, and bicuculline. Among the compounds

Table 3. The effect of amino acids, antioxidants, ion transport inhibitors and other compounds on the structure of OS disturbed by light

Compound	mM	disrupted outer segment (%)
None	25	71
Taurine	25	23
GABA	25	39
Glycine	25	34
Hypotaurine	25	20
$\beta$ -Alanine	25	51
GES	25	68
Cysteine	25	32
Mercaptoethanol	25	69
Tocopherol	1	58
*Urea	2	80
Sucrose	30	62
Mannitol	30	57
Mersalyl	2	65
*N-Ethylmaleimide	2	100
*Furosemide	1	100
*DIDS	1	72
*PCMS	1	98

Incubation in Krebs-bicarbonate medium, during 2 h. Light intensity, 2500 lux. The percentage of outer segments with disturbed structure in darkness was 24.6. The asterisk denotes compounds which also produce disruption of outer segments structure in darkness. PCMS= p-chloromercuribenzene-sulfonate; DIDS= 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid.

examined, some of them caused cell damage by themselves, in the dark. These include urea, the anion-transport inhibitor DIDS, n-ethyl-maleimide, p-chloromercuribenzensulfonate, and furosemide (Table 3). From these results it is concluded that the effect of taurine on protecting the outer segments is quite specific but not exclusive, and that compounds having a structural similarity to taurine are also effective. Thus,  $\beta$ -alanine and hypotaurine worked better than GABA and glycine. Albumin and cysteine may be acting through an effect on SH groups, although the inability of mercaptoethanol to protect the cell structure militates against this possibility (Table 3).

The approach used for the identification of the ionic currents responsible for the swelling and disruption of the OS structure after illumination was to examine the effect of replacement of the major ions in the physiological medium on the alteration caused by light. Table 4 shows that omission of sodium, replacing sodium chloride by choline chloride, has a beneficial effect preventing disruption. The same effect is observed when chloride is replaced in the medium by sodium gluconate. Omission of potassium in the presence of sodium and chloride has no effect. These results suggest that the increase in membrane permeability, which probably subserves the structural damage, requires the simultaneous presence of sodium and chloride. The significance of this observation will be discussed later.

Removal of the divalent cations calcium and magnesium from the incubation medium does not prevent the damage caused by light. On the contrary, OS kept in the dark showed a disruption pattern similar to that of illuminated OS in a complete medium. Swelling and discs protrusion were also

Table 4. Effect of ion replacement on the structure of rod outer segment disrupted by light and by omission of calcium-magnesium

Conditions	Disrupted ROS (%)	
	Light	Ca <sup>++</sup> -Mg <sup>++</sup> free
Krebs-bicarbonate*	(9) 71.0 ± 2.6	(4) 67.0 ± 4.2
Krebs-HEPES	(3) 24.8 ± 1.0	(4) 32.3 ± 4.7
Sodium-free (choline chloride)	(3) 18.5 ± 2.1	(4) 27.1 ± 2.3
Chloride-free (sodium gluconate)	(4) 23.6 ± 1.9	(4) 28.2 ± 3.1

Isolated rod outer segments were resuspended in Krebs-bicarbonate medium and exposed to illumination (2500 lux) for 2 h, or to calcium-free magnesium-free medium, containing 100 µM EGTA, for 1 h in darkness. After incubation, about 200 ROS were examined in a light-microscope, and the number of ROS with altered structure was counted. Results are the means ± SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

\* Composition of Krebs-bicarbonate buffer: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.0.

characteristics of the OS exposed to divalent cation-free medium. After one hour of incubation in these conditions, 75% of the OS show an altered structure. Again, taurine affords almost complete protection, maintaining intact the OS structure (Fig. 5). In order to compare the ionic requirements of this new model of structural damage with those of illumination, sodium chloride was replaced by sodium gluconate (chloride-free medium) or by choline chloride (sodium-free medium), and potassium was omitted. Table 4 shows that ionic replacements produced about the same effects on the OS structure as those observed after illumination. The presence of sodium, and chloride is necessary for the cell damage to occur. These observations suggest that swelling observed under the experimental conditions investigated requires the transport of sodium and chloride in a concerted way, most probably accompanied by water entry.

When chloride is replaced by anions more permeant than gluconate, the OS swells very rapidly. Isethionate, acetate, sulfate and nitrate all induce a marked disruption of the OS structure. This observation confirms a previous report of Cohen et al. (4), where a study on the effect of a series of anions and cations on the structure of OS in the rat retina was carried out. The addition of taurine to the incubation medium partially protected the OS structure against the disruption produced by permeant anions. The protective effect of taurine against the anions examined showed differences in efficacy. The highest protection was observed with sodium isethionate, followed by sodium acetate and sodium nitrate. Taurine did not protect the cell structure in the presence of sulfate.

Altogether, these observations confirm an interaction of taurine with the OS membrane, resulting in a regulation of ionic fluxes and/or water entry. The mechanism of this action of taurine is still unclarified. Among the possibilities to be explored, we are considering 1) a modulatory action of taurine on ion cotransport systems, which may be either activated or inhibited by light and in the absence of divalent ions, and 2) a nonspecific interaction of taurine with membranes, probably at the polar heads of phospholipids, creating a barrier for water influx, carried or uncarried by ions. Experiments devised for providing evidence supporting one or another of these possibilities are now in progress.

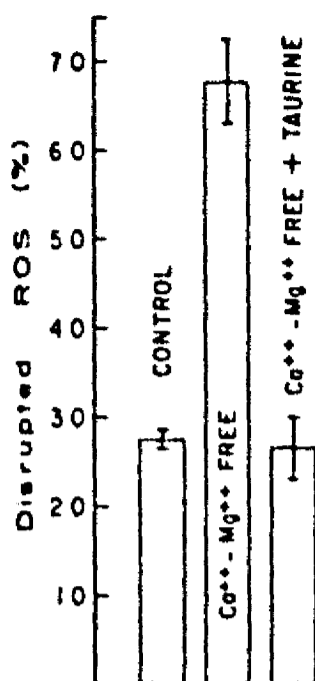


Figure 5. Protective effect of taurine on the disruption of isolated rod outer segments produced by removal of divalent cations. Frog outer segments were incubated in a Krebs-bicarbonate medium (control) or in a medium without calcium and magnesium, in the presence or absence of taurine (25 mM). After 60 min of incubation in darkness, the number of outer segments intact or with disrupted structure were counted at the light microscope. Results are the means  $\pm$  SEM of 8 separate experiments.

The protective effect of taurine on OS structure occurs through an interaction of the outer side of the membrane, whereas taurine is found concentrated intracellularly. In preliminary experiments, we have observed that all the experimental conditions producing disruption of the OS structure induce the release of taurine from retinal cells. From these observations we propose that these disrupting conditions generate an intracellular signal - ions, water or a volume change - which in turn induces taurine release. This response may have a dual beneficial effect for the cell: on one hand, the decrease of intracellular taurine contributes to restore the isosmotic condition and on the other hand the released taurine, acting extracellularly, contributes to regulate the membrane permeability, thus terminating the detrimental effects of ion overload or water entry.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants No. EY0254-07 from NIH and PCSABNA 03775 from CONACYT. We Thank Ms. Y. Diaz de Castro for typing the manuscript.

#### REFERENCES

1. Baylor, D.A., and Fourtes, M.G., 1970, Electrical responses of single cones in the retina of the turtle, *J. Physiol. Lond.*, 207:77-92.
2. Berson, E.L., Hayes, R.C., Robin, A.R., Schmidt, S.Y., Watson, G., 1976, Retinal degeneration in cats fed casein II. Supplementation with methionine, cysteine and taurine, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 15:52-58.
3. Bettger, W.J., and O'Dell, B.C., 1982, A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes, *Life Sci.*, 28:1425-1438.

4. Cohen, A.I., 1971, Electron microscope observations on form changes in photoreceptor outer segments and their saccules in response to osmotic stress, J. Cell Biol., 48:547-565.
5. Geggel, H.S., Ament, M.E., Heckenlively, J.R., Martin, D.A., Martin, D.S., and Kopple, J.D., 1985, Nutritional requirements for taurine in patients receiving long term parenteral nutrition, New Eng. J. Med., 312:142-146.
6. Hayes, K.C., Carey, R.E., and Schmidt, S.Y., 1975, Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat, Science, 188:949-951.
7. Laure-Dupree, A.E., and Bridges, D.B., 1982, Changes in retinal morphology and vitamin A metabolism as a consequence of decreased zinc availability, Retina, 2:294-304.
8. Naka, K., and Rushton, W.A., 1966, S-potentials from luminosity units in the retina fish (Cyprinidae), J. Physiol. Lond., 185:587-599.
9. Nakashima, T., Takino, T., and Kuriyama, K., 1983, Therapeutic and prophylactic effects of taurine administration on experimental liver injury, Prog. Clin. Biol. Res., 125:449.
10. Pasantes-Morales, H., Ademe, R.M., and Quesada, O., 1981, Protective effect of taurine on the light induced disruption of isolated frog rod outer segments, J. Neurosci. Res., 6:337-346.
11. Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Carabez, A., and Huxtable, R.J., 1983, Effect of taurine transport antagonists, guanidino ethanesulfonate and  $\beta$ -alanine on the morphology of the rat retina, J. Neurosci. Res., 9:135-146.
12. Pasantes-Morales, J., and Cruz C., 1985, Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure, Brain Res., 330:154-157.
13. Pasantes-Morales, H., Wright, C.E., and Gaull, G.E., 1985, Taurine protection to lymphoblastoid cells from iron ascorbate induced damage, Biochem. Pharmacol., 34:2205-2207.
14. Robinson, W.G., Kuwabara, T., and Bieri, J.G., 1982, The roles of vitamin E and unsaturated fatty acids in the visual process, Retina, 2:263-281.
15. Schmidt, S.Y., Berson, E.L., Watson, G., and Huang, C., 1977, Retinal degeneration in cats fed casein. III. Taurine deficiency and ERG amplitudes, Invest. Ophthalmol., 16:673-684.
16. Sturman, J.A., Wen, G.Y., Wisniewski, H.M., and Neuringer, M., 1984, Retinal degeneration in primates raised on a synthetic human infant formula, Int. J. Devel. Neurosci., 2:121-128.
17. Voaden, M.J., 1978, The localization and metabolism of neuroactive aminoacids in the retina, in: "Amino Acids as Chemical Transmitters", F. Fonnun, Ed., Plenum Press, New York, pp. 257-274.
18. Wheeler, T.G., Benolken, R.M., and Anderson, R.E., 1975, Visual membrane: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination of the rat retina, Science, 188:131-134.
19. Wiegand, R.D., Giusto, N.M., Rapp, L.M., and Anderson, R.E., 1983, Evidence of rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 10:1433-1439.
20. Willmore, L.J., and Rubin, J.J., 1982, Formation of malonaldehyde and focal edema induced by subpial injection of FeCl<sub>2</sub> into rat isocortex, Brain Res., 246:113-119.

ALTERATIONS IN THE ISOLATED CAT TRACHEA AND INTESTINE  
RESPONSIVENESS TO ACETYLCHOLINE AND TAURINE AFTER CHRONIC DIETARY  
DEPLETION OF TAURINE.

Quesada, O., \*Jimenez, P., \*Servin, D., \*Lujan, M. and  
Pasantes-Morales, H.

Department of Neurosciences, Institute of Cell Physiology and  
\*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, National  
University of Mexico. +School of Medicine, University of  
Hidalgo, México.

#### SUMMARY

Young cats (12-15 weeks old) were fed for one year with a taurine-free or a taurine-supplemented (0.05%) diet. After taurine-free treatment, plasma taurine concentration was less than 1  $\mu$ M. In this condition, we studied the contractil response induced by exogenous administration of acetylcholine and taurine in the intestinal and tracheal smooth muscle from both animal groups. Neither, the spontaneous activity of the isolated intestine, nor the basal tone of the trachea, were affected by the taurine depletion. However, in both conditions (taurine-deficient and taurine-supplemented cats) acetylcholine and taurine evoked a dose-related contraction in both muscle preparations. The dose-response curve to acetylcholine of the isolated ileum from taurine-deficient cats was shifted 3.7 times to the left as compared with the corresponding control. In the isolated ileum of the taurine-depleted cats, the exogenous administration of taurine induced a shift to the left of the dose-response curve as compared with its control. In this case, an increase of the maximal response was observed. Qualitatively similar response were observed in tracheal smooth muscle, but quantitatively minor. Results are discussed in terms of a facilitatory effect of taurine on calcium fluxes. A particular case of supersensitivity is considered also.

#### INTRODUCTION

Taurine (2-aminoethane sulfonate) is a sulfur-containing free amino acid which occurs ubiquitously in animals. Most tissues often contain large quantities of taurine, particularly those with excitable properties, i.e. nervous tissue, secretory glands and every type of muscle (1), however its specific role in cell physiology is still unclear.



In most species, tissue taurine pools are remarkably stable due to the coordinated activities of biosynthesis, transport and excretion processes (2,3). A notable exception is the cat, a species which obtains most of its taurine through the diet, because of its limited capacity to produce it from endogenous precursors (4). Then, cats fed with a diet devoid of taurine become taurine-depleted, although there is a wide variation among tissues in their capacity to retain taurine (5). This animal model has allowed to emphasize the critical necessity of several tissues for the amino acid such as the retina, which degenerates under a taurine deficiency condition (6,7) or some brain regions, particularly during developmental stages (8,9).

Muscle taurine pools have been studied in depth in the heart and only few studies have been concerned with smooth muscle. In the present work, we report results from studies on intestinal and tracheal smooth muscle from both, normal and taurine-depleted cats.

#### MATERIAL AND METHODS

Eight domestic cats, previously vaccinated against rhinotracheitis, panleukopenia and calici virus, were fed either a taurine-free or taurine-supplemented (0.05%) diet (BioServ, Frenchtown, NJ) for one year. The synthetic diet contained (in grams/100 gr): casein, 43.0; chicken fat, 20.0; dextrin, 13.5; sucrose, 13.5; cellulose, 2.4; L-cysteine, 0.3; choline chloride, 0.3; salt mix, 6.4; vitamin mix, 0.6. The salt mix composition was (in gr / Kg): Potassium phosphate dibasic, 328; calcium carbonate, 290; sodium chloride, 162; magnesium sulfate, 99; calcium phosphate dibasic, 73; magnesium oxide, 32; ferric citrate, 13; manganese sulfate, 1.2; zinc chloride, 0.9; cupric sulfate, 0.29; potassium iodide, 0.07; chromium acetate, 0.04; sodium fluoride, 0.023; sodium selenite, 0.004. The vitamin mix contained (in gr / Kg): Dextrine, 857; inositol, 100; D,L-alpha-tocopherol acetate, (500 IU/g) 20; niacinamide, 8; calcium pantothenate, 5; retinyl acetate, (500,000 IU/g) 5; riboflavin, 1.6; cholecalciferol, (200,000 IU/g) 1.25; thiamine, 0.8; pyridoxine, 0.8; folic acid, 0.8; menadione, 0.1; biotin, 0.04; cyanocobalamin, 0.03.

Taurine depletion was monitored along treatment by determination of plasma levels by HPLC. At the end of one year of treatment, plasma taurine concentrations were less than 1 umol/L/100 ml. At this time, animals were killed by an overdose of pentobarbital. Immediately after, the ileal portion of the intestine (discarding the 10 cm nearest the caecum) and the trachea were removed and placed in petri dishes containing Krebs-Bicarbonate (KB) solution (which contains, in millimolar: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.5; NaHPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; Glucose, 11; Choline chloride, 0.029). Both, intestine and trachea were washed thoroughly through the lumen with KB solution before and after the surgical cleaning. Afterwards, the organs were prepared for in vitro mounting.

Pieces of 3-4 cm of ileum were suspended in a 20 ml tissue bath and continuously perfused with KB at a rate of 10 ml/min., bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> to maintain the pH at 7.4. The isometric contractions of the isolated ileum were recorded with a FT 03 force transducer on a Grass 7D polygraph. The resting tension was fixed at 1 g and the bath temperature was maintained at 37 C by means of a ET-5 Colara temperature regulator. The intestine was allowed to stabilize under these conditions during 40 min, immediately after, dose-response curves to acetylcholine or taurine (10<sup>-8</sup> to 10<sup>-4</sup> M) were constructed. The drugs were added individually to the organ bath, starting at the lowest dose. In each case, after reaching the maximal response, the intestine was freed of drug by washing it with KB during 10 min. Once the intestine reached the baseline level, and after a resting period of ten minutes, another dose of the drug tested was added to the organ bath. This procedure was repeated until a complete dose-response curve was constructed.

The trachea was mounted as described by Castillo and De Beer (10). The trachea, free of conjunctive tissue, was cut into individual rings, each of which were cutted again through the cartilaginous portion. The tissue was reassembled, joining the pieces by suturing the cartilages between them. Each segment of trachea mounted in the organ chamber was constituted of three pieces or open rings. They were mounted in the transducer/recording device and the contractile force recorded. Accumulative dose-response curves to acetylcholine or taurine were constructed adding growing concentrations of the drug tested, washing it until the maximal response was achieved.

The intestinal and tracheal smooth muscle response to drugs were quantified in g of tension. The parallel line assay of Finney (11) was used to test the similarity of the curves and to determine the relative potency within 95% confidence limits. Student's t test for unpaired values was used to test the differences between groups at each dose tested. Analysis of variance (ANOVA) was used when necessary.

## RESULTS

The spontaneous activity of the cat isolated ileum was similar between taurine-depleted and taurine-supplemented cats. The *in vitro* administration of acetylcholine or taurine induced a dose dependent contraction of the intestinal muscle of the cat (Fig. 1 and 2). In all cases, the duration of the response induced by the intestinal challenge with acetylcholine was more prolonged than that observed after taurine exposition.

The dose response curves to acetylcholine in taurine-deficient animals showed a shift to the left as compared with the response observed in intestines from taurine-supplemented cats. Since the shifting was parallel to the control response, a formal comparison of potency was carried out using factorial coefficients (12). This procedure showed that the *in vitro* ileal

response to acetylcholine from taurine-depleted cats, was shifted 3.1 (1.5 - 5.9 C.L.) from the response observed in intestines from control cats.

The dose-response curves to taurine in intestines from taurine-deficient cats also showed a shift to the left with an increase of the maximal response. It is important to point out that it was not possible to make a formal comparison of the shift because the conditions for a valid bioassay were not met. However, using a one-way ANOVA, it was found that the ileal response to taurine differed at the various doses tested ( $P < 0.05$ ). Scheffe's test (13) was used to validate that the response of  $10^{-4}$  M are significantly different from those obtained at  $10^{-2}$  M. The t test showed significant differences between the responses obtained in taurine-depleted versus taurine-supplemented animals, at doses from  $10^{-4}$  to  $10^{-2}$  M. In both cases, higher doses of taurine do not increase the contractile response but decrease it (not shown).

In the cat isolated trachea, either from taurine-depleted or taurine supplemented cats, the administration of acetylcholine or taurine induced a dose-related contracture (Figs. 3 and 4). The dose-response curves to acetylcholine were very similar, with a slight, non significant shifting to the left in the experimental group as compared with control. The student's t test did not show any significant difference between the response obtained from both diet groups at any dose tested. Likewise, there were not significant differences (t test) in the tracheal contractile response induced by taurine between taurine-depleted or supplemented animals. However, the ANOVA test showed a significant difference between the tracheal response to  $10^{-2}$  taurine and the other doses tested in both animal groups.

## DISCUSSION

The intestinal spontaneous activity of the isolated ileum and the tracheal smooth muscle tone from taurine-deficient and taurine-supplemented cats were very similar.

The *in vitro* administration of taurine or acetylcholine to intestines and tracheas obtained from both animal groups, results in a dose-related contraction of the smooth muscle of these organs. It has been shown in the isolated guinea-pig ileum, that taurine can block the intestinal activity induced by 4-aminopyridine (14), probably by a presynaptic effect. Previously, we have seen that in fully established intestinal kindling (15), taurine induce a biphasic response which depends on the dose used; at low doses ( $10^{-6}$  M), taurine further increased the intestinal activity induced by the kindling procedure, whereas the administration of higher doses ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ) blocks the electrical-induced activity (unpublished observations). These observations suggest a presynaptic effect of taurine.

The differences between our results (taurine-induced contraction) and those reported in the guinea pig ileum (taurine-induced relaxation), might be due: to the doses tested; to physiological and anatomical differences between the intestines of these species (16); to the experimental paradigm used, or to the physiological role that taurine might play in cat homeostasis (5). As a matter of fact, this kind of differences are common in the drug responses among species; an illustrative example of this is the relaxation induced by morphine in the guinea pig ileum versus the strong contracture induced by the opiate in the isolated dog ileum (17)

The observation that basal tone and spontaneous contractility in tracheal and intestinal smooth muscle are similar in both, taurine-deficient and -supplemented cats, suggest at least two possibilities not necessarily mutually excludents: 1) taurine is irrelevant to the basal activity or 2) there was an adaptative process to the chronic low levels of taurine in the system. Studies performed in heart preparations (18, 19) had not been able to detect an effect of taurine on basal contractility, whereas it produce consistent effects on calcium influx-dependent contractions.

The effects induced by taurine in the cat isolated ileum and trachea might be the result of a direct action on calcium fluxes through the plasma membrane or an indirect action (presynaptic) by neural release of neurotransmitters. This last possibility might be of importance in the isolated ileum, where there is a multiplicity of substances produced by the enteric nervous system (16). Both possibilities are not mutually excludents, however a specific study to test them is necessarily.

An striking observation was that the isolated ilea from taurine-deficient cats showed an increased responsiveness to exogenous applied acetylcholine or taurine. The parallel shift to the left of the dose-response curve to acetylcholine in ilea from taurine-depleted animals, suggest that the long lasting privation of taurine, produced a phenomenon very similar to supersensitivity by denervation (20). Post junctional supersensitivity, as opposed to prejunctional supersensitivity, is a true change in the sensitivity of the target cells. It usually comes on slowly (days to weeks, depending on the target cell), and is generally quite nonspecific, the sensitivity being increased to a variety of drugs and ions (21).

In this line, the increased responsiveness to acetylcholine and to taurine attained in the isolated ilea from taurine-deficient cats, might represent a change in the intestinal sensitivity to these drugs. However, the lack of information about the onset and specificity of this phenomenon, precludes to call it supersensitivity.

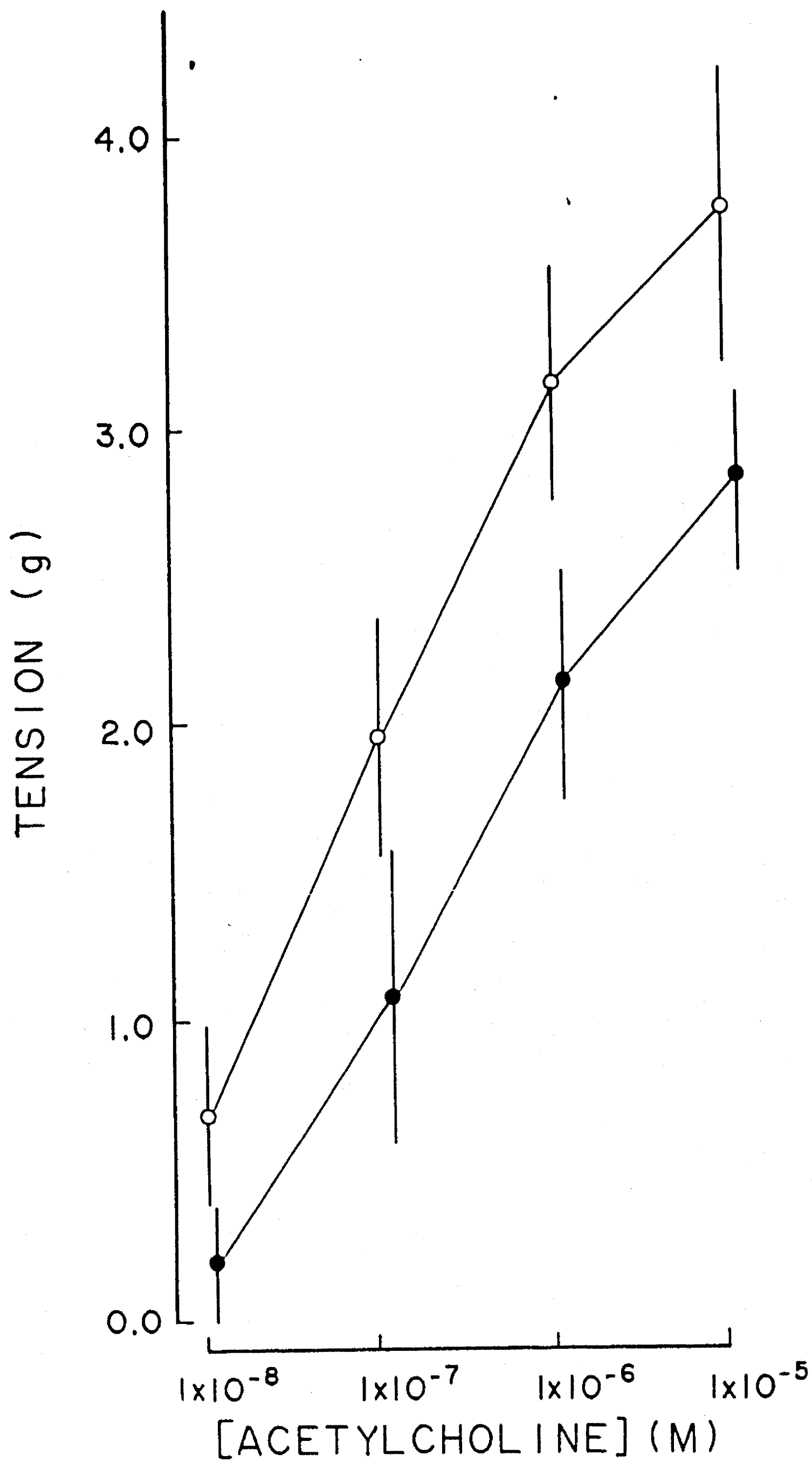
The lack of a clear-cut alteration in responsiveness to acetylcholine and taurine in tracheal tissue from taurine-depleted animals, as compared with that observed in intestinal tissue, might represent either a specific modification in the calcium availability or to neuroanatomical differences in the innervation of both organs.

#### LITERATURE CITED

- 1.- J.G. Jacobsen, and L.H. Smith. *Physiol. Rev.* 48: 424-511. (1968).
- 2.- D.B. Hope. *J. Neurochem.* 1: 364-369. (1957).
- 3.- J.A. Sturman. *J. Nutr.* 103: 1566-1580. (1973).
- 4.- K. Knopf, J.A. Sturman, M. Armstrong and K.C. Hayes. *J. Nutr.* 108: 773-778. (1978).
- 5.- K.C. Hayes, and J.A. Sturman. Taurine in Nutrition and Neurology., R.J. Huxtable and H. Pasantes-Morales, pp. 79-87, Plenum Press, New York. (1982).
- 6.- K.C. Hayes, R.E. Carey, and S.Y. Schmidt. *Science.* 188: 949-951. (1975).
- 7.- K.C. Hayes, A.R. Rabin and E.L. Berson. *Am. J. Physiol.* 78: 505-524. (1975).
- 8.- T. Palackal, R. Moretz, H.M. Wisniewski and J.A. Sturman. *J. Neurosci. Res.* 15: 223-239. (1986).
- 9.- J.A. Sturman, R.C. Moretz, J.H. French and H.M. Wisniewski. *J. Neurosci. Res.* 13: 405-416. (1985).
- 10.- J.C. Castillo, and E.J.J. De Beers. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 90: 104-108. (1947).
- 11.- D.J.J. Finney. *Royal Stat. Soc.* 9: 46-76. (1947).
- 12.- C.W. Emmens. Principles of Biological Assay Chapman and Hall Press, London. pp. 88-97. (1948).
- 13.- J. Scheffe. *Biometrika*, 40: 87-104, (1953).
- 14.- M.E. Arzate, H. Ponce and H. Pasantes-Morales. *Neurosci. Res.*, 11: 271-280, (1984).
- 15.- M. Luján, R. Rodríguez, C. Capistrán, F. Velasco and M. Velasco. *Exp. Neurol.*, 92: 249-263. (1987).
- 16.- M. Costa, and J.B. Furness. *Enteric Nervous System*

Figura 1.- Dose-response curves for acetylcholine-induced contraction in the isolated cat ilea from taurine-depleted (o), or taurine-supplemented (') animals.

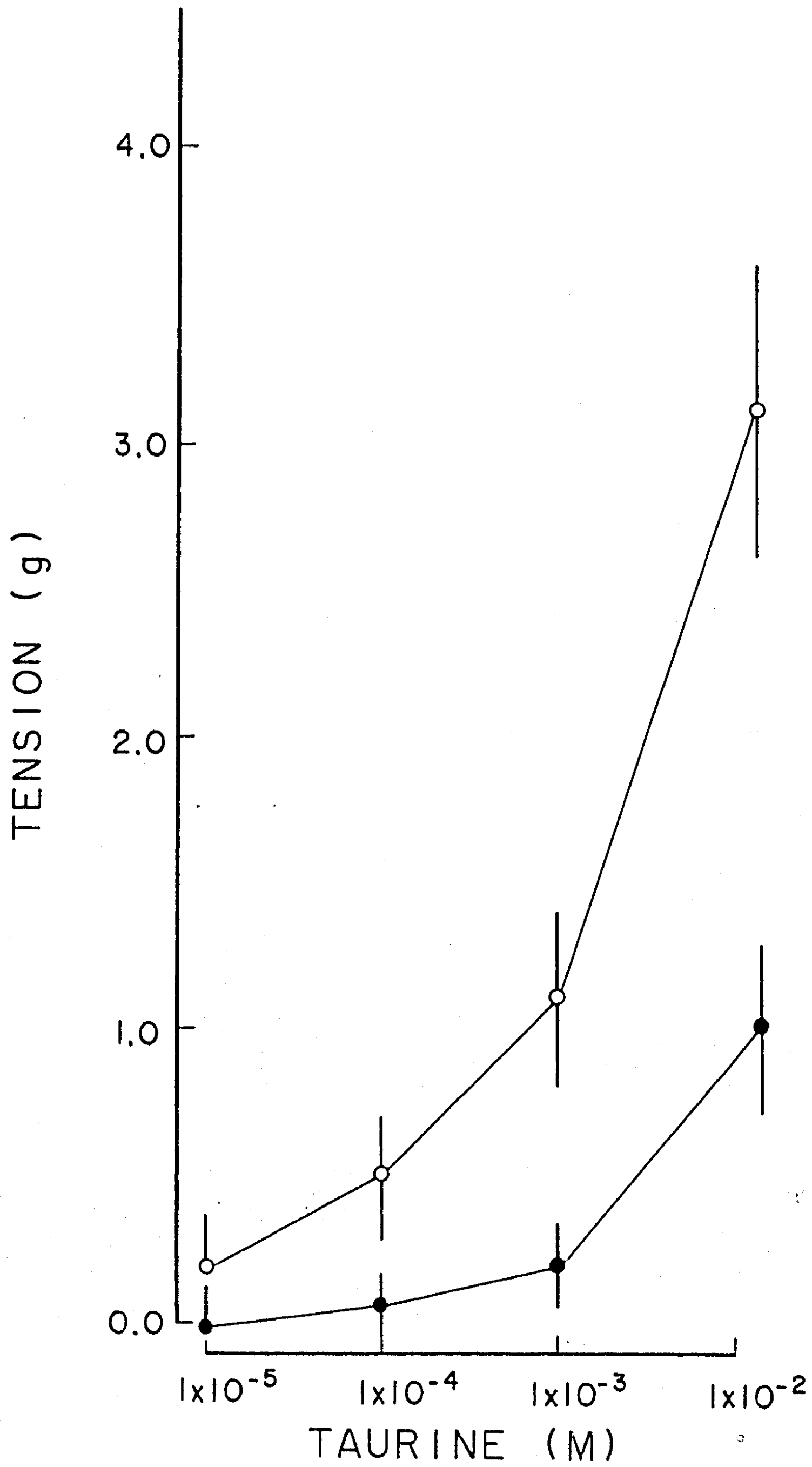
Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 12 observations. Dose response curves were constructed using intestines obtained from four different cats (three pieces of ileum in each case).



**Figure 2.-** Dose-response curves for taurine-induced contraction in the isolated ilea from taurine-depleted (o) or taurine-supplemented (') cats.

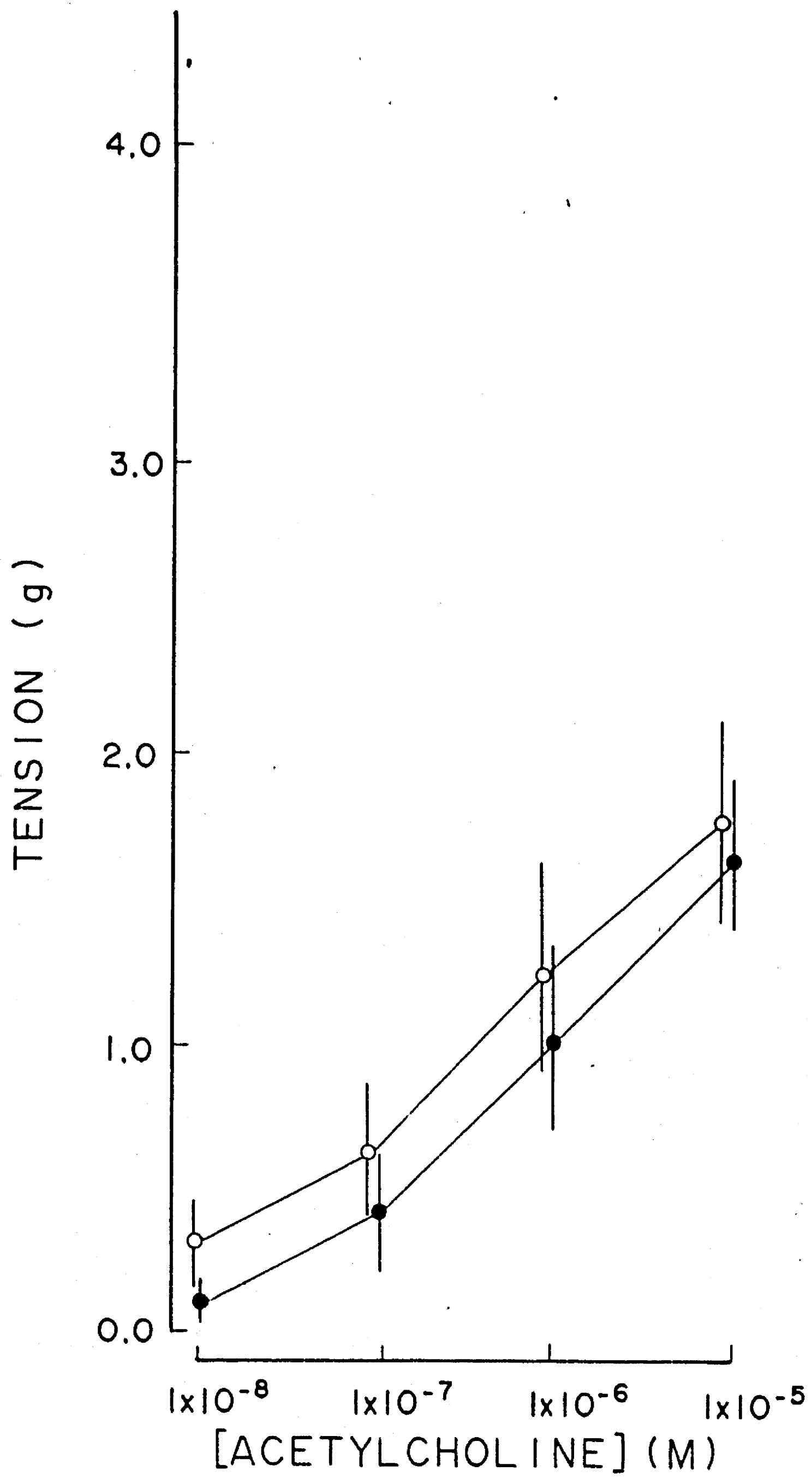
Each point represents the mean response  $\pm$  S.D. of 12 observations.





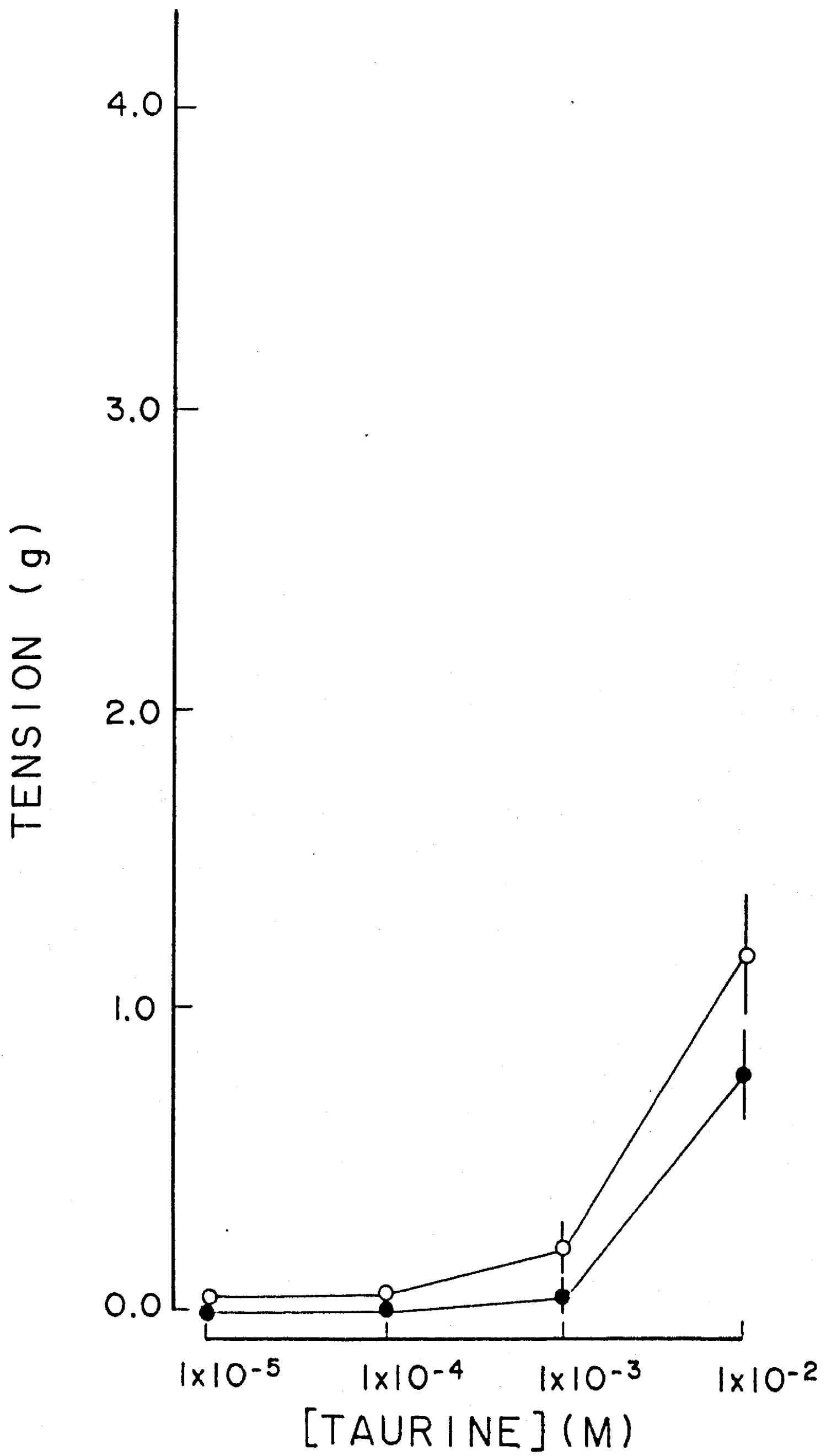
**Figure 3.-** Dose-response curves for acetylcholine-induced contraction in the isolated cat trachea from taurine-depleted (o) or taurine-supplemented (\*) animals.

Each point represents the mean response  $\pm$  S.D. of eight observations. In each condition (taurine-depleted or supplemented), the tracheal segments were obtained from four cats. The curves were constructed in a cumulative manner.



**Figure 4.-** Dose-response curves for taurine-induced contraction in the isolated cat trachea from taurine-depleted (o) or taurine-supplemented (\*) animals.

Each point represents the mean response  $\pm$  S.D. of eight observations. Curves were constructed in a cumulative manner.



### 3.1 Niveles de colesterol en hígado y eritrocitos de gatos deficientes en taurina.

#### RESULTADOS

Después de un período de seis meses con una dieta deficiente en taurina, se cuantificaron los niveles plasmáticos de colesterol. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos. Se observa primeramente que el contenido de colesterol en los animales alimentados con carne, fue claramente más alto que el de aquellos sometidos a una dieta definida, reflejando el contenido de colesterol en cada tipo de alimentación. Lo anterior no permite la comparación directa entre estos grupos para estimar la tasa de absorción de colesterol, por lo cual se implementó un tercer grupo de animales, alimentados con la dieta definida y suplementados con taurina al 0.5%. En estas condiciones, se encontró que las concentraciones de colesterol plasmático eran semejantes en los animales deficientes y suplementados con taurina (tabla 2); no obstante que en los primeros se observa una tendencia a valores menores, las diferencias no alcanzan niveles de significancia estadística ( $P > 0.05$ ).

Por otra parte, el período de ayuno establecido redujo considerablemente los niveles circulantes de colesterol (tabla 2) al permitirse un intervalo de absorción y excreción. La magnitud del efecto producido por el ayuno probablemente esté en función del contenido de colesterol en cada dieta, en donde la carne contenía de 3 a 4 veces los niveles de la dieta definida. Así, en los animales alimentados con una dieta diseñada para cubrir sus requerimientos mínimos (definida), no se observó el efecto del ayuno, determinándose valores de concentración similares en ambas condiciones (sin ayuno y bajo ayuno).

Con el fin de estimar en que medida los niveles circulantes de colesterol repercuten sobre el contenido celular de este lípido, se determinó su concentración en eritrocitos en los tres grupos experimentales, bajo las dos condiciones de alimentación previas a los ensayos (sin ayuno y ayuno) (Fig. 4). Se observó primeramente, que en los animales alimentados con carne, el ayuno y los bajos niveles de colesterol circulante, provocaron una reducción notable en el contenido del lípido en eritrocitos. Se observaron efectos similares en los animales deficientes y suplementados con taurina, aunque en estos casos las diferencias no fueron tan marcadas como en el primer grupo. No obstante, los valores de concentración de colesterol en la condición de ayuno (barras oscuras) o en las sin ayuno (barras blancas), fueron semejantes entre los animales deficientes y los suplementados con taurina y estadísticamente iguales. Debe notarse además, que bajo la condición de ayuno, el contenido de colesterol fue similar entre todos los grupos de experimentación.

TABLA 2  
 COLESTEROL PLASMATICO TOTAL EN GATOS CONTROLES Y  
 DEFICIENTES EN TAURINA  
 ( mg / dL )

CONDICION	DIETA		
	CARNE	DIETA + TAU	DIETA - TAU
SIN AYUNO	123.1 + 9.8 n=8	53.1 + 4.5 n=9	43.4 + 3.9 n=12
AYUNO	91.9 + 7.1 n=8	53.7 + 3.5 n=7	42.4 + 3.7 n=12

Los resultados estan expresados como el promedio + D.S. del número de análisis separados indicado por n.

Fig. 4. Efecto de la dieta sobre la concentración de colesterol en eritrocitos de gato. Las dietas impuestas fueron: Carne; dieta definida suplementada con taurina; dieta definida libre de taurina. El colesterol se cuantificó en eritrocitos colectados 4 a 6 hr después del alimento (Alimentados) o 12 hrs después del alimento (Ayunados). Las barras representan el promedio  $\pm$  el E.S. de cinco determinaciones separadas, hechas por duplicado.



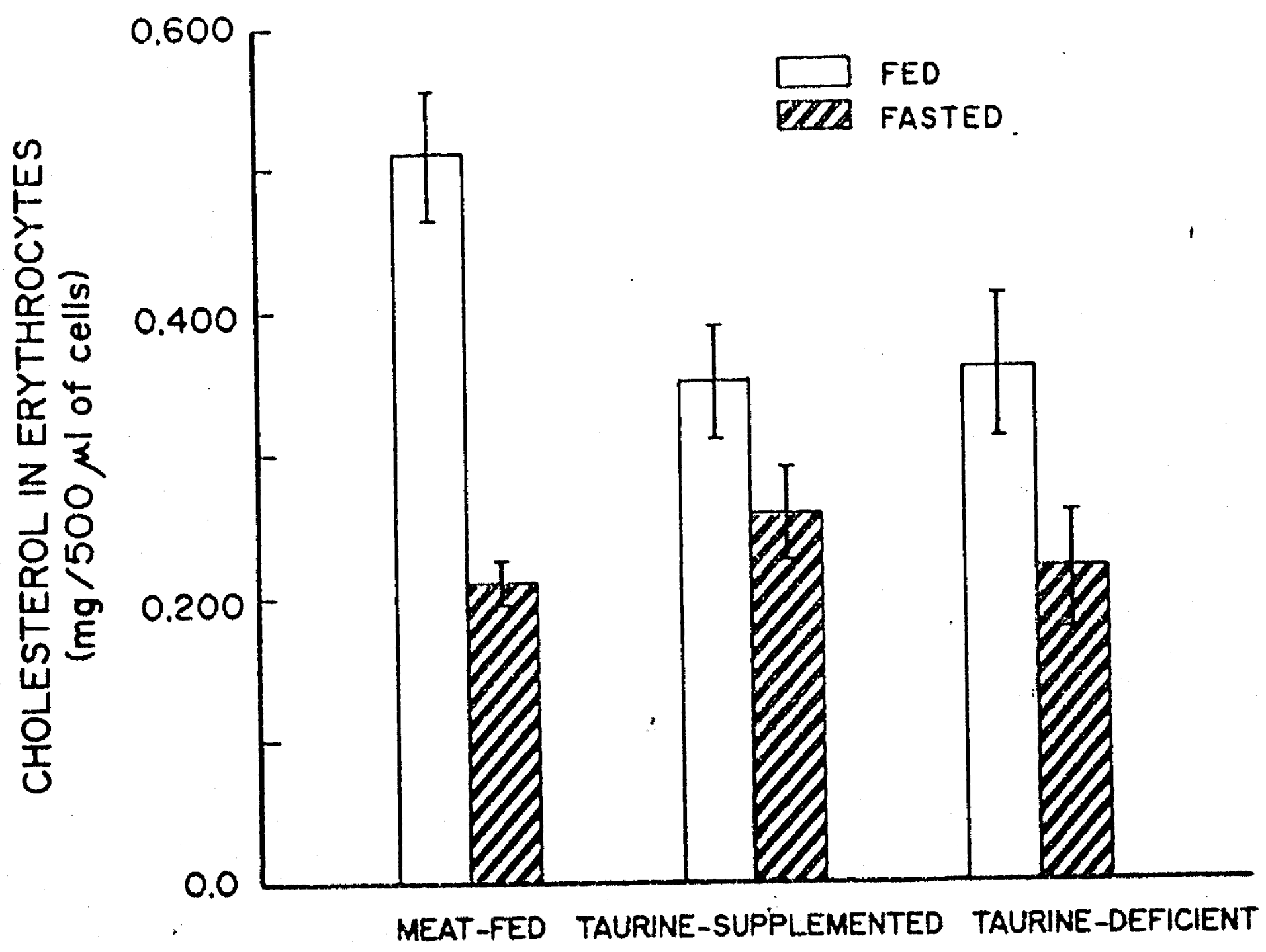


Fig. 5. Efecto de la dieta sobre la sensibilidad a lisis celular en eritrocitos de gato. Los regimenes ditarios son los definidos en la fig. 2. Se determinó la lisis celular espontánea inicial y después de 1 y 2 horas de incubación a 37 C. Los datos se expresan como el porciento de hemoglobina liberada al medio en cada tiempo con respecto al total en la preparación.

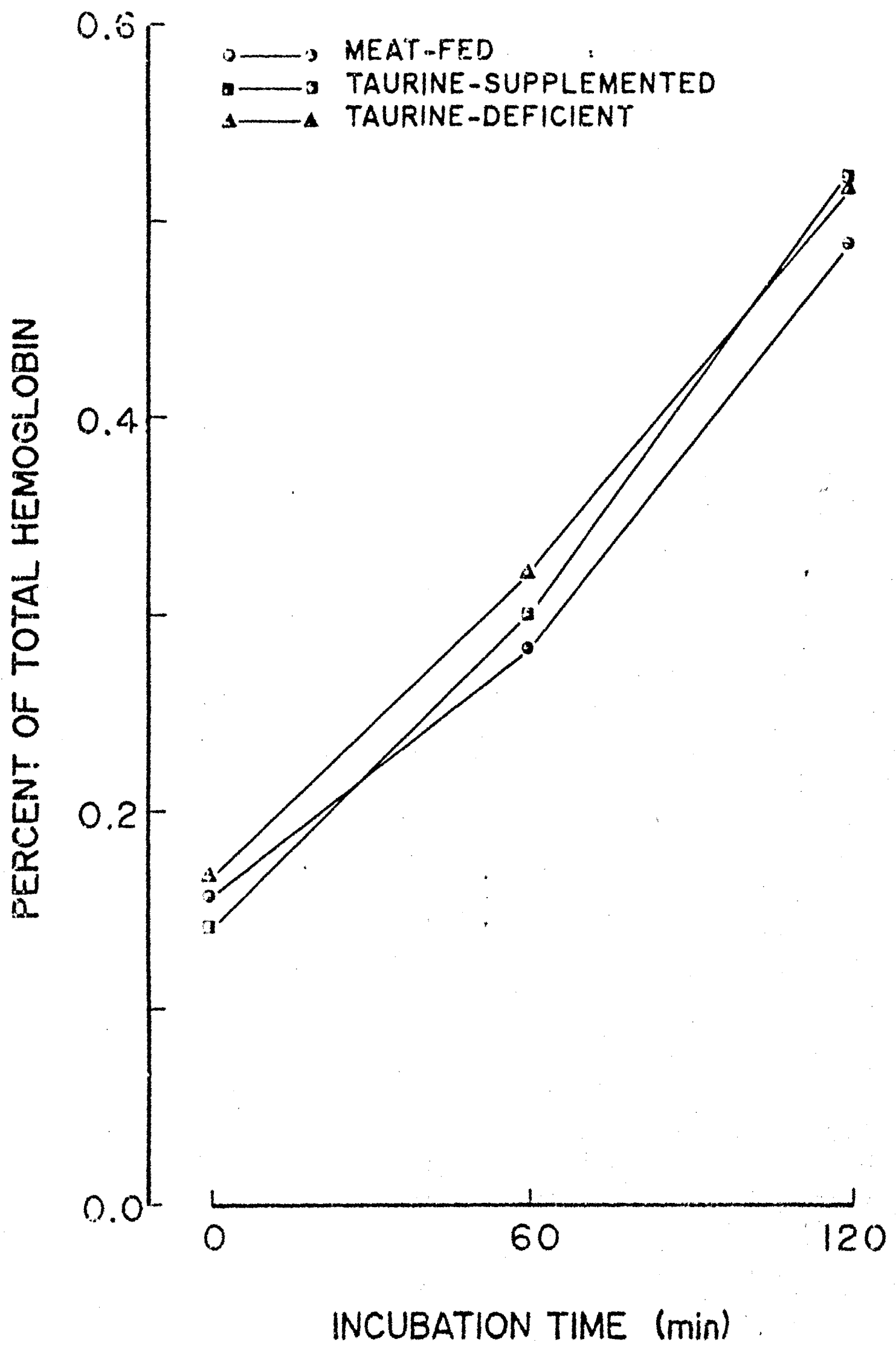


TABLA 3

COLESTEROL ENDOGENO TOTAL EN HIGADO DE GATOS  
DEFICIENTES EN TAURINA  
( mg / g de tejido )

CONDICION	Gatos 1-2	Gatos 3-4	Gatos 5-6
CONTROL	2.80	2.85	2.90
DEFICIENTE EN TAURINA	2.97	2.80	3.36

Los datos son promedios de determinaciones hechas por triplicado pero representan resultados individuales de tres animales por cada condición.

La figura 5 muestra el comportamiento lítico de los eritrocitos provenientes de los tres grupos de animales bajo estudio, expresado como el porcentaje de hemoglobina liberada al medio con respecto al total en la preparación. Como puede observarse, la lisis celular espontánea, tanto basal como después de una y dos horas de incubación, es indistinguible entre los tres grupos de animales.

Los niveles de colesterol hepático, en animales alimentados con dieta definida, libre o suplementada con taurina se muestran en la tabla 3. Se observa que la concentración de colesterol es muy semejante entre los individuos de ambos grupos (3 animales por condición).

### Discusión de datos de la sección 3.1

Una reducción en los niveles tisulares de taurina da lugar a una gama de alteraciones fisiológicas, cuya expresión y severidad dependen de la naturaleza de cada tejido. Entre éstos, los más explorados bajo esta condición incluyen a la retina y el corazón, los cuales contienen grandes pozas de taurina, y el sistema nervioso central; no obstante, la función precisa del aminoácido en estos sistemas, fin último de esas investigaciones, no ha sido aún establecida.

La retina y en particular los fotorreceptores (FR), han sido estudiados con particular énfasis bajo una condición de deficiencia en taurina debido, no sólo a las elevadas concentraciones que presentan en su composición, o a las ventajas técnicas que el tejido ofrece, sino que además constituye el único tejido hasta el conocimiento actual, cuya función fundamental, la detección de luz, se ve completamente cancelada debido a la severa desestabilización estructural que sufren los FR cuando la concentración del aminoácido disminuye por abajo de un nivel crítico.

El proceso degenerativo se inicia en los segmentos externos (SE) y se caracteriza por el hinchamiento inicial de la estructura y la pérdida del elevado grado de organización característico de los discos membranosos que contiene. Los estudios histopatológicos realizados en diversos modelos (Hayes et al., 1975; Pasantes-Morales et al., 1983; Sturman et al., 1984) sugieren una alteración inicial en la membrana plasmática que podría tener su origen en una pérdida del control de la permeabilidad selectiva, generando un desbalance osmótico. Por otra parte, es conocido que en estados iniciales de deficiencia en taurina, la poza hepática es una de las primeras en resentir la reducción en el aporte del aminoácido, expresándolo como una drástica disminución en la síntesis de ácidos biliares conjugados con taurina, así como un decremento neto en la concentración total de ácidos biliares (Rentschler et al., 1986)

En el presente estudio, se exploró la posibilidad de que durante un estado de deficiencia en taurina, algunas de las expresiones patológicas, por ejemplo la degeneración retiniana, fuesen causadas o acentuadas por la suposible reducción de las pozas de ciertos lípidos o compuestos liposolubles, entre éstos el colesterol y la vitamina E (-tocoferol), cuya absorción intestinal se ve influida por la presencia y disponibilidad de los ácidos biliares (Dietschy y Wilson, 1970; Thompson y O'Brien, 1981).

Los resultados aquí obtenidos en cuanto a niveles de colesterol circulante en animales deficientes en taurina, muestran que el anterior supuesto no es el caso. Los animales alimentados con la misma dieta, libre o suplementada con el aminoácido presentan niveles de colesterol similares, sugiriendo que la síntesis endógena podría estar balanceando la reducción de

la absorción dietaria. No obstante la falta de significancia estadística entre los valores de colesterol plasmático en los dos grupos de animales, se observa una tendencia consistente hacia un decremento en los gatos deficientes en taurina, tanto en la condición de ayuno como en los animales no ayunados. A pesar de lo anterior, la tendencia observada no sugiere una condición tal que disminuya de manera significativa la disponibilidad de colesterol para su inclusión en las membranas celulares. En apoyo a lo anterior, los resultados obtenidos en eritrocitos en cuanto a contenido de colesterol se refiere, muestran que estas células contienen niveles similares a sus controles durante la deficiencia en taurina. Además, los eritrocitos de gatos deficientes en taurina muestran una sensibilidad normal al proceso lítico inducido por incubación del tejido.

De estos estudios entonces, se desprende que los factores que conducen a la expresión del proceso degenerativo en la retina en gatos deficientes en taurina, no son debidos a una deficiencia en la absorción de colesterol, ya que ésta, aunque muy posiblemente se vea modificada por la baja disponibilidad de ácidos biliares, probablemente es balanceada por un incremento de la síntesis endógena.

Por otra parte, los estudios electroretinográficos en gatos suplementados con Vit-E apuntan hacia otra dirección. En este caso, ya que la biosíntesis no ocurre, es factible esperar una reducción considerable en la absorción de este compuesto y por ende de su disponibilidad. El ERG de animales deficientes en taurina y suplementados con Vit-E muestra que algunos parámetros fueron menos alterados (en comparación con aquéllos de animales deficientes no suplementados), lo cual se podría interpretar como que la reducción en la disponibilidad de Vit-E podría estar contribuyendo en la expresión de la degeneración retiniana. De hecho, la deficiencia en Vit-E provoca la desestabilización de los fotorreceptores (Robison et al., 1979, 1980); sin embargo tanto su expresión histopatológica como su curso temporal difieren claramente de lo que se observa cuando se depletan las pozas de taurina.

Por otra parte, en otros estudios donde se han probado los efectos estabilizantes de la taurina sobre diversos modelos celulares, incluyendo los segmentos externos (SE) de los FR, la Vit-E tiene efectos protectores sobre la estructura celular, aditivos a los del aminoácido. Lo anterior, aunado a un efecto per se de la Vit-E, sugieren un mecanismo de acción distinto entre los dos compuestos. (Pasantés-Morales et al., 1985; Pasantés-Morales y Cruz, 1984).

El tocoferol es un conocido antioxidante que ejerce sus efectos por medio de la fijación de radicales libres, impidiendo su interacción con otras moléculas. En la retina en particular, la vitamina E se acumula naturalmente y su función, se supone es precisamente la neutralización de radicales libres capaces de provocar reacciones de lipoperoxidación, a las cuales los SE de los fotorreceptores son particularmente sensibles. Luego

entonces, la desestabilización de los FR durante una deficiencia en taurina no es debida al parecer, a una disminución en los niveles de Vit-E, ya que el proceso patológico no es prevenido por su suplementación. No obstante, cuando la desestabilización ocurre, el proceso podría tomar un curso propio al propiciarse la peroxidación lipídica de las membranas que constituyen los segmentos externos de los fotorreceptores, al ser estos procesos autoperpetuables y ocurrir en un ambiente altamente propicio. Cabe recordar aquí el enriquecimiento de estas membranas en ácidos grasos poliinsaturados (Daemen, 1973), sustrato químico de dichas reacciones de lipoperoxidación. En estas condiciones, un suplemento con un antioxidante como la Vit-E podría retrasar la expresión del cuadro patológico o reducir su intensidad, pero sin combatir sus causas primarias, por lo que el proceso finalmente se expresa.



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Una reducción en las pozas endógenas de taurina provoca alteraciones de diversa índole e intensidad en los tejidos hasta ahora estudiados. Entre estos se encuentran la retina, el cerebro y el corazón; sin embargo, en ninguno de los casos se ha podido establecer con claridad el mecanismo que subyace a las alteraciones descritas. De hecho, los reportes que describen las anomalías en el corazón (Schaeffer et al., 1985; Lake et al., 1987) y el cerebro (Sturman et al., 1985; Palackal et al., 1986) bajo un estado de deficiencia en taurina, se han limitado a la descripción del fenómeno y pocos pasos se han dado hacia su caracterización.

Al confrontar las expresiones tisulares de la deficiencia en taurina, surge la pregunta sobre si tales alteraciones son debidas a modificaciones específicas en la fisiología de cada tejido, distintas entre sí, o si existe un denominador común entre todas ellas, es decir, que la alteración inicial ocurriera en un proceso celular muy básico, común a todos esos tejidos y que las diferencias en su expresión se debieran a las especializaciones inherentes a cada línea celular.

Las alteraciones desencadenadas por la reducción de las pozas de taurina, tanto aquellas descritas en la literatura como las reportadas aquí sobre músculo liso, coinciden en que el sitio de la modificación inicial podría ser la membrana plasmática. En ese orden de ideas, en el presente estudio se examinó una hipótesis, cuya consideración central era que la deficiencia en taurina podría provocar a su vez una reducción en la disponibilidad de colesterol para su inserción en las membranas celulares. Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de colesterol en el plasma, el hígado o en eritrocitos no son modificados durante el abatimiento de las pozas de taurina, a tiempos en los que procesos como la degeneración de los fotorreceptores se ha expresado totalmente. Lo anterior descarta entonces que la disponibilidad de colesterol sea un factor causal o influyente en la expresión de las alteraciones membranales observadas en los tejidos durante la deficiencia en taurina. Es probable que un proceso de ajuste en la biosíntesis y/o excreción del colesterol, equilibre la predecible disminución de su absorción intestinal.

Los resultados obtenidos en la retina en dos modelos animales de deficiencia en taurina, excluyen la posibilidad de que el aminoácido esté participando directamente en los procesos de fotoexcitación y fototransducción en los fotorreceptores, ya que la desestabilización ocurre aún en ausencia de estimulación luminosa. Más aún, el proceso es dependiente del grado de depleción de la poza de taurina, independientemente de si ésta es modificada por medios farmacológicos o por las condiciones de iluminación, por lo que el origen del fenómeno degenerativo debe situarse en otro nivel.

En este sentido, la suplementación de animales deficientes en taurina con diversos compuestos con efectos estabilizantes en otras membranas, proveyeron solamente una protección parcial o nula contra el daño producido por la luz. Esto sugiere que sólo la alta especificidad del receptor para la taurina por los fotorreceptores, y no además, que los mecanismos operantes en el mantenimiento de la estabilidad estructural de tales compuestos, son distintos en cada caso con el del aminoácido en cuestión.

Los estudios realizados en las preparaciones de tráquea e intestino, en donde se observa un incremento en la capacidad de respuesta del músculo liso en presencia de taurina, los resultados podrían ser explicados por una interacción entre la taurina y los flujos de calcio a través de la membrana plasmática. Dicha interacción ha sido previamente documentada en diferentes preparaciones de músculo, incluyendo el corazón (Chovan et al., 1980; Sebring y Huxtable, 1986), la musculatura esquelética (Huxtable y Bressler, 1973; Lehemann y Hamberger, 1984) y la musculatura lisa (Franconi et al., 1982a,c; Manzini et al., 1987). En esas preparaciones se ha observado un efecto dual de la taurina, ya que el aminoácido puede incrementar la fuerza contráctil o producir relajación, dependiendo de las condiciones experimentales.

En los estudios aquí presentados, la taurina produce per se un incremento en la actividad contráctil en preparaciones control, mientras que tal respuesta, así como aquella inducida por acetilcolina, se ven potenciadas por la condición de deficiencia en taurina. No obstante que con los datos presentados no es posible descartar un efecto presináptico del aminoácido, tanto la forma como la magnitud de las respuestas obtenidas, sugieren una acción directa de la taurina sobre las fibras musculares, facilitando el movimiento de calcio al interior celular y favoreciendo así la expresión de una respuesta amplificada. En el caso de los animales deficientes en taurina, la similitud entre las respuestas basales de éstos y sus controles respectivos, podrían indicar la existencia de un proceso de adaptación a las condiciones imperantes (baja taurina), por lo que la reexposición del músculo a concentraciones altas del aminoácido, provocaría un nuevo desequilibrio en los movimientos de calcio necesarios para la contracción, originando una amplificación en la respuesta contráctil.

Finalmente, de los estudios realizados en segmentos externos aislados de fotorreceptores, se concluyó que en ambos modelos de desestabilización implementados, -la exposición a luz o a un medio libre de cationes divalentes-, el origen del daño celular podría consistir en una alteración en la permeabilidad selectiva de la membrana a iones. Lo anterior se basa en la dependencia iónica de ambos fenómenos a la presencia de sodio y cloro, lo que sugiere que el movimiento de estos iones al interior celular subyace al proceso desestabilizante. La entrada de agua osmóticamente obligada por la sobrecarga iónica, explicaría el hinchamiento inicial de las estructuras, lo cual a su vez podría

7

ser el disparador de una desestabilización generalizada propiciada por otros factores. La efectiva protección que ejerce la taurina en estos modelos, sugiere una interacción del aminoácido con la membrana, que resulta en la regulación de la entrada de iones y/o de agua.

Como se ha observado, las consecuencias de una deficiencia en taurina en los diferentes sistemas celulares estudiados, parecen indicar que las respuestas provocadas en cada tejido son específicas y cualitativamente distintas entre sí. No obstante, tales modificaciones parecen ocurrir en todos los casos a nivel de la membrana plasmática, alterando los flujos iónicos específicos que ocurren en cada tejido de acuerdo a sus propiedades intrínsecas. En este sentido, la proposición de que la taurina podría ejercer sus acciones a través de una interacción con las regiones hidrofílicas de los fosfolípidos membranales (Huxtable, 1987), podría representar el tronco común de sus efectos en los distintos tejidos. Dicha interacción, de índole eléctrica, se establecería entre los grupos cargados de la membrana y los grupos amino y sulfonato de la taurina, los cuales se encuentran ionizados a pH fisiológico. Tal interacción le conferiría a la membrana una estabilidad estructural que redundaría en la optimización de los movimientos iónicos a través de ella.

## LITERATURA CITADA

- Adams, JC y Wenthold, RJ (1979) Distribution of putative amino acid transmitters, choline acetyl transferase and glutamate decarboxilase in the inferior colliculus. *Neuroscience* 4: 1947-1951.
- Allain, CA, Poon, LS, Chan, CSG, Richmond, W and Fu, PC (1974) Enzimatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470-475.
- Aleksandrov, AA, Kichanov, VD y Kichanov, IM (1979) Intracelular study of GABA and taurine action on neurons of cat sensoriomotor cortex. *J. Neurosci.* 4: 59-64.
- Awapara, J (1955) Taurine content of some animal organs. *Fed. Pro.* 14: 175.
- Awapara, J. (1956) The taurine concentration of organs from fed and fasted rats. *J. Biol. Chem.* 218: 571-576.
- Awapara, J. (1976) The metabolism of taurine in the animal. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 1-19.
- Azari, J y Huxtable, RJ (1980) The mechanism of the adrenergic stimulation of taurine influx in the heart. *Eur. J. Pharmacol.* 61: 217-223.
- Bailey, CH (1981) Visual system I. En: *Principles of Neural Sciences* (ER Kandel y JH Schwartz, Eds.) Elsevier, North Holland, New York. pp. 213-225.
- Barbeau, A. y Donaldson, J. (1973) Taurine in epilepsy. *Lancet* 2:387.
- Barbeau, A. y Donaldson, J. (1974) Zinc, taurine and epilepsy. *Arch. Neurol.* 30: 52-58.
- Bartoff, A y Norton, AL (1975) Simultaneous recording of photoreceptor potentials on the P III component of ERG. *Vis. Res.* 5: 527-533.
- Bergamini, L, Mutani, R, Delsedime, M y Durelli, L (1974) First clinical experience on the antiepileptic action of taurine. *Eur. Neurol.* 11: 261-269.
- Brueton, MJ, Berger, HM, Brown, GA, Ablitt, L, Lyangkarer, N y Wharton, BA (1978) Duodenal bile acid conjugation patterns and dietary sulphur amino acids in the newborn. *Gut* 19: 95-98
- Brown, KT (1968) The electroretinogram; its components and their origin. *Vision Res.* 8:633-677.

- Bryant, SH, Conte-Camerino, D, Franconi, F, Giotti, A y Mambrini, M (1985) Lack of antagonism by taurine on chloride channel block by anthracene-9-carboxylic acid in rat skeletal muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 86: 586P.
- Burnham, WM, Albright, P y Racine, RJ (1978) The effect of taurine on kindled seizures in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56: 497-500.
- Cavallini, D, De Marco, C y Mondovi, V (1961) The enzymatic conversion of cisteamine and thiocisteamine into thiotaurine and hipotaurine. *Enzymologia* 23: 101-110.
- Cavallini, D, De Marco, C, Mondovi, V y Stirpe, F (1954) The biological oxidation of hypotaurine. *Biochim. Biophys. Acta* 15: 301-303.
- Clark, RM y Collins, GGS (1976) The release of endogenous amino acids from the rat visual cortex. *J. Physiol. (Londres)* 262: 383-400.
- Cohen, AI, Mc Daniel, M y Orr, HT (1973) Absolute levels of some free amino acids in normal and biologically fractionated retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 12: 686-693.
- Collins, GGS, Anson, J y Probett, GA (1981) Patterns of endogenous amino acid release from slices of rat and guinea pig olfactory cortex. *Brain Res.* 204: 103-120.
- Conte-Camerino, D, Franconi, F, Mambrini, M, Mitolo-Chieppa, D, Bennardini, F, Failli, P, Bryant, SH y Giotti, A (1987) Effect of taurine on chloride conductance and excitability of rat skeletal muscle fibers. En: *The Biology of taurine: Methods and Mechanisms.* (RJ Huxtable, F Franconi y A Giotti, Eds.) Plenum Press, New York. pp. 207-216.
- Coyle, JT, Biziere, K, Schwarcz, R (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids in the neural retina. En: *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology* (EG McGeer, JW Olney y PL McGeer, Eds.) Raven Press, New York. pp. 177-188.
- Crabai, F, Sitzia, A y Pepeu, G (1974) Taurine concentration in the neurohypophysis of different animal species. *J. Neurochem.* 23: 1091-1092.
- Craig, C y Hartman, ER (1973) Concentration of amino acids in the brain of cobalt-epileptic rats. *Epilepsia* 14: 409-414.
- Curtis, DR, Dugan, AW, Felix, D, Johnston, GAR, y McLennan, H (1971) Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain Res.* 33: 57-73.
- Curtis, DR y Johnston, GAR (1974) Amino acids transmitters in the mammalian central nervous system. *Rev. Physiol.* 69: 97-188.

- Curtis, DR y Tebecis, AK (1972) Bicuculline and thalamic inhibition. *Exp. Brain Res.* 16: 210-218.
- Curtis, DR y Watkins, JC (1960) The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6: 117-141.
- Chazov, EI, Malchikova, LS, Lipina, NV, Azafov, GB y Smirnov, VN (1974) Taurine and the electrical activity in the heart. *Circ. Res., Suppl.* III, III-11-III-21.
- Chovan, JP, Kulakowski, EC, Benson, BW y Shaffer, SW (1979) Enhancement of calcium binding to rat heart sarcolemma. *Biochim. Biophys. Acta* 551: 129-136.
- Chovan, JP, Kulakowski, EC, Sheakowski, S y Shaffer, SW (1980) Calcium regulation by the low affinity taurine-binding site of cardiac sarcolemma. *Mol. Pharmacol.* 17: 295-300.
- Chubb, J y Huxtable, J (1978) Transport of biosynthesis of taurine in the stressed heart. En: *Taurine and Neurological Disorders* (A Barbeau y RJ Huxtable, Eds.) Raven Press, New York. pp. 161-178.
- Daemen, F (1973) Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 300: 255-258.
- Davidson, N. (1979) High potassium, veratridine and electrically induced release of taurine from the cerebellar cortex. *J. Physiol. (Paris)* 75: 673-676.
- De Belleruche, JS y Bradford, HF (1973) Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex. A reappraisal. *J. Neurochem.* 21: 441-451.
- Del Castillo, J y Katz, B (1954) The effects of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J. Physiol.* 60: 553-559.
- Dietrich, J y Diacono, J (1971) Comparison between ouabaine and taurine effects on isolated rat and guinea pig hearts in low calcium medium. *Life Sci.* 10: 499-507.
- Dolara, P, Agresti, A, Giotti, A y Pasquini, G (1973) Effect of taurine on calcium kinetics on guinea pig heart. *Eur. J. Pharmacol.* 24: 352-358.
- Dolara, P, Agresti, A, Giotti, A y Sorace, E (1976) The effect of taurine on calcium exchange of sarcoplasmic reticulum of guinea pig heart studied by means of dialysis kinetic. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 54: 529-533.
- Dolara, P, Ledda, F, Mugelli, A, Mantelli, L, Zilletti, L, Franconi, F y Giotti, A (1978) Effect of taurine on calcium, inotropism and electrical activity of the heart. En: *Taurine and Neurological Disorders.* (A Barbeau y RJ Huxtable, Eds.)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Raven Press, New York, pp. 151-159.

Dominguez, L, Montenegro, J y Pasantes-Morales, H (1989) A volume dependent chloride sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina.

*J. Neurosci. Res.* 22: 356-361

Dowling, JE y Ehinger, B (1975) Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the gold fish and *Cebus* monkey retinas. *Science* 188: 270-273.

Dowling, JE, Ehinger, B Hedden, WL (1976) The interplexiform cell: a new type of retinal neuron. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15: 916-925.

Dowling, JE y Ripps, H (1972) Adaptation in skate photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 60: 698-719.

Dupré, S y De Marco, C (1964) Activity of some animal tissues on the oxidation of cysteamine to hipotaurine in the presence of sulphide. *Ital. J. Biochem.* 13: 386-390.

Durelli, L, Mutani, R y Fassio, F (1983) The treatment of myotonia: evaluation of chronic oral taurine therapy. *Neurol.* 33: 559-603.

Emson, PC (1978) Biochemical and metabolic changes in epilepsy. En: *Taurine and Neurological Disorders* (A Barbeau y RJ Huxtable, Eds.) Raven Press, New York, pp. 319-338.

Enoch, JM, Scandrett, J y Tobey, FL (1973) A study of the effects of bleaching on the width and index of refraction of frog rod outer segments. *Vision Res.* 13: 171-183.

Farber, D y Brown, BM (1978) Cyclic GMP proposed role in visual cell function. *Vision Res.* 18:497-499.

Fellman, JH, Roth, ES y Fujita, TS (1978) Taurine is not metabolized to isethionate in mammalian tissue. En: *Taurine and Neurological Disorders* (A Barbeau y RJ Huxtable, Eds.) Raven Press, New York, pp. 19-24.

Franconi, F, Giotti, A, Manzini, S, Martini, F (1982a) The effect of taurine on high potassium and noradrenaline-induced contraction in rabbit ear artery. *Br. J. Pharmacol.* 75: 605-612.

Franconi, F, Giotti, A, Manzini, S, Martini, F, Stendardi, I y Zilletti, L (1982b) Observations on the action of taurine at arterial and cardiac levels. En: *Taurine in Nutrition and Neurology* (RJ Huxtable y H Pasantes-Morales, Eds.), Plenum Press, New York, pp. 181-190

- Franconi, F, Martini, F, Standardi, I, Matucci, R, Zilletti, R y Giotti, A (1982c) Effect of taurine on calcium level and contractility in guinea pig ventricular strips. **Biochem. Pharmacol.** 31: 3181-3186.
- Gaitonde, MK y Richter, D (1957) Metabolic reactions in the nervous system. En: **Metabolism of the Nervous System** (D. Richter, Ed.) Pergamon Press, London. pp. 449-455.
- García de Yébenes-Frous, J, Carlsson, A y Mena-Gómez, MA (1978) **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 304: 95-99.
- Gaull, GE (1982) Taurine nutrition in man. En: **Taurine in Nutrition and Neurology** (RJ Huxtable y H Pasantes-Morales, Eds.) Plenum Press, New York. pp. 89-95.
- Gaull, GE, Rassin, DK, Raiha, NCR y Heinonen, K (1977) Milk protein quality and quantity in low-birth-weight infants. III. Effects on sulfur amino acids in plasma and urine. **J. Pediatr.** 90: 348-355.
- Gruener, R, Bryant, HJ, Markovitz, D, Huxtable, RJ y Bressler, R (1976) Ionic actions of taurine on nerve and muscle membranes: electrophysiologic studies. En: **Taurine and Neurological Disorders** (A Barbeau y RJ Huxtable, Eds.) Raven Press, New York. pp. 225-246.
- Guidotti, A, Badiani, G y Giotti, A (1971) Potentiation of taurine of inotropic effect of strophanthin K on guinea pig isolated auricles. **Pharmacol. Res. Commun.** 3: 29-38.
- Guidotti, A, Badiani, G y Pepeu, G (1972) Taurine distribution in the cat brain **J. Neurochem.** 19: 431-435.
- Haas, HL y Höslí L (1973) The depression of brain stem neurons by taurine and its interactions with strychnine and bicuculline **Brain Res.** 52: 399-402.
- Hagins, WA y Yoshikami, S (1974) A role for Ca<sup>++</sup> in excitation of retinal rods and cones. **Exp. Eye Res.** 18: 299-305.
- Hardison, WGM (1978) Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine. **Gastroenterology** 75: 71-75.
- Hardison, WGM (1982) Changes in parameters of bile acid metabolism with taurine feeding in man. **Clin. Res.** 30: 92A.
- Hardison, WGM, Wood, CA y Proffitt, JH (1977) Quantification of taurine synthesis in the intact rat and cat liver. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 155: 55-58.
- Haslewood, GAD (1967) **Bile Salts** Methuen, London. pp. 16



- Haslewood, BAD y Wootton, V (1950) Comparative studies of "Bile Salts". I Preliminary survey. *Biochem. J.* 47: 584-597.
- Hayes, KC, Carey, RE y Schmidt, SY (1975a) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188: 949-951.
- Hayes, KC, Rabin, AR y Berson, EL (1975b) An ultrastructural study of nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats. *Am. J. Physiol.* 78: 505-524.
- Hayes, KC y Sturman, JA (1982) Taurine deficiency: a rationale for taurine depletion. En: *Taurine in Nutrition and Neurology* (RJ Huxtable y H Pasantes-Morales, Eds.) Plenum Press, New York. pp. 79-87.
- Hofman, AF y Small, DM (1967) Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Ann. Rev. Med.* 18: 333-376.
- Hope, DB (1957) The persistence of taurine in the brains of pyridoxine-deficient rats. *J. Neurochem.* 1: 364-369.
- Hoskin, FCG y Kordik, ER (1977) Hydrogen sulfide as a precursor for the synthesis of isethionate in the squid giant axon. *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 583-586.
- Hösli, L, Hösli, E, Andrés, PF y Wolff, JR (1975) Amino acids transmitters. Actions and uptake in neurons and glial cells of human and rat Central Nervous System tissue culture. En: *Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology* (M. Santini, Ed.) Raven Press, New York. pp. 473-488.
- Huxtable, RJ (1976) Metabolism and function of taurine in the heart. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 99-119.
- Huxtable, RJ (1987) From heart to hypothesis: a mechanism for the calcium modulatory actions of taurine. En: *The Biology of Taurine: Methods and Mechanisms.* (RJ Huxtable, F Franconi y A Giotti, Eds.) Plenum Press, New York. pp. 371-387.
- Huxtable, RJ y Bressler, R (1973) Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 323: 573-583.
- Huxtable, RJ y Bressler, R (1974a) Taurine concentration in congestive heart failure. *Science* 184: 1187-1188.
- Huxtable, RJ y Bressler, R (1974b) Elevation of taurine in human congestive heart failure. *Life Sci.* 14: 1353-1359.
- Huxtable, RJ y Bressler, R (1976) The metabolism of cysteamine to taurine. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 45-58.

- Huxtable RJ y Sebring, LA (1983) Cardiovascular actions of taurine. En: **Sulfur Amino Acids: Biochemical and Clinical Actions.** (K Kuriyama, TJ Huxtable y H Iwata, Eds.) Alan R Liss, Inc., New York, pp. 5-37.
- Ingoglia, NA, Sturman, JA, Rassin, DK y Lindquist, TD (1978) A comparison of the axonal transport of taurine and proteins in the goldfish visual system. **J. Neurochem.** 31: 161-170.
- Izumi, K, Ngo, TT y Barbeau, A (1978) Metabolic modulation in the Central Nervous System by taurine. En: **Taurine and Neurological Disorders** (A. Barbeau y RJ Huxtable, Eds.) Raven Press, New York, pp. 137-149.
- Jacobsen, JG y Smith, LH (1963) Comparison of decarboxylation of cysteine sulfinic acid-1-<sup>14</sup>C by human, rat and dog liver and brain. **Nature** 200: 575-577.
- Jacobsen, JG, Thomas, L.L. y Smith, LH (1964) Properties and distribution of mammalian L-cysteine sulfinic acid carboxylases. **Biochim. Biophys. Acta** 85: 103-116.
- Jacobsen, JG y Smith, LH (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiol. Rev.** 48: 424-511.
- Joseph, MH y Enson, PC (1976) Taurine and cobalt-induced epilepsy in the rat: A biochemical and electrocorticographic study **J. Neurochem** 27: 1495-1501.
- Kaczmarek, LK y Adey, WR (1974) Factors affecting the release of (<sup>14</sup>C) taurine from cat brain: The electrical effects of taurine on normal and seizure prone cortex. **Brain Res.** 76: 83-94.
- Kaczmarek, LK y Davidson, AN (1972) Uptake and release of taurine from rat brain slices. **J. Neurochem.** 19: 2355-2362.
- Kennedy, AJ y Neal, MJ (1978) The effect of light and potassium depolarization on the release of endogenous amino acids from the isolated rat retina. **Exp. Eye Res.** 26: 71-75.
- Kennedy, AJ y Voaden, MJ (1974) Distribution of free amino acids in the frog retina. **Biochem. Soc. Trans.** 2: 1256-1258.
- Khatter, JC, Soni, PL, Hoeschen, RJ, Alto, LE y Dhalla, NS (1981) Subcellular effects of taurine on guinea pig heart. En: **The Effects of Taurine on Excitable Tissues** (SW Schaffer, Baskin, SI y JJ Kocsis, Eds.) Spectrum Publications, New York, pp. 281-294.
- Konig, P, Kriechbaum, G, Presslich, O, Shubert, H, Shuster, P y Sieghart, W (1977) **Wien. Klin. Wochenshr.** 89: 111-113.
- Kontro, F. (1979) Components of taurine efflux in rat brain synaptosomes. **Neuroscience** 4: 1745-1749.

- Kontro, P, Marnela, KM y Oja, SS (1980) Free amino acids in synaptosomes and synaptic vesicles fractions of different bovine brain areas. *Brain Res.* 184: 129-141.
- Koyama, I (1972) Amino acids in the cobalt-induced epileptogenic and nonepileptogenic cat's cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 50: 740-752.
- Kramer, JH, Chovan, JP y Schaffer, SW (1981) The effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. *Am. J. Physiol.* 240: H238-H246.
- Kuo, CH y Miki, N (1980) Stimulatory effect of taurine on Ca-uptake by disc membranes from photoreceptor cell outer segments. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 94: 646-651.
- Kuriyama, K, Muramatzu, M, Nakagawa, K, y Kakita, K (1978) Modulating role of taurine on release of neurotransmitters and calcium transport in excitable tissues. En: *Taurine and Neurological Disorders* (A. Barbeau y RJ G.Huxtable, Eds.) Raven Press, New York. pp. 201-216.
- Lähdesmäki, P, Pasula, P y Oja, SS (1975) Effect of electrical stimulation and chlorpromazine on the uptake and release of taurine, GABA and glutamic acid in mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 25: 675-680.
- Laird, HE y Huxtable, RJ (1976) Effect of taurine on audiogenic seizures response in rats. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 267-274.
- Lake, N, Marshall, J y Voaden, MJ (1977) The entry of taurine into the neural retina and pigment epithelium of the frog. *Brain Res.* 128: 497-503.
- Lake, N, Roode, M y Nattel, S (1987) Effects of taurine depletion on rat cardiac electrophysiology: *in vivo* and *in vitro* studies. *Life Sci.* 40: 997-1005.
- Leach, MJ (1979) Effect of taurine on release of 3H-GABA by depolarizing stimuli from superfused slices of rat brain cerebral cortex *in vitro*. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 533-535.
- Lehmann, A y Hamberger, A (1984) Inhibition of cholinergic response by taurine in frog isolated skeletal muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 59-61.
- Lombardini, JB (1976) Regional and subcellular studies on taurine in the rat central nervous system. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 311-326.
- Lombardini, JB (1977) High affinity uptake system for taurine in tissue slices and synaptosomal fractions prepared from various regions of the rat central nervous system. Correction of transport data by different experimental

- procedures. *J. Neurochem.* 29: 305-312.
- Lopez-Colomé, AM, Erlij, D y Pasantes-Morales, H (1976) Different effects of calcium flux-blocking agents on light and potassium stimulated release of taurine from retina. *Brain Res.* 113: 527-534.
- Mandel, P, Pasantes-Morales, H y Urban, PF (1976) Taurine: A putative neurotransmitter in the retina. En: *Transmitters in the Visual Process IV* (SL Bonting, Ed.) Pergamon Press, LTD, Oxford. pp. 89-105
- Manzini, S, Castellucci, A, Franconi, F y Giotti, A (1987) An analysis of the effects of taurine on cellular and extracellular calcium mobilization in rabbit ear artery. En: *The Biology of Taurine: Methods and Mechanisms.* (RJ Huxtable, F Franconi y A Giotti, Eds) Raven Press, New York. pp. 181-188.
- Marnela, KM, Timonen, M y Lähdesmäki P (1984) Mass spectrometry analyses of brain synaptic peptides containing taurine. *J. Neurochem.* 43: 1650-1653.
- Mathur, RL, Kleithi, J, Ledig, M, Mandel, P (1976) Cysteine sulfinic acid carboxylase in the visual pathway of the adult chicken. *Life Sci.* 18: 75-82.
- Muramatzu, M, Kakita, K, Nakagawa, K y Kuriyama, K (1978) Modulating role of taurine on the release of acetylcholine and norepinephrine from neuronal tissues. *Jpn. J. Pharmacol.* 28: 259-268.
- Mutani, R, Durelli, L, Mazzarino, L, Valentini, C, Monaco, F, Sumero, S y Mondino, A (1977) Longitudinal changes in brain amino acids content occurring before, during and after epileptic activity. *Brain Res.* 122: 513-521.
- Nakagawa, K y Kuriyama, K (1979) Increased association of calcium in brain mitochondria in the presence of taurine. *Jpn. J. Pharmacol.* 29: 309-312.
- Nadi, NS, McBride, WJ y Aprison, MH (1977) Distribution of several amino acids in regions of the cerebellum of the rat. *J. Neurochem.* 28: 453-455.
- Neal, MJ y Massey, SC (1980) The release of acetylcholine and amino acids from the rabbit retina in vivo. *Neurochemistry* 1: 191-208.
- Nelson, R (1973) A comparison of electrical properties of neurons of *Necturus* retina. *J. Neurophysiol.* 36: 519-535.
- Oja, SS, Kontro, P y Lähdesmäki, P (1977) Amino acids as inhibitory transmitters. *Prog. Pharmacol* 1: 1-119.

- Okamoto, K y Namima, M (1978) Uptake, release and homo- and heteroexchanges diffusions of inhibitory amino acids in guinea pig cerebellar slices. *J. Neurochem.* 31: 1393-1402.
- Okamoto, K y Sakai, Y (1980) Localization of sensitive sites to taurine, GABA, glycine and  $\alpha$ -alanine in the molecular layer of guinea pig cerebellar slices. *Br. J. Pharmacol.* 69: 407-13.
- Orr, HT, Cohen, AI y Lowry, DH (1976) The distribution of taurine in the vertebrate retina. *J. Neurochem.* 6: 117-141.
- Orrego, F, Miranda, R y Saldate, C (1976) Electrically-induced release of labeled taurine, alpha and beta-alanine, glycine, glutamate and other amino acids from rat neocortical slices in vitro. *Neuroscience* 1: 325-332.
- Palackal, R, 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.
- Pasantés-Morales, H, Adame, RM y López-Colomé, AM (1979) Taurine effects on Ca-transport in retinal subcellular fractions. *Brain Res.* 172: 131-138.
- Pasantés-Morales, H, Bonaventure, N, Wioland, N y Mandel, P (1973c) Effect of intravitreal injection of taurine and GABA on chicken electroretinogram. *Int. J. Neurosci.* 5: 235-241.
- Pasantés-Morales, H, Domínguez, L, Montenegro, J y Morán, J (1988) A chloride-dependent component of the release of GABA and taurine from the chick retina. *Brain Res.* 459: 120-130.
- Pasantés-Morales, H y Gamboa, A (1980) Effects of taurine on  $^{45}$ -calcium accumulation by rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 34: 244-246.
- Pasantés-Morales, H, Lorient, C y Chatagner, F (1977) Regional and subcellular distribution of taurine-synthesizing enzymes in the rat central nervous system. *Neurochem. Res.* 2: 671-680.
- Pasantés-Morales, H, Mapes, C, Tapia, R y Mandel, P (1976) Properties of soluble and particulate cysteine sulfinic acid decarboxylase of adult and developing rat brain. *Brain Res.* 107: 579-589.
- Pasantés-Morales, H, Kleithi, J, Ledig, M y Mandel, P (1972) Free amino acids in chicken and rat retina. *Brain Res.* 41: 494-497.
- Pasantés-Morales, H, Kleithi, J, Ledig, M y Mandel, P (1973a) Influence of light and dark in the free amino acid pattern of the developing chick retina. *Brain Res.* 57: 59-65.

- Pasantes-Morales, H, Klethi, J, Urban, PF Mandel, P (1979) The effect of electrical stimulation, light and amino acids on the efflux of <sup>35</sup>S-Taurine from the retina of the domestic fowl. *Exp. Brain Res.* 19: 131-141.
- Pasantes-Morales, H, Quesada, O y Cárabez, A (1981) Light stimulated release of taurine from kainic acid treated chicks. *J. Neurochem.* 36: 1583-1586.
- Pasantes-Morales, H, Urban, PF, Klethi, J y Mandel, P (1973b) Light stimulated release of <sup>35</sup>S- taurine from chicken retina. *Brain Res.* 51: 375-378.
- Pasantes-Morales, H, Wright, CE y Gaull, GE (1984) Protective effect of taurine, zinc and tocopherol on retinol-induced damage in human lymphoblastoid cells. *J. Nutr.* 114: 2256-2261
- Peck, EJ y Awapara, J (1967) Formation of taurine and isethionic acid in rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 141: 499-506.
- Perry, TL, Hansen, S, Kennedy, J, Wada, JA y Thompson, Gb (1975) Amino acids in human epileptogenic foci. *Arch. Neurol.* 32: 752-754.
- Peterson, MB, Mead, RJ y Welty, JD (1973) Free amino acids in congestive heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 5: 139-147.
- Placheta, P, Singer, E, Sieghart, W y Karobath, M (1979) Properties of <sup>3</sup>H-taurine release from crude synaptosomal fractions of rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 4: 703-712.
- Politis, MJ e Ingoglia, NA (1979) Axonal transport of taurine along neonatal and young adult rat optic axons *Brain Res.* 166: 221-231.
- Rassin, DK, Gaull, GE, Heinonen, K y Rähä, NCR (1977a) Milk protein quality and quantity in low-birth-weight infants. II. Effects of selected aliphatic amino acids in plasma and urine. *Pediatrics* 59: 407-422.
- Rassin, DK, Gaull, GE, Rähä, NCR y Heinonen, K (1977b) Milk protein quality and quantity in low-birth-weight infants. IV. Effects on tyrosine and phenylalanine in plasma and urine. *J. Pediatr.* 90: 356-360).
- Rassin, DK y Sturman, JA (1975) Cysteine sulfinic acid decarboxylase in rat brain: Effect of vitamin B6 deficiency on soluble and particulate components. *Life Sci.* 16: 875-882.
- Rassin DK, Sturman, JA y Gaull GE (1977c) Taurine in developing rat brain: Subcellular distribution and association with synaptic vesicles of (<sup>35</sup>S) taurine in maternal, fetal and neonatal rat brain. *J. Neurochem.* 28: 41-50.

- Read, WO, Jaqua, MJ y Steffen, RP (1980) The effect of taurine on contractility and sarcolemmal calcium binding of bullfrog hearts *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 164: 576-582.
- Read, WO y Welty, JD (1963) Effect of taurine on epinephrine- and digoxin-induced irregularities of dog heart. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 139: 283-289.
- Rentulla, MA, Katz, S y Applegarth, DA (1979) Effect of taurine on passive ion transport in rat brain synaptosomes. *Life Sci.* 24: 1885-1892.
- Rentschler, LA, Hirschberger, LL y Stipanuk, MH (1986) Response of the kitten to dietary taurine depletion: effects on renal reabsorption, bile acid conjugation and activities of enzymes involved in taurine synthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 319-325.
- Rigo, J. y Senterre, J (1977) Is taurine essential for the neonate? *Biol. Neonate* 32: 73-76.
- Robison, WG, Kuwabara, T y Bieri, JG (1979) Vitamine E deficiency and the retina: photoreceptor and pigment epithelial changes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18: 683-690.
- Robison, WG, Kuwabara, T y Bieri, JG (1980) Deficiencies of vitamine E and A in the rat, retinal damage and lipofuscine accumulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19: 1030-1037.
- Salceda, R, López-Colomé, AM y Fasantés-Morales, H (1977) Light stimulated release of 35S-taurine from frog retina rod outer segments. *Brain Res.* 135: 186-191.
- Schaeffer, SW, Seyed-Mozaffari, M, Kramer, J y Tan, BH (1985) Effect of taurine depletion on cardiac contractility and metabolism. En: *Taurine: Biological Actions and Clinical Perspectives*. (S Oja, L Athée, P Kontro y MK Paasonen, Eds.) Alan R Liss, New York. pp. 167-175.
- Schersten, T (1979) Bile acid conjugation. En: *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis* (WH Fishman, Ed.) Academic Press, New York. pp. 75.
- Schmidt, SY, (1978) Taurine fluxes in isolated rat and cat retinas: effect of illumination. *Exp. Eye Res.* 26: 529-537.
- Schmidt, SY (1981) Taurine in retinas of taurine-deficient cats and RCS rats. En: *The Effects of Taurine on Excitable Tissues* (SW Schaffer, SJ Baskin y JJ Kocsis, Eds.) Spectrum Press, New York. pp. 175-185.
- Schmidt, SY, Berson, EL y Hayes, KC (1976) Retinal degeneration in cats fed casein: I. Taurine deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15: 673-678.

- Schmidt, SY, Berson, EL, Watson, G y Huang, C (1977) Retinal degeneration in cats fed casein: III. Taurine deficiency and ERG amplitudes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 673-678.
- Sebring, L y Huxtable, RJ (1985) Taurine modulation of calcium binding to cardiac sarcolemma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 445-451.
- Shacher, SM, Holtzman, E y Hood, DC (1974) Uptake of the horseradish peroxidase by frog photoreceptor synapses in the dark and the light. *Nature* 249: 261-263.
- Solis, JM, Herranz, AS, Herreras, O, Lerma, J y Martín Del Río, R (1988) Low chloride-dependent release of taurine by a furosemide-sensitive process in the in vivo rat hippocampus. *Neuroscience* 24: 885-891.
- Spaeth, DG y Schneider, DL (1974) Taurine synthesis, concentration and bile salt conjugation in rat, guinea pig and rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147: 855-858.
- Spaeth, DG y Schneider, DL (1976) Taurine metabolism: Effects of diet on bile salt metabolism. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 35-44.
- Starr, MJ (1973) Effect of dark adaptation on the GABA system in the retina. *Brain Res.* 59: 331-338.
- Sturman, JA (1973) Taurine pool sizes in the rat: effect of vitamin B-6 deficiency and high taurine diet. *J. Nutr.* 103: 1566-1580.
- Sturman, JA y Gauli, GE (1976) Taurine in the brain and liver of the developing human and Rhesus monkey. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 73-84
- Sturman, JA y Hayes, KC (1980) The biology of taurine in nutrition and development. *Adv. Nutr.* 3: 231-299.
- Sturman, JA, Moretz, RC, French, JH y Wisniewski, HM (1985) Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J. Neurosci. Res.* 13: 405-416.
- Sumizu, K (1962) Oxidation of hypotaurine in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 63: 210-212.
- Thurston, JH, Hanhart, RE y Dirg, JA (1980) Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26: 1561-1568.
- Thurston, JH, Hanhart, RE y Nelson, JS (1987) Adaptive decreases of amino acids (taurine in particular), creatine and electrolytes prevent cerebral edema in chronically hyponatremic mice. *Metabolic Brain Res. Dis.* 2: 223-241.



- Tiedemann, F y Gmelin, LH (1827) Einige neue bestandtheile der galle des ochsen. *Ann. Physik. Chem.* 9: 326-337.
- Tomita, T (1970) Electrical activity of vertebrate photoreceptors. *Quant. Rev. Biophys.* 3: 179-222.
- Trifonov, YA (1968) Study of synaptic transmission between photoreceptor and the horizontal cell using electrical stimulation of the retina. *Biofizika* 13: 809-817.
- Truswell, AS, McVeigh, S, Mitchell, WD y Bronte-Stewart, B (1965) Effects in man of feeding taurine on bile acid conjugation and serum cholesterol levels. *J. Athero. Res.* 5: 526-532.
- van Gelder, NM (1972) Antagonism by taurine of cobalt-induced epilepsy in cat and mouse. *Brain Res.* 47: 157-165.
- van Gelder, NM y Courtois, A (1972) Close correlation between changing content of specific amino acids in epileptogenic cortex of cats and severity of epilepsy. *Brain Res.* 43: 477-484.
- van Gelder, NM, Sherwin, AL y Rasmussen, T (1972) Amino acid content of epileptogenic human brain: Focal versus surrounding regions. *Brain Res.* 40: 385-393.
- Van Gelder, NM (1976) Rectification of abnormal glutamic acid levels by taurine. En: *Taurine* (RJ Huxtable y A Barbeau, Eds.) Raven Press, New York. pp. 293-302.
- Wada, JA, Osawa, T, Wake, A y Corcoran, ME (1975) Effects of taurine on kindled amygdaloid seizures in rats, cats and photosensible baboons *Epilepsia* 16: 229-234.
- Wade, JV, Olson, JP, Samson, FE, Nelson, SR y Pazdernik, TL (1988) A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 45: 335-344.
- Voaden, MJ, Lake, N, Marshall, J y Morjaria, B (1977) Studies on the distribution of taurine and other neuroactive amino acids in the retina. *J. Neurochem.* 26: 609-611.
- Watkins, JB, Järvenpää, AL, Rähä, N, Szczepanik Van Leewen, P, Klein, PD, Rassin, DK y Gauli GE (1979) Regulation of bile acid pool size: role of taurine conjugates. *Pediat. Res.* 13: 410-415.
- Welty, JD y Read, WD (1962) Synthesis of taurine and isethionic acid by dog heart slices. *J. Biol. Chem.* 237: 1521-1522.
- Welty, JD y Welty, MC (1981) Effects of taurine in subcellular calcium dynamics in the normal and cardiomyopathic hamster heart. En: *The Effects of Taurine on Excitable Tissues* (SW Schaffer, SI Baskin y JJ Kocsis, Eds.) Spectrum Press, New York. pp. 295-312.

- Warblin, FS (1979) Integrative pathways in local circuits between slow-potential cells in the retina. En: **Neurosciences: Four Study Program** (FO Schmitt y FG Worden Eds.) MIT Press, Cambridge, Mass. pp. 193-211.
- Wheler, GHT, Bradford, HF, Davidson, AN y Thompson, EJ (1979) Uptake and release of taurine from cerebral cortex slices and their subcellular compartments. **J. Neurochem.** 33: 331-338.
- Williams, M, Risley, EA y Totaro, JA (1980) Interaction of taurine and -alanine with central nervous system neurotransmitter receptors. **Life Sci.** 26: 557-560.
- Wilson, BW, Peterson, DW y Lilyblade, AL (1965) Free amino acids of developing skeletal musculature of normal and genetically dystrophic chickens. **Proc. Soc. Expl. Biol. Med.** 119: 104-108.
- Yamaguchi, K, Sakakibara, S, Asamizu, J y Ueda, I (1973) Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. Measurement of cysteine metabolism *in vivo* and the activation of *in vivo* activity of cysteine oxidase. **Biochim. Biophys. Acta.** 297: 48-59.
- Yoshikami, S y Hagins, WA (1973) Control of the dark current in vertebrates rods and cones. En: **Biochemistry and Physiology of the Visual Pigments** (H. Langer, Ed.) Spring Verlag, New York. pp. 245-255.

# 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD O ESCUELA MEDICINA (POSGRADO)  
CLAVE 11281

D. EN CIENCIAS BIOMEDICAS

HOJA NO. 1

NO. PROG.	Rollo # <u>1</u> A U T O R	T I T U L O	A Ñ O
1	JUAREZ OROPEZA, MARCO A.	PARTICIPACION DE DIFERENTES ...	1990
2	MARVAN GARDUÑO, MARIA LUISA.	ACCION DE DIVERSOS TRATAMIENTOS ...	"
3	MEJIA MEJIA, MARIA VICTORIA	SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS SINGENICAS ...	"
4	PARDO VAZQUEZ, JUAN PABLO.	ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA ...	"
5	QUESADA GARCIA, OCTAVIO.	ALTERACIONES EN TEJIDOS EXITABLES ...	"

FACULTAD DE

MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CLAVE : 112 81

AÑO : 1990