

00562

3

2 ejem.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE: QUIMICA

**TITULO: IDENTIFICACION DE RESIDUOS DE AMINOACIDOS
ESENCIALES PARA EL MECANISMO DE TRANSPORTE
DE TAURINA COMO OSMOREGULATOR EN ASTROCIITOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :

MARTINEZ MARTINEZ, ALEJANDRO.

MEXICO D.F. 1994



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.

U N Bm.

Aut: Martínez Martínez, Alejandro

Tit: Identificación de residuos de aminoácidos
esenciales para el mecanismo de transporte de
taurina como osmoefector en astrocitos.

grado: maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica)

La presente tesis se realizó bajo la tutoría de la Doctora Herminia Pasantes-Morales del departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular y bajo la asesoría del Doctor Salvador Uribe del Instituto de Fisiología Celular y la Doctora Rosario Muñoz Clarés del departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química.

1994



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN.

LIC. ANTONIO DIAZ GARCIA.
JEFE DE LA UNIDAD DE
REGISTRO E INFORMACION.
CIUDAD UNIVERSITARIA.
P R E S E N T E .

Me es grato informarle que el alumno, ALEJANDRO MARTINEZ, presentará próximamente su Examen para obtener el grado de Maestra Ciencias Químicas (Bioquímica), ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Antonio Peña.
Primer Vocal:	Dra. Marina Gavilanez Ruiz.
Secretario:	Dra. Rocio Salceda.
Primer Suplente:	Dr. Julio Morán.
Segundo Suplente:	Dr. Marcelino Cerejido.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 18 de Noviembre de 1993.

DR. ANDONI GARRITZ RUIZ.
DIRECTOR.

C.c.p. Interesado.
C.c.p. Integrantes del Jurado.
C.c.p. Coordinador de Area.

DEDICATORIAS

A mi esposa Bertha Cecilia tan indefinible como sublime

A la mujer que sobradamente gana su titulo, mi Madre

*A ti, que en vida supiste ser Padre y
Amigo.*

A todos ustedes, mis queridos Hermanos

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que a través del CONACYT y de la Facultad de Química de la UNAM me permitieron dar el mejor de mis esfuerzos.

A la Dra. Herminia Pasantes-Morales por su gran labor formadora.

A los Dres. Julio Morán, Rosario Muñoz, Salvador Uribe, Antonio Peña, Rocío Salceda, Marina Gavilanez y Marcelino Cerejido por sus valiosos comentarios y aportaciones de todo tipo durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Octavio Quezada García por su paciencia, esfuerzo y entrega total a cada una de las partes del escrito.

A mi amigo el Sr. Miguel Hernández y su familia de quienes recibí todas las formas concebibles de apoyo.

Al Dr. Roberto Sánchez por seguir la trayectoria experimental de manera activa con valiosas aportaciones.

A Guillermo, Carmen, Jorge, Elizabeth, Silvestre y Adriana por compartirme su amistad.

A todo el personal del Instituto de Fisiología Celular que de alguna u otra manera estuvieron siempre presentes.

A la familia Martínez Reyna quienes me aceptaron como otro miembro de su familia.

INDICE:

INTRODUCCION	1
-Presión osmótica.....	1
MECANISMOS DE REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR	3
-Moléculas osmóticamente activas.....	5
MECANISMOS IONICOS IMPLICADOS EN LA REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR	6
-Flujos iónicos activados en la regulación del volumen celular	6
-Variaciones del volumen celular en condiciones isosmóticas.....	8
AMINOACIDOS LIBRES EN LA REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR	11
-Taurina.....	11
--Síntesis y metabolismo.....	12
-Mecanismos subyacentes a los flujos transmembranales de taurina.....	13
-Posibles funciones biológicas.....	14
-La taurina como osmoefector.....	15
-La taurina como osmoefector en el Sistema Nervioso.....	17
-Liberación de taurina y comunicación intracelular.....	19
-Características del flujo de la taurina por difusión activado por hiposmolaridad en astrocitos en cultivo.....	20
OBJETIVO	22
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	27
-Flujo difusional de la taurina estimulado por hiposmolaridad.....	27
EFFECTO DE LA MODIFICACION DE LOS GRUPOS SH EN LA SALIDA DE TAURINA	29
-Organomercuriales.....	29
-Maleimidias.....	31
-Haloacetatos.....	36
-Efecto de los modificadores SH en el volumen de los astrocitos.....	37
MODIFICACION DE LAS ARGININAS	38
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48

INTRODUCCION

Las membranas biológicas son bicapas lipídicas en las que se intercalan proteínas que varían con cada tipo de membrana y de célula. Algunas de estas proteínas transmembranales le confieren a la membrana propiedades de permeabilidad que pueden ser poros y canales de transporte pasivo o activo, bombas y transportadores moleculares o iónicas. Se dice que una membrana es permeable si todos los solutos pueden atravesarla; si una membrana permite el paso únicamente de ciertos solutos, se denomina semipermeable, o con permeabilidad selectiva.

Presión osmótica

El mecanismo más sencillo mediante el cual una solución puede atravesar la membrana es por difusión simple. En efecto, si se representa la membrana de una forma muy simple, como compuesta solamente por poros permeables al agua, una diferencia en la presión hidrostática entre ambos lados de la membrana produce un flujo de agua a su través. Suponiendo ahora que se tienen dos soluciones del mismo compuesto pero de distinta concentración, separadas por una membrana semipermeable que permite el paso del solvente pero no del soluto, se producirá un flujo del solvente que irá de la zona menos concentrada a la de mayor concentración; este flujo (J) será proporcional a la diferencia de concentraciones y se define como:

$$J = -k(\Delta C)$$

donde k es una constante de proporcionalidad y ΔC es la diferencia de concentración entre los compartimientos.

En el caso de que existan distintas concentraciones y presiones hidrostáticas diferentes, el flujo total (J_v) será determinado por ambos factores y se describe entonces como:

$$J_v = L_p \Delta_p - k C$$

donde L_p es el coeficiente de permeabilidad y Δ_p es la diferencia de presión entre los dos compartimientos.

El producto $k \Delta C$ tiene unidades de presión y se denomina *presión osmótica*. Como puede deducirse, es ésta la presión negativa que debe ejercerse sobre el compartimiento con mayor concentración de osmolitos para contrarrestar cualquier movimiento neto del solvente proveniente del compartimiento con menor concentración de osmolitos.

En un sistema biológico las soluciones *isomóticas* son aquellas que poseen una misma presión osmótica que el compartimiento intracelular, mientras que las que presentan una presión osmótica diferente son *anisomóticas*: éstas pueden ser *hiposmóticas*, si la presión osmótica que ejercen es menor, o *hiperosmóticas* cuando la presión osmótica que ejercen es mayor.

Las células animales y vegetales poseen membranas semipermeables, es decir permiten el movimiento de agua pero impiden el flujo de osmolitos. Por ello, toda vez que la célula sea expuesta a un medio anisomótico, estableciéndose un gradiente osmótico entre su interior y el medio extracelular, sufrirá un cambio en su volumen al moverse agua de un compartimiento a otro para contrarrestar dicho gradiente. En el caso de un medio hiperosmótico, la célula perderá agua, tornando su interior más concentrado hasta disipar el gradiente. En el caso de un medio hiposmótico, la célula ganará agua hasta balancear su concentración de osmolitos con los del medio extracelular.

El flujo de agua a través de la membrana celular puede ser :

1. por movimientos pasivos en los que el agua atraviesa la membrana por canales pasivos permanentemente abiertos, principalmente de K^+ y Cl^- , en estos canales el agua es acarreada por el grado de hidratación del ion.
2. a través de canales proteicos específicos para el agua; éstos se han clonado y expresado en diferentes tipos celulares (Fushimi, K. y Cols., 1993; Solomon y Cols., 1984).
3. por medio de sistemas contráctiles vesiculados.

MECANISMOS DE REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

En condiciones isosmóticas, las células diferenciadas presentan un cierto volumen determinado por el linaje celular al que pertenecen; es decir, su volumen está en estado estacionario. Cuando el medio extracelular se vuelve hiperosmótico, el volumen celular disminuye como consecuencia de la salida de agua intracelular, obedeciendo a los principios fisicoquímicos ya mencionados. Por el contrario, en un medio extracelular hiposmótico, la célula se hincha por la entrada de agua osmóticamente obligada. En cualquiera de las condiciones anteriores, el aumento o disminución del volumen celular es una consecuencia directa de los flujos de agua que sólo obedecen las leyes de la ósmosis.

La mayoría de las células animales sin embargo, posee mecanismos por medio de los cuales tiende a recuperar su volumen estacionario aún con la persistencia de condiciones anisomóticas. Estos mecanismos son respuestas activas de las células, que requieren un gasto energético y como se explicará más adelante, consisten en modificaciones de la

permeabilidad de la membrana a distintos solutos osmóticamente activos (Olson y Cols., 1986).

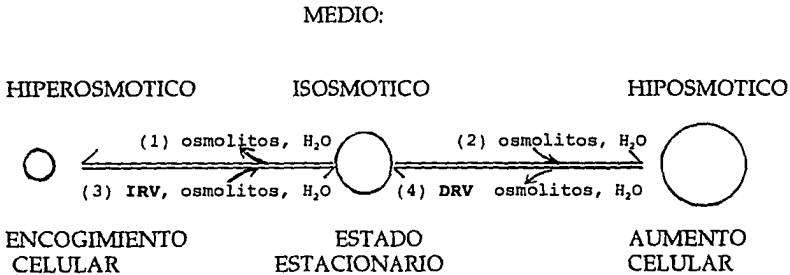
Como puede observarse, los cambios del volumen celular en condiciones anisomóticas pueden separarse en dos procesos seguidos en el tiempo, los cuales son:

1. Una variación en el volumen celular como consecuencia de los flujos de agua gobernados por la ósmosis.

2. La tendencia a recuperar el volumen original aún bajo la persistencia de la condición anisomótica. Esta segunda fase recibe el nombre de regulación del volumen celular.

La regulación del volumen celular puede ser de dos tipos: 1. un incremento regulador del volumen celular (IRV) que se presenta después de un encogimiento provocado por un medio hiperosmótico, y 2. un decremento regulador del volumen celular (DRV), el cual se presenta después de un hinchamiento provocado por un medio hiposmótico.

Lo anterior se puede representar con el esquema siguiente:



Las flechas que se alejan del estado estacionario (1 y 2) indican los cambios en el

volumen celular como consecuencia de los flujos de agua activados por ósmosis. Las flechas que convergen al estado estacionario (3 y 4) representan los procesos de regulación del volumen celular.

Por lo anterior, puede considerarse de una manera simplista que la regulación del volumen celular es una consecuencia de los mecanismos que regulan las osmolaridades entre los compartimientos intra y extracelulares.

Moléculas osmóticamente activas

Si bien las membranas celulares son altamente permeables al agua, no es el caso para la mayoría de los solutos, que en el reposo se encuentran en distintas concentraciones entre los dos compartimientos, debido por una parte, a la impermeabilidad de la membrana celular y por otra, a los mecanismos de transporte activo como las bombas iónicas y los translocadores. Los solutos son moléculas osmóticamente activas que al encontrarse en solución, contribuyen al valor total de la presión osmótica.

Los principales solutos utilizados en los mecanismos de regulación del volumen celular son los iones inorgánicos K^+ , Na^+ y Cl^- y algunos iones orgánicos y moléculas, como ciertos azúcares no cargados, aminoácidos, purinas, polialcoholes así como aniones mono y divalentes, como el bicarbonato y el fosfato (Pierce y Greenberg., 1972; Armende y Pierce., 1980; Perisamy y Cols., 1992).

MECANISMOS IONICOS IMPLICADOS EN LA REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

Las vías de flujo de los iones inorgánicos involucrados en los procesos de regulación del volumen celular son los acarreadores, las bombas y los canales. Las bombas transportan activamente a los iones contra un gradiente electroquímico y requieren de energía. Los canales son poros proteicos incrustados en la membrana que permiten a los iones moverse rápidamente en favor de su gradiente electroquímico (Jesell y Kandel, 1991). Existen canales de K^+ activados por estiramiento de la membrana (Gujaray y Sachs., 1984; Islas y Cols., 1993); éstos podrían activarse durante los momentos de distensión celular en condiciones de hiposmolaridad.

Los osmolitos orgánicos son acumulados en el interior celular por transportadores específicos de dos tipos: transportadores dependientes de Na^+ , como los de los azúcares y aminoácidos, y translocadores iónicos, los cuales pueden intercambiar distintas especies iónicas entre los compartimientos intra y extracelulares como el de cloro y el bicarbonato (Grinstein y Cols., 1984; Hoffman., 1987; Yantorno y Cols., 1989, Macleod y Hamilton., 1991).

Estos transportadores pueden estar sujetos a modulación por segundos mensajeros y podrían participar en los flujos salientes de sus osmolitos respectivos (Hoffmann 1992).

Flujos iónicos activados en la regulación del volumen celular

Los iones intracelulares K^+ y Cl^- están activamente involucrados en el DRV, ya que la

mayoría de las células que pueden regular su volumen, responden a un hinchamiento con una pérdida neta de K^+ y Cl^- , produciéndose así una salida obligada de agua dirigida por el gradiente osmótico. (Lauf., 1985; Eveloff y Warnek., 1987). El mecanismo molecular responsable de esta pérdida de iones no es el mismo en los distintos tipos celulares. Tanto en células epiteliales como en eritrocitos de aves, peces y mamíferos, el flujo iónico sensible a volumen es mediado por el cotransportador K^+/Cl^- eléctricamente neutro, por lo que en estos sistemas el DRV es inhibido por drogas que bloquean a este sistema de transporte, como la furosemida y la bumetanida (Ussing., 1982; Kregenow., 1971 Lauf., 1985; Parker., 1983). En otras células, incluyendo células ascíticas de Erlich y linfocitos, el K^+ y el Cl^- salen de la célula por medio de vías conductoras, las cuales están separadas pero pueden ser interdependientes (Hoffman., 1987; Grinstein y Cols., 1984). El DRV que se induce en parte por la activación del cotranportador K^+/Cl^- es por lo general muy lento, con una duración de minutos a horas, mientras que si el proceso se efectúa a través de canales iónicos la respuesta es muy rápida y la regulación tiene lugar entre 5 y 10 minutos (Lauf., 1985). Las vías conductoras rápidas permanecen latentes en condiciones isosmóticas y son activadas cuando existen cambios en el volumen celular (Hoffmann., 1987). Hasta este momento no está claro si el incremento en el volumen celular es una señal para activar estos movimientos iónicos o si éstos ocurren en respuesta a una o algunas señales intracelulares producidas a su vez por un cambio en el volumen.

El IRV, podría estar mediado por la activación de dos sistemas cotranportadores eléctricamente neutros, ya sea $Na^+/K^+/2Cl^-$ o Na^+/Cl^- . Estos dos sistemas internalizarían

a estos iones y con ello acarrearían agua, posteriormente serían expulsados de la célula a través de la actividad de una ATPasa Na^+/K^+ .

En células epiteliales de vejiga urinaria, los dos mecanismos reguladores de volumen se encuentran polarizados, encontrándose los flujos implicados en el IRV en la membrana apical, mientras que aquellas que participan en el DRV se encuentra en la membrana basolateral (Spring., 1985).

Variaciones del volumen celular en condiciones isosmóticas.

La homeostasis de los organismos multicelulares permite mantener la osmolaridad de los líquidos corporales dentro de límites de variación muy pequeños. En los mamíferos, los fluidos extracelulares tienen un valor casi constante de $285 \pm 3\%$ mOsmolal/l (Hoffmann y Simonsen., 1989). La constancia de la osmolaridad en condiciones fisiológicas se debe a la actividad de las células que se encuentran directamente afectadas por las variaciones osmolares del medio ambiente y por tanto deben poseer mecanismos de regulación de volumen muy activos; algunos ejemplos son: Las células epiteliales de la piel, las células epiteliales de los capilares intestinales y las células del riñón. Las células del epitelio gástrico e intestinal se exponen a un medio hiposmótico después de una ingesta excesiva de agua (Hoffmann y Simonsen., 1989; Dix y Cols., 1985).

Además de estos casos, algunos procesos fisiológicos provocan cambios en el volumen celular y activan, en consecuencia, los procesos regulatorios descritos. En general puede afirmarse que cualquier proceso que conduzca a un incremento en la concentración intracelular de solutos osmóticamente activos (iones inorgánicos o compuestos orgánicos)

producirá un incremento en el contenido intracelular de agua.

Se ha demostrado que la captura de aminoácidos y azúcares acoplados a la entrada de sodio provocan una ganancia neta de agua y posteriormente una activación de los procesos reguladores de volumen en células epiteliales (Lau y Cols., 1984; Schultz y Cols., 1983) y en hepatocitos (Kristensen y Folke., 1984; Kristensen., 1986). Por otra parte, ciertos eventos catabólicos como la glucogenólisis en hepatocitos y la lipólisis en adipocitos también pueden conducir a un incremento en los niveles de solutos intracelulares osmóticamente activos, lo cual provoca una entrada de agua osmóticamente obligada (Kristensen., 1986). Igualmente el metabolismo de las fibras musculares durante el ejercicio, aumenta los solutos intracelulares libres y activa los procesos reguladores de volumen (Saltin y Cols., 1987).

Existe evidencia que señala que existen cambios en el volumen, asociados con la actividad neuronal en la retina (Orkand y Cols., 1984) y en rebanadas de corteza cerebral (Lipton 1973). El aumento del volumen celular es producido por la entrada de iones a la célula inducida por la despolarización y se previene sustituyendo el cloro por un anión impermeable como el gluconato (Lipton., 1973).

En condiciones patológicas, la osmolaridad del medio extracelular puede tener grandes variaciones, dependiendo del tejido del que se trate. Por ejemplo, en la diabetes puede haber variaciones osmolares en la sangre entre 220 y 350 mosmol/L, lo que resulta en un incremento o disminución del volumen de las células sanguíneas de aproximadamente un 30% y un 20% respectivamente (Macknight., 1983, 1985).

Por otra parte, existen diversas estrategias experimentales para inducir un aumento en

el volumen celular; por ejemplo: 1. La acumulación intracelular de un compuesto que bajo la acción del medio intracelular se torne impermeante. 2. La simulación de estímulos fisiológicos como serían la activación de canales dependientes de ligandos o la despolarización 3. La disminución de la osmolaridad extracelular.

En un medio en donde el cloro se sustituye por acetato, el contenido intracelular de agua puede aumentarse hasta en un 100% (Cooke y Macknight., 1984). Esto se explica con base en que el acetato no disociado es capaz de atravesar la membrana plasmática e internalizarse en la célula. Una vez dentro se disocia y queda atrapado en el interior, puesto que en la forma ionizada no puede cruzar la membrana plasmática. Posteriormente el ion hidrógeno disociado es intercambiado por sodio y se observa una entrada de potasio a las células para compensar la acumulación de las cargas negativas del acetato; la acumulación de estos solutos se acompaña necesariamente de una entrada de agua, produciéndose el incremento en el volumen. Igualmente se ha demostrado que la exposición a ácido láctico induce un incremento de volumen por un mecanismo similar en células de la corteza renal de conejo (Cooke y Macknight., 1984).

Se ha demostrado que las concentraciones elevadas de KCl producen hinchamiento celular en numerosas preparaciones, incluyendo rebanadas de cerebro (Bourke y Tower., 1966; Bourke., 1969; Pappius y Elliott., 1956; Moller y Cols., 1974), retina (Pasantes-Morales y Cols., 1988) y astrocitos en cultivo (Waltz., 1987). Los mecanismos responsables de este proceso podrían ser la activación del sistema de cotransporte $2\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$ (Waltz y Kimelberg., 1985) o por las fuerzas de difusión si se incrementa la concentración de K^+ sin reducir la concentración de Cl^- (Boyle y Conway., 1941).

Existen estudios que señalan que ciertos neurotransmisores son capaces de incrementar el volumen celular. En rebanadas de cerebro, la norepinefrina y la adenosina incrementan el contenido de agua de una manera dependiente del cloro extracelular. Este efecto se previene con antagonistas sinápticos específicos (Burke y Cols., 1983), lo que indica que este proceso está ocurriendo en las neuronas. En neuronas en cultivo, la presencia de aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato, así como agonistas de los receptores a estos compuestos producen un aumento en el volumen celular, el cual es prevenido en un medio libre de sodio o cloro ya que los aminoácidos excitadores producen hinchamiento celular por acumulación de Na^+ , el cual entra a través de canales activados por voltaje y es seguido por la entrada pasiva de Cl^- y agua (Choi., 1987).

AMINOACIDOS LIBRES EN LA REGULACION DEL VOLUMEN CELULAR

La modificación de los niveles intracelulares de los aminoácidos, observada en los moluscos en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio, fue la primer evidencia de la participación de éstos en los procesos de osmorregulación. Actualmente el papel de los aminoácidos libres como solutos osmóticamente activos en vertebrados superiores durante un desajuste osmótico, está ampliamente demostrada (Schoffeniels., 1976; Hoffman., 1987; Gilles., 1979; Rasmusson y Lieberman., 1993).

Taurina

En la mayoría de las especies y en una amplia variedad de tejidos estudiados, la

taurina es el aminoácido intracelular libre más abundante, llegando a constituir hasta el 50% de la poza endógena en tejidos como el muscular cardíaco y esquelético (Laidlaw y Cols., 1987). Su baja actividad metabólica que la mantiene en forma libre, aunada a su gran abundancia y a su presencia casi total en forma soluble en el citoplasma, hacen pensar en una contribución considerable del aminoácido a la poza de osmolitos intracelulares. Pero si a ello se añade la presencia de eficientes sistemas específicos de liberación y captura, es decir, una alta capacidad de movilización entre los compartimientos intra y extracelulares (Uchida y Cols., 1991), se evidencian sus posibilidades de desempeñar un papel preponderante como osmorregulador.

Síntesis y Metabolismo:

La vía principal de síntesis de taurina es a partir de la cisteína, la cual es transformada en ácido cisteín sulfínico . Este intermediario da lugar a la hipotaurina por la enzima descarboxilasa del ácido cisteinsulfínico (DACS) y por la oxidación posterior de éste se obtiene la taurina. Se ha concluido que es la actividad de la DACS el paso limitante en la biosíntesis del aminoácido (Wo., 1982, Griffith., 1983; De la Rosa y Stipanuk., 1985). Se han descrito dos isoformas de la DACS, DACS I y DACS II, (Remy y Cols., 1990). Al parecer la especificidad de la DACS varía con sus isoformas y con el tejido en el cual se estudie. Wo (1982) reporta una DACS específica de cerebro, la cual es diferente de la de DACS del hígado. Es en este órgano donde se sintetiza la mayor parte de la taurina corporal, la cual posteriormente es distribuída a otros tejidos vía el torrente sanguíneo (Griffith, 1983).

El metabolismo principal de la taurina es su conjugación para formar ácidos biliares. Otros metabolitos reportados incluyen algunos dipéptidos como la γ -glutamyl-taurina (Varga y Cols., 1985). Sin embargo, está ampliamente demostrado que un alto porcentaje de la taurina corporal se encuentra en forma libre y no sufre transformación química alguna (Waniewski y Cols., 1991). En los vertebrados, la gran mayoría de los organismos posee una amplia capacidad de síntesis de taurina, sin embargo algunos grupos como los felinos y primates, incluyendo al hombre, la obtienen de la dieta (Morris y Cols., 1990). Esto se debe a una baja actividad de la DACS, por lo que para ellos el aminoácido se puede considerar como esencial. En este contexto cabe mencionar que una deficiencia en taurina provoca severas alteraciones en la retina y el cerebro (Sturman y Cols., 1984), así como grandes perturbaciones morfofisiológicas cuando la deficiencia ocurre durante la gestación (Sturman y Cols., 1984).

Mecanismos subyacentes a los flujos transmembranales de taurina

La entrada de la taurina al interior celular puede ser por dos vías: 1. un mecanismo de cotransporte con Na^+ , y/o 2. difusión simple (Atlas y Cols., 1984). Ambas vías de entrada han sido descritas en condiciones isosmóticas en diversos tejidos (Schaffer y Cols. 1982).

Los mecanismos de liberación de la taurina son menos conocidos que los de su acumulación; se ha demostrado que la liberación de este aminoácido responde a fluctuaciones osmolares, activándose el mecanismo de difusión y se ha descartado la posible participación del transportador de alta afinidad en los flujos salientes de taurina

en los cuadros hiposmóticos (Sánchez Olea y Cols., 1991).

Posibles funciones biológicas

Se ha sugerido que la taurina es importante durante el desarrollo del cerebro. La propuesta se basa, por una parte, en la gran abundancia del aminoácido durante el desarrollo (hasta tres veces el valor del estado adulto), así como en las alteraciones observadas en la corteza y cerebelo de gatos bajo un estado de deficiencia en taurina *in utero* (Morris y Cols., 1990).

En el estado adulto, se ha propuesto que la taurina podría tener funciones como:

1. moduladora de los eventos excitables actuando directamente sobre los canales de Ca^{2+} ó Cl^- (Huxtable y Bressler., 1973).
2. estabilizador de la membrana; Esta hipótesis se fundamenta en los efectos protectores que muestra la taurina, observadas principalmente en el corazón y retina. En efecto, en estos tejidos se ha reportado que la presencia de taurina en los medios de incubación estabiliza la estructura celular ante una amplia variedad de condiciones deletéreas como la isquemia y la llamada paradoja del Ca^{2+} en el corazón, (Huxtable., 1992) o a la iluminación continua, a los medios libres de cationes divalentes y a condiciones peroxidantes en preparaciones de segmento externo aisladas de fotorreceptores. (revisado en Pasantes-Morales y Cruz., 1993).
3. protectora de la excitotoxicidad causada por el glutamato y kainato que son moléculas excitadoras del sistema nervioso (Trenkener., 1990).
4. como osmorregulador en diversos tipos celulares (revisado en Huxtable., 1992).

La taurina como osmoefector

La participación de la taurina en la osmorregulación fue reconocida desde estudios pioneros en animales marinos. En especies eurihalinas se observaron movimientos de aminoácidos libres desde, y hacia el interior celular durante los períodos de adaptación a los cambios de salinidad a los que éstos organismos se exponen naturalmente. Si bien la poza osmosensible de aminoácidos incluye varios compuestos, la taurina es con mucho el componente más abundante. De hecho son los animales marinos los que poseen la mayor abundancia relativa de taurina dentro de la escala zoológica (Huxtable., 1992). No obstante lo anterior, no es sino hasta fecha reciente en que la participación de la taurina en la regulación del volumen celular en tejidos de mamíferos, ha sido demostrada (Hoffmann., 1989 y 1992; Huxtable., 1992). En efecto, en experimentos *in vivo* se ha demostrado un incremento en los niveles de taurina en el corazón de rata durante la adaptación de volumen subsecuente a una hipernatremia crónica (Thurston y Cols., 1980 y 1981; Vislie y Fugelli., 1975). También se ha observado un incremento en la incorporación de taurina en corazones fetales de rata, como respuesta a una perfusión con soluciones hiperosmóticas (Atlas y Cols., 1984). Esta acumulación de taurina puede ser estimulada de igual manera por un incremento en el Na^+ del medio como por un osmolito como la sacarosa (Atlas y Cols., 1984); Schaffer y Cols. (1982), encontraron que la captura de la taurina en el corazón obedece a un mecanismo de cotransporte con Na^+ , mas no es la única vía de acumulación del aminoácido en condiciones isosmóticas.

Entre otras evidencias, se ha observado en ratas hechas diabéticas por inyección de estreptosotozina, un aumento en el contenido de taurina en el miocardio,

simultáneamente con la elevación de la osmolaridad del plasma (Atlas y Cols. 1984). Otra evidencia del papel osmorregulador de la taurina en el tejido cardíaco es la disminución en su concentración en el miocito simultáneamente a la entrada de agua al mismo (Crass y Lombardini., 1977). La proposición que postulaba a la taurina como estabilizador de membranas se basaba, como ya se mencionó, en evidencias obtenidas en el corazón entre otros tejidos. Sin embargo, es posible que algunos de los efectos cardioprotectores de la taurina estén mediados por su participación en la osmorregulación. Así por ejemplo, cabe mencionar que se ha descrito una acumulación excesiva de agua durante el daño isquémico al miocardio, y el efecto es contrarrestado por la presencia de taurina.

Se han realizado estudios similares en la retina (Shultz y Neuhoff., 1983; Domínguez y Cols., 1989), linfocitos humanos (Pasantes-Morales y Cols. 1991) y de conejo (García y Cols., 1991), cultivos de células MDCK (Roy y Sauvé, 1987), eritrocitos (Finchman y Cols., 1987; Wolowyk y Cols., 1990) y astrocitos en cultivo (Pasantes-Morales y Schousboe., 1988). En éstos se ha observado que el componente difusional de la incorporación de taurina se incrementa dramáticamente en condiciones hiposmóticas mientras que se observa una reducción en el componente dependiente de sodio. También se han observado incrementos en los niveles de taurina en el cerebro y músculo de ratas *in vivo*, que sufren una deshidratación crónica debido a una incapacidad para la síntesis de vasopresina (Nieminen y Cols., 1988). En estudios *in vivo*, se ha mostrado que perfundiendo el músculo biceps femoral de rata con soluciones hiperosmóticas, la liberación basal de taurina y de fosfoetanolamina decrece (Lehmann., 1989).

Los mecanismos moleculares subyacentes a la liberación de aminoácidos estimulada por hiposmolaridad son prácticamente desconocidos. En invertebrados se ha sugerido que la permeabilidad de la membrana celular a la taurina está regulada por el calcio en la superficie membranal y depende de ATP (Armende y Pierce., 1980). Sin embargo, en la amplia mayoría de los tejidos los mecanismos de expulsión de la taurina, las entidades moleculares involucradas y su regulación no han sido caracterizadas.

La taurina como osmoefector en el sistema nervioso

Las características de un osmolito activo podrían enunciarse como sigue: 1. las concentraciones citosólicas del compuesto deben cambiar en forma concertada con los cambios de osmolaridad del medio exterior; debe existir por tanto, un mecanismo para ajustar los gradientes de concentración a través de la membrana celular; es decir, un mecanismo selectivo de captura y otro de salida sensibles a los cambios osmóticos. 2. los cambios en su concentración no deben alterar de manera drástica, o en el caso ideal, ni mínimamente el potencial de membrana, las actividades enzimáticas u otros procesos celulares. 3. La energía necesaria para la síntesis del compuesto, así como la requerida para mantener altas concentraciones en el interior celular y aquella que la movilización del osmolito requiere en respuesta a los cambios osmóticos, deben ser mínimas.

Por lo anterior, un compuesto zwitterion es el ideal, ya que un compuesto neutro sería liposoluble y requeriría un costo alto de energía para mantener la concentración adecuada del osmolito en el medio intracelular. La energía de síntesis puede reducirse utilizando un producto de desecho o metabólicamente inerte.

La taurina se ajusta de una manera casi ideal a los requisitos del osmolito perfecto; Se acumula por un sistema único para los β -aminoácidos, el cual utiliza la energía del gradiente de Na^+ (Martin y Shain., 1979., Larsson y Cols., 1986), y la permeabilidad de la membrana a la taurina está en función del volumen celular. La taurina, por sus características lipofóbicas, puede ser retenida en altas concentraciones intracelulares sin interferir con otros aminoácidos metabólicamente activos (Pasantes-Morales y Martín del Río., 1990). La poza de taurina, además existe en forma libre y distribuída de manera homogénea en el citoplasma, disponible para ser movilizada por cambios osmóticos (Waniewski, y Cols., 1991). La taurina es uno de los osmolitos presentes en más altas concentraciones y el principal donador de osmoequivalentes durante el ajuste del volumen celular en el cerebro de los mamíferos (Solís y Cols., 1988). La liberación de taurina en medios hiposmóticos está mediada por un mecanismo independiente del Na^+ extracelular, y su poza endógena es en tal forma movilizable que puede prácticamente depletarse en condiciones externas de hiposmolaridad (Pasantes-Morales y Schousboe 1988). El papel de la taurina como osmolito en el sistema nervioso parece favorecerse por la capacidad restringida de las células nerviosas para movilizar los iones inorgánicos Na^+ y K^+ , y al ser éstos, como se sabe, responsables directos de la excitabilidad neuronal; son entonces los solutos orgánicos los que principalmente contribuyen al proceso de regulación del volumen celular (Sánchez Olea, y Cols., 1993; Pasantes-Morales, y Cols. 1993).

Se ha establecido que los aminoácidos excitadores incrementan la liberación de taurina de las células excitables. La liberación de taurina estimulada por el quisqualato es

completamente dependiente de la osmolaridad del medio, siendo totalmente inhibida en medios hiperosmóticos. El ácido kaínico estimula la liberación de la taurina de manera parcialmente sensible a la osmolaridad del medio. El N-metil-D-Aspartato (NMDA) estimula la liberación de taurina de manera totalmente independiente de la osmolaridad del medio. Por lo anterior, la liberación de la taurina estimulada por los aminoácidos excitadores parecer ser parcialmente ocasionada por hinchamiento y parcialmente independiente de la osmolaridad (revisado en Huxtable., 1992).

La liberación de taurina sensible a hiposmolaridad, responde a decrementos osmolares del medio tan pequeños como del 13 %, tanto en astrocitos en cultivo (Pasantes-Morales y Cols., 1993), como en condiciones *in vivo* (Solís y Cols., 1988); ningún otro aminoácido se libera en estas condiciones de reducción osmolar suave.

Liberación de taurina y comunicación intracelular

Algunos autores (Rothstein y Mack., 1992) han mostrado la dependencia del Ca^{2+} extracelular para la regulación del volumen en células MDCK. Se ha postulado la posibilidad de un canal para taurina sensible a segundos mensajeros activado por hinchamiento en células MDCK (Hoffmann., 1992). Al parecer, el leucotrieno LTD₄ que se sintetiza en las células MDCK por despolarización de la membrana plasmática y por hinchamiento, está involucrado en la liberación de la taurina en esta línea celular (Lambert y Hoffmann., 1993).

En la astroglía, la difusión de la taurina por choque hiposmótico es independiente del Ca^{2+} (Pasantes-Morales, y Cols., 1990). Cuando se somete a los astrocitos a condiciones

hiperosmóticas por tres días, se observa un aumento en la V_{max} , lo que sugiere un aumento en el número de transportadores funcionales. La K_m característica del transportador se conserva, lo que indica que se trata del mismo tipo de transportador. Por otra parte, bajo estas condiciones el coeficiente de difusión se reduce casi en un 97 % (Sánchez Olea y Cols., 1991). Estos datos concuerdan con las llamadas "up-regulation" y "down-regulation" del transportador, como respuesta adaptativa al estímulo osmótico, que han sido descritas en otros tipos celulares (Jones., 1991). No se sabe si el aumento en el número de transportadores es por síntesis de novo o por incorporación de los transportadores capturados en alguna poza intracelular.

Características del flujo de la taurina por difusión activado por hiposmolaridad en astrocitos en cultivo.

La taurina es liberada rápida y masivamente de los astrocitos en cultivo cuando se les somete a medios hiposmolares. Esta liberación es consecuencia de la activación de un proceso difusional activado por hinchamiento (Pasantes-Morales y Cols., 1990; Sánchez Olea y Cols., 1991). Lo anterior se fundamenta en la siguiente evidencia:

Es el gradiente de concentración de taurina a través de la membrana el que hace que ésta sea impulsada hacia el medio extracelular en condiciones de hiposmolaridad, ya que si se abate el gradiente de taurina, no se observa un flujo neto del aminoácido. Mas aún, al invertir el gradiente de concentración, la taurina es movilizadada hacia el interior. La cantidad de taurina liberada es proporcional a la reducción osmolar del medio. En un medio hiposmótico al 50 %, la célula prácticamente se depleta de taurina (Sánchez Olea

y Cols., 1991).

El transportador de alta afinidad dependiente de sodio no es el mecanismo molecular involucrado en el proceso de liberación, ya que éste es independiente de Na^+ y de temperatura; asimismo es insensible a ouabaína (Pasantes-Morales y Scousboe., 1988). La liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad es sensible a reducciones osmolares tan pequeñas como del 10 %, y cuando los astrocitos se cargan con ^3H -taurina y se someten a una reducción osmolar del 50 %, se observa una liberación de ^3H -taurina de manera súbita. Esta liberación estimulada de taurina es rápida y masiva, alcanzando el máximo de liberación a los 2-3 minutos post-estímulo. Esta liberación estimulada de taurina decrece posteriormente aún cuando el estímulo hiposmótico continúa presente y, significativamente, coincide estrechamente con el curso temporal de recuperación del volumen original (Pasantes-Morales y Cols., 1990).

En los estudios de cinética de captura en condiciones de hiposmolaridad, se observan dos componentes, uno saturable y otro difusional no saturable, este último se activa en presencia de medios hiposmóticos (Sánchez Olea y Cols., 1991).

En resumen, la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad parece ser debida a la estimulación del componente difusional de los flujos de taurina y no involucra al componente saturable de alta afinidad. Estos datos sugieren que la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad involucra alguna vía para la difusión activada por hinchamiento, la cual es capaz de contener con los flujos masivos de taurina observados en estas condiciones, y descartan la posible participación del transportador de alta afinidad dependiente del Na^+ , el que podría pensarse, funcionara de manera

inversa expulsando al aminoácido del interior celular.

La molécula responsable del componente difusional de la liberación de taurina activada por hiposmolaridad, ha recibido poca atención y sus características moleculares y formas de regulación son prácticamente desconocidas.

OBJETIVO:

Un proceso difusional de la naturaleza antes descrita puede tener lugar a través de un poro lipídico formado por la distensión de la membrana (Nanavati y Cols. 1992) o por un poro proteico. En este proyecto se propone aclarar este punto mediante la investigación de la importancia de algunos residuos de aminoácidos que forman parte de las proteínas posiblemente involucradas en el proceso difusional, haciendo uso de fármacos que reaccionan selectivamente con residuos específicos de aminoácidos. Esta estrategia permite apoyar o descartar la participación de proteínas membranales (Klonk y Deuticke., 1992). El uso de reactivos con diferentes capacidades de permear la membrana puede contribuir a la localización topográfica de los residuos esenciales para el funcionamiento del canal (Chun y Cols., 1990). Posteriormente, los resultados podrían servir como herramientas para la extracción y purificación de la proteína bajo estudio.

Se ha demostrado que los grupos SH son esenciales para el funcionamiento correcto de diversos sistemas de transporte (May., 1989; Brookes., 1988). La estrategia experimental utilizada para explorar la participación de grupos SH en diversos sistemas

de transporte, implica la modificación de residuos de cisteína por una amplia variedad de reactivos específicos con características permeantes distintas, que usados a distintos tiempos y concentraciones permiten distinguir con cierta precisión la localización de estos residuos en las regiones exofacial, intramembranal o endofacial (Abbot y Schachter., 1988). Con esta misma estrategia, es posible poner de relieve la importancia de otros residuos de aminoácidos. Este trabajo se centró en los residuos de cisteína y arginina por la amplia participación que poseen los grupos funcionales de estos aminoácidos en los sistemas proteicos involucrados en los sistemas de transporte (Alcántara y Cols., 1991; Passamonti y Cols., 1990; Rothstein, 1970).

MATERIAL Y METODOS:

CULTIVO DE CELULAS

Todos los experimentos se realizaron con cultivos primarios de astrocitos obtenidos de cerebelo de rata y crecidos a confluencia (Morán y Patel., 1989). Para tal efecto, se disociaron células cerebelares de ratas de 8 días de edad y se sembraron a una densidad de 225×10^3 células/cm², en cajas de Petri desechables de 35 mm de diámetro para los experimentos de cuantificación de volumen celular, y en multicajas de 24 pozos para los experimentos de liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad.

El medio de cultivo contenía medio basal Eagle suplementado con suero fetal de bovino al 10 % inactivado por calor (GIBCO), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos fueron incubados a 37 °C en atmósfera

húmeda y una mezcla de aire 5% y CO₂ 95%. La pureza del cultivo se determinó por inmunofluorescencia mediante el anticuerpo monoclonal contra la proteína fibrilar ácida (GFAP; Sigma, St Louis, MO), estimándose la positividad de células astrocíticas en un margen del 95 % a 99 %.

ENSAYOS DE LIBERACION DE TAURINA

Después de 2 semanas *in vitro*, las células fueron incubadas en medio de cultivo con ³H-aurina 45.6 nM (1.0 μCi/ml) durante 60 minutos. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó con un medio Krebs con el amortiguador ácido N-2-hidroxipiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) a pH 7.4, con la siguiente composición y concentración de sales (en mM): NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 1.17, HEPES 10, y glucosa 5. Después de un lavado rápido y tres períodos de incubación de 10 minutos cada uno con este medio (tiempo en el que se alcanza una liberación basal de taurina estable), se incubó a las células con medio isosmótico (300 mOsm) por otro período adicional de 10 minutos (flujo basal) y en seguida una incubación adicional de 10 minutos con medio hiposmótico al 50% (150 mOsm), para la liberación estimulada. La osmolaridad se redujo a expensas de la concentración de NaCl. En los experimentos donde se examinaron distintas concentraciones de los reactivos utilizados, la osmolaridad se mantuvo en 300 mOsm reduciendo la concentración de NaCl. En todos los casos, los reactivos se presentaron a las células durante los lavados. Al final del experimento, la radioactividad remanente en el tejido se extrajo por la digestión del cultivo con NaOH 0.4 M y se cuantificó en un contador de centelleo para muestra líquidas. El 100% de la

radioactividad es la suma de la ^3H -taurina liberada en los 10 min de incubación en medio isosmótico + la ^3H -taurina liberada durante los 10 minutos de incubación en medio hiposmótico + la ^3H -taurina remanente en el cultivo.

Para los experimentos del curso temporal de la liberación del ^{86}Rb y el efecto de la NEM sobre ésta, se utilizó la técnica de la superfusión con un flujo de 1ml/min. El protocolo experimental se describe en la figura 7.

MODIFICACION QUIMICA

En todos los casos de modificación química se realizó previamente a la determinación de la liberación de la taurina y se utilizaron soluciones de cada reactivo recientemente preparadas y ajustadas a un pH de 7.0 para los modificadores de los grupos SH. Para los experimentos de modificación de las argininas por ciclohexanodiona y fenilgloxal, se agregó a la mezcla de reacción ácido bórico 80 mM y el pH se ajustó a un valor de 8.0 (Lundblad, 1991); en estos casos los cultivos control se expusieron a la misma concentración de ácido bórico y el pH durante el lapso de tiempo de la modificación fue de 8.0. En cualquiera de los casos, el pH fue posteriormente retornado a 7.4 una vez terminada la modificación. Los experimentos de liberación se realizaron como se indica en el apartado anterior.

En los experimentos realizados con medios libres de Cl^- , éstos fueron preparados por reemplazo de las sales de KCl y NaCl por sus respectivos gluconatos.

Las medidas de volumen se estimaron en células en suspensión con un contador de células acoplado a un analizador de canales (modelo ZM 256). Para tal efecto, las células

se desprendieron de las cajas de Petri mediante un lavado de 5 minutos con una solución amortiguadora de fosfatos libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , suplementada con tripsina/EDTA 1 mM. Las células así desprendidas se centrifugaron y resuspendieron en medio isosmótico. Al tiempo cero una muestra de la suspensión se diluyó 100 veces con el medio experimental, se cuantificó su volumen y se registraron los cambios en el tiempo durante 20 minutos. La calibración del aparato se realizó por medio de microesferas de látex con un diámetro de $9.63 \mu\text{m}$. Los cambios en el volumen celular se expresan como el porciento con respecto al volumen de los controles, en función del tiempo.

Los resultados de los experimentos de liberación están expresados como la fracción porcentual de taurina liberada con respecto al total de radioactividad incorporada. Para el cálculo de las constantes de inhibición se tomó el porcentaje de liberación de ^3H -taurina estimulada por hiposmolaridad como el 100%. La liberación estimulada de las células tratadas con cada reactivo se expresó como porcentaje de la actividad residual con respecto a los controles.

Las constantes aparentes de inhibición de la liberación de taurina en presencia de N-etilmaleimida (NEM) se calcularon por medio de un ajuste de los datos experimentales a una ecuación no lineal de decaimiento exponencial único (Eq. 1) con ayuda del programa de R.S. Leatherbarrow (ENZFITTER, Elsevier, BIOSOFT).

$$(E/E_0)100 = e^{-kt} \quad (\text{Eq. 1})$$

donde E es la liberación residual de taurina al tiempo t , E_0 es la liberación de taurina en el control (liberación inicial al tiempo 0), e es el exponencial y k es la constante de

velocidad de inhibición de pseudoprimer orden.

La constante de segundo orden se define como:

$$k=k'[R] \quad (\text{Eq. 2})$$

donde k' es la constante de inhibición de segundo orden y $[R]$ es la concentración del reactivo examinado.

Se usó la misma ecuación para determinar la constante de inhibición por diferentes concentraciones del Yodoacetato y ciclohexanodiona.

RESULTADOS:

Flujo difusional de la taurina estimulado por hiposmolaridad

Los astrocitos incubados con ^3H -taurina y superfundidos con medio isosmótico (300 mOsmolas), liberan este aminoácido a una tasa de aproximadamente 0.94% por minuto (liberación basal). Cuando se les superfunde con medios de osmolaridad reducida, la liberación de taurina se estimula de una manera que depende del decremento en la osmolaridad. En medios con osmolaridad reducida al 50% (150 mOsm), la liberación estimulada de taurina alcanza valores de hasta 15 veces la liberación basal (figura 1), en concordancia con datos previamente publicados (Pasantes-Morales y Schousboe., 1988). El flujo de taurina estimulado por la hiposmolaridad se inactiva en un lapso de tiempo que es paralelo al curso temporal de la regulación del volumen celular (Pasantes-Morales

y Schousboe., 1988). En este momento, la célula ha liberado del 60% al 70% de la ^3H -taurina incorporada (Figura 1). El flujo basal de taurina durante una incubación de 10 minutos en medio isosmótico es del $12.6 \pm 0.14 \%$, mientras que la liberación acumulada en presencia de un medio hiposmótico 50% durante otros 10 minutos es del $67.6 \pm 0.12 \%$. (figura 1, inserto).

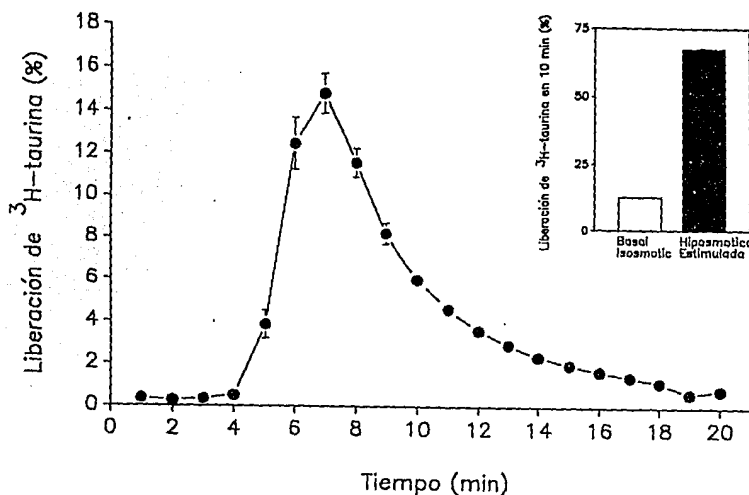


Figura 1. Curso temporal de liberación de ^3H -taurina estimulada por hiposmolaridad. Las células fueron incubadas con taurina marcada ($1 \mu\text{Ci/ml}$), lavadas y superfundidas con medio isosmótico (300 mOsm). Al min 5 el medio de superfusión se cambió por uno hiposmótico al 50% (150 mOsm). La ^3H -taurina liberada en cada fracción fue calculada como la fracción porcentual del total de radiactividad al inicio del experimento. En el inserto se muestra el porcentaje de ^3H -taurina liberada en un periodo de 10 minutos en un medio isosmótico (barras vacías) y la acumulada durante 10 minutos posteriores en un medio hiposmótico (barras llenas). En todos los casos se muestran los promedios \pm ES de 12 experimentos.

EFFECTO DE LA MODIFICACION DE LOS GRUPOS SH EN LA SALIDA DE LA TAURINA:

Se examinaron tres tipos de compuestos: organomercuriales, maleimidados y haloacetatos, con distintos coeficientes de hidrofobicidad con el fin de conocer la importancia de los grupos SH y su posible localización en la membrana celular.

Organomercuriales:

Se examinaron los efectos de los compuestos organomercuriales mersalil y p-cloromercuribencensulfonato (pCMBS), los que se sabe penetran la membrana muy lentamente (Rothstein., 1970; Park y Cols., 1990). Otros compuestos relacionados como el p-hidroxiomercuribenzoato (pOHMB) y p-cloromercuribenzoato (pCMB) también fueron examinados inicialmente; sin embargo resultaron muy tóxicos, aún a concentraciones bajas y tiempos de incubación cortos. Tanto el mersalil (25-100 μ M., 1-20 min de exposición) como el pCMBS (0.1-1 mM) mostraron un efecto doble. Por una parte aumentaron el flujo basal de la taurina en condiciones isosmóticas y por otra disminuyeron la liberación estimulada por hiposmolaridad. Estos dos efectos fueron dependientes del tiempo de exposición y concentración de la droga. Lo anterior se observa claramente en el caso del pCMBS, tanto en el aumento del flujo basal como en la disminución del flujo estimulado (figura 2, pag. 30). Estos dos efectos mostraron además, una clara relación inversa entre ellos.

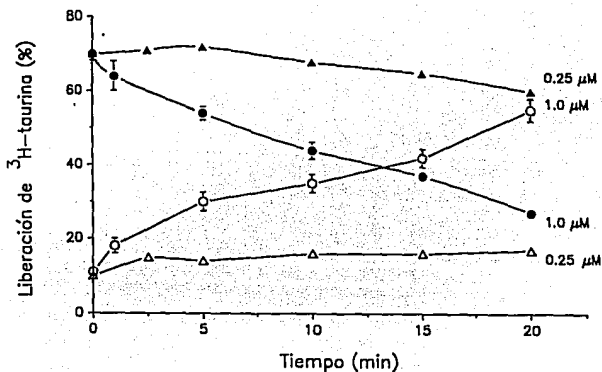


Figura 2. Efecto del pCMBS sobre la liberación de ^3H -taurina estimulada por hiposmolaridad. Las células expuestas a ^3H -taurina fueron lavadas dos veces por períodos de 4 min cada uno y posteriormente incubadas con pCMBS a diferentes tiempos a las concentraciones indicadas en cada curva. Posteriormente, las células fueron lavadas e incubada por 10 minutos con medio isosmótico (liberación basal; símbolos vacíos) y otros 10 minutos con medio hiposmótico (liberación estimulada; 150 mOsm; símbolos llenos). Los resultados se expresan como la fracción porcentual de radiactividad con respecto al total incorporado. Se presentan los promedios de 20 experimentos \pm ES.

El tratamiento con el agente reductor ditioneitol (DTT), 1 mM durante 10 min, después de la exposición al mersalil y al pCMBS, revirtió los efectos de estos reactivos, tanto en aquel sobre el flujo basal como en el ejercido sobre la liberación estimulada. El tratamiento con DTT *per se*, no modificó los flujos de la taurina ni aún cuando las incubaciones con este agente se prolongaron por más de 30 minutos (resultados no mostrados). En la figura 3 (pag. 31) se muestra el efecto de 10 minutos de exposición al DTT en los astrocitos, así como su efecto sobre la acción del mersalil y pCMBS.

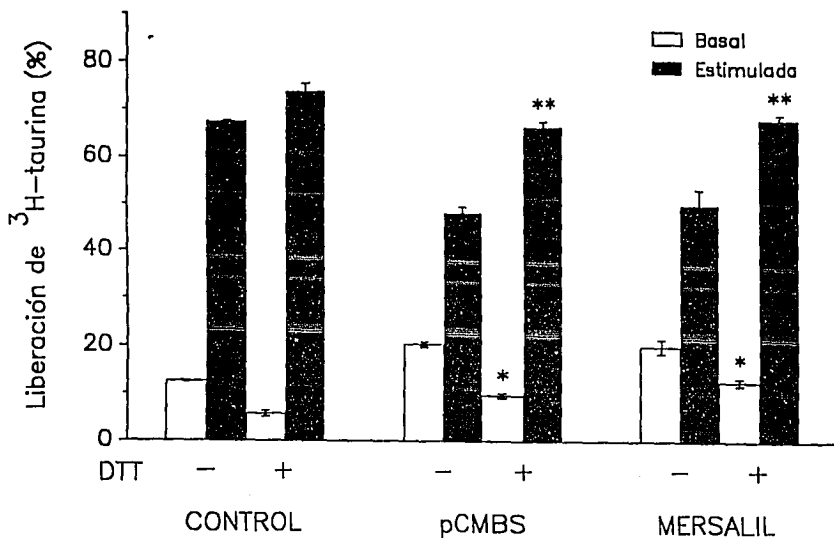


Figura 3. DTT como inhibidor de la acción de los organomercuriales sobre la liberación de taurina. Las células fueron tratadas con pCMBS (1 mM/10 min) o con mersalil (100 μ M/10 min). Los ensayos se realizaron en presencia ó ausencia de DTT (10 ó 1 mM/10 min respectivamente). Los datos se expresan como el porcentaje promedio de taurina liberada durante 10 min \pm ES de 10 a 18 experimentos. Los asteriscos indican las diferencias que son significativas con respecto a los flujos control basal (*) o estimulado (**). $P < 0.001$ (t de student).

Maleimidas:

Las maleimidas son compuestos que pertenecen a los reactivos 2, β -insaturados y que alquilan específicamente a los grupos -SH en un margen de pH de 7.0 a 8.5 (Joselyn., 1972).

Se estudiaron dos tipos de maleimidias; la molécula impermeante Eosin-5-maleimida (EMA)(Cobb y Beth., 1990) y la permeante N-etilmaleimida (NEM) (Wolf y Kuhn., 1992).

La salida de la taurina estimulada por hiposmolaridad no se inhibió con la molécula a la que la membrana celular es impermeable: EMA; sin embargo, la N-etilmaleimida, que es permeante a la membrana, mostró ser un potente inhibidor del proceso que media la difusión de la salida de la taurina en condiciones hiposmóticas. A bajas concentraciones y tiempos cortos (25-100 μM , 30-240 seg), la NEM mostró una cinética de inhibición con las constantes aparentes (k) de tiempo de reacción de pseudoprimer orden que se muestran en la tabla 1. Los datos experimentales se muestran en la figura 4 (pag. 33). Como puede observarse, existe una relación lineal entre estos parámetros con un valor para la constante de segundo orden (k') de $68.4 \pm 1.4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ (figura 5, pag. 33). En tanto que la pendiente de la gráfica de $\log k$ vs $\log [\text{NEM}]$ es de 1.2 ± 0.2 , como es de esperarse para el caso de una estequiometría 1 a 1 (fig 6, pag. 34).

TABLA 1

[NEM] (μM)	k (seg^{-1})
25	0.00119 ± 0.00032
50	0.00395 ± 0.00041
75	0.00573 ± 0.00031
100	0.00630 ± 0.00049

Relación entre las constantes de inhibición aparente de pseudo primer orden y las concentraciones de NEM utilizadas. Las k aquí mostradas fueron obtenidas a partir del ajuste no lineal mostrado en la figura 4.

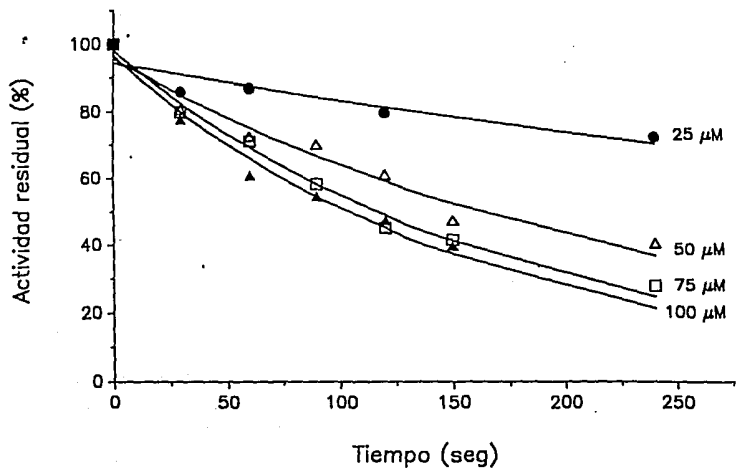


Figura 4. Efecto de la NEM sobre la liberación de ^3H -taurina estimulada por hiposmolaridad en función del tiempo. Las células fueron tratadas con la NEM a las concentraciones indicada y a distintos tiempos. La actividad residual (E/E_0) expresada en porcentaje, se grafica como función del tiempo de exposición al reactivo. (Ver métodos), Cada punto representa el promedio de 8 experimentos.

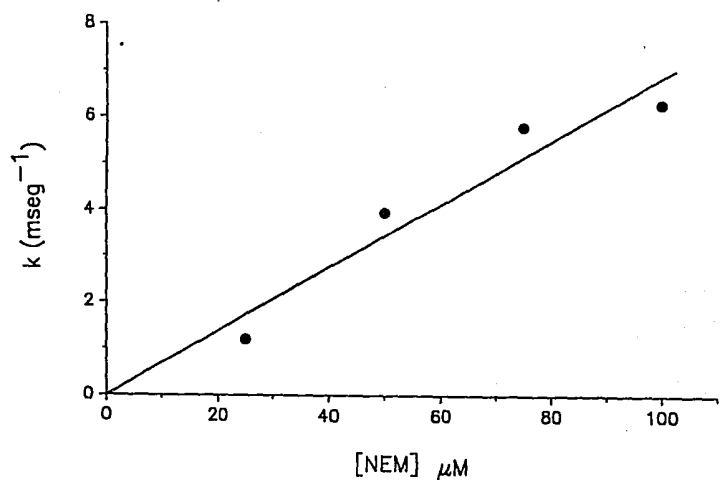


Figura 5. Constante de inhibición de segundo orden. Para obtener la constante de segundo orden k' se grafica la constante de pseudoprimer orden, k , contra la concentración utilizada de acuerdo con la ecuación $k=k'[R]$ obteniéndose una pendiente de $68.4 \pm 1.4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$. Los datos se obtuvieron a partir de la figura 4.

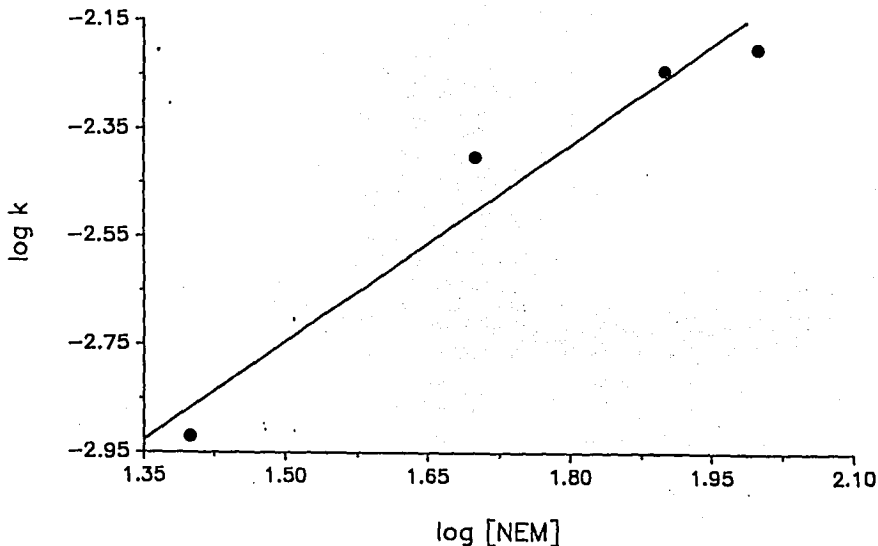


Figura 6. Estequiometría de reacción de la NEM. La expresión logarítmica de la ecuación de la figura 5 da una pendiente de 1.2 ± 0.2 , como es de esperarse para una relación estequiométrica entre la NEM y el grupo SH reactivo de 1 a 1. Los datos se obtuvieron a partir de la figura 4.

A diferencia de los compuestos organomercuriales, la NEM, a ninguna de las concentraciones utilizadas aumentó el flujo basal de la taurina en medio isosmótico. Cuando se evaluó la viabilidad celular a través de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio no se observó deterioro celular, ya que los valores de la actividad estuvieron dentro de los controles (datos no mostrados). Hay que hacer notar que en este trabajo las condiciones más drásticas al utilizar este reactivo, fueron de $100 \mu\text{M}$ durante 4 minutos. Los efectos de la NEM también se examinaron sobre el curso temporal de la liberación de ^{86}Rb utilizado como trazador de los movimientos de

K⁺, el cual es un catión liberado durante el hinchamiento celular como uno de los osmolitos inorgánicos involucrado en el DRV. El resultado fue muy similar al de la taurina, es decir una inhibición total del flujo estimulado del ⁸⁶Rb por la NEM sin alterar su liberación basal (figura 7).

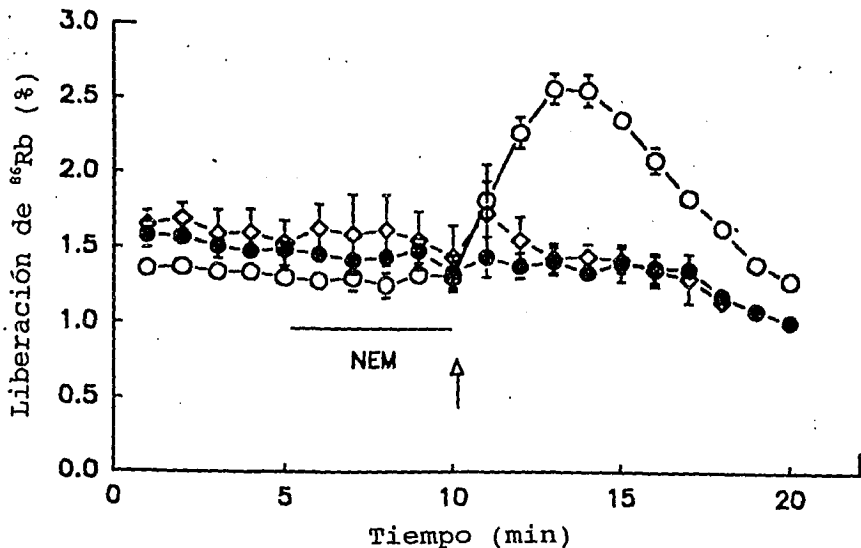


Figura 7. Inhibición de la liberación de ⁸⁶Rb estimulada por hiposmolaridad por NEM. Las células fueron expuestas al ⁸⁶Rb por un periodo de 1 hora y posteriormente lavadas por un lapso de 10 minutos. La NEM 0 (○), 50 μM (◐) y 100 μM (◑) se presentó en los 5 minutos finales de la superfusión con medio isosmótico (liberación basal). Al tiempo indicado por la flecha se cambió el medio de superfusión por uno hiposmótico (150 mOsm) libre de NEM. El ⁸⁶Rb liberado en cada fracción se expresa como el porcentaje del total incorporado. n=4 experimentos.

Se hicieron experimentos de competencia con altas concentraciones de taurina en periodos previos y durante la exposición a la NEM. El patrón de inhibición de la liberación de taurina no mostró ninguna modificación en estas condiciones.

El patrón de inhibición de la liberación de taurina por la NEM tampoco se modificó en valores de pH entre 7.0 a 8.5. Finalmente, como era de esperarse por la reacción alquilante de la NEM con los grupos SH, el DTT no revirtió ni afectó el poder inhibitorio de la NEM.

Haloacetatos:

Se utilizó el haloacetato impermeante 5-((2-iodoacetamido)etil)-1-aminoftalensulfonato (IAEDANS)(Cobb y Beth., 1990), el cual no tuvo ningún efecto. Asimismo se probaron los reactivos permeantes yodoacetato (Murakami y Cols. 1988) y yodoacetamida. El yodoacetato tuvo un patrón de inhibición sobre la liberación estimulada de taurina parecido al de la NEM, mostrando una constante de inhibición de segundo orden de $1.48 \pm 0.07 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ (figura 8, pag. 37).

La yodoacetamida no tuvo efecto a ninguna de las concentraciones utilizadas (desde 0.25 hasta 1 mM). Estos datos pueden interpretarse por la posición del grupo SH reactivo, ya que la yodoacetamida es, por su grupo amido, más grande, lo cual posiblemente represente un impedimento estérico y de carga para la reacción con los grupos SH esenciales para el proceso de difusión de la taurina. En los experimentos del volumen celular de astrocitos en cultivo a los que se agregó esta droga no se observaron cambios en el volumen celular.

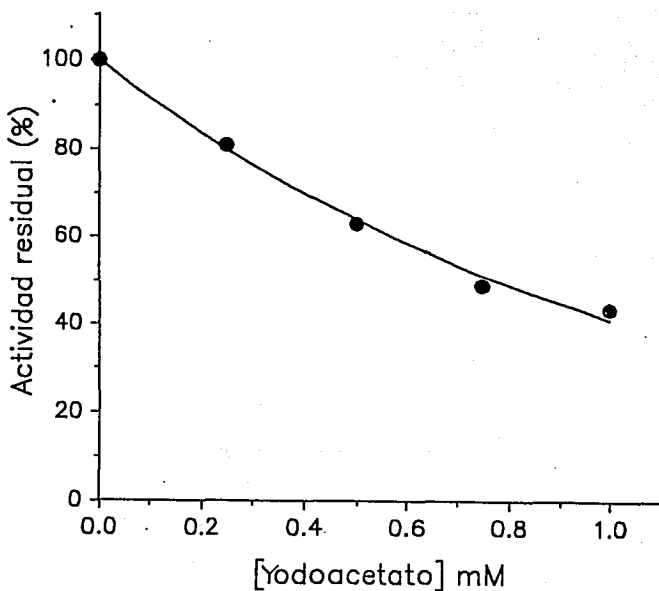


Figura 8. Efecto del yodoacetato sobre la liberación de ^3H -taurina estimulada por hiposmolaridad. Las células fueron tratadas como se indica en material y métodos, y los cálculos se realizaron como se describe en las figuras 4 y 5.

Efecto de los modificadores de los grupos SH en el volumen de los astrocitos.

Para estudiar la posibilidad de que el aumento en el flujo basal de la taurina en condiciones isosmóticas, observado con los compuestos organomercuriales fuera debido a un aumento en el volumen celular, se examinó por una parte la liberación basal en

presencia de estos reactivos, sustituyendo al Cl^- por el anión impermeable gluconato. Esta manipulación impide el hinchamiento celular (Lipton., 1973); sin embargo, no se produjo ningún cambio del efecto de los organomercuriales sobre la liberación de la taurina. Más aún, esta estrategia aumentó ligeramente el flujo basal por encima del observado con los compuestos organomercuriales, lo anterior es muy sugestivo de que el aumento en la liberación basal de taurina estimulada por los organomercuriales no es debido a hinchamiento. Cuando se determinó el volumen celular de los astrocitos en suspensión en presencia de cada uno de estos agentes, no se encontró ninguna alteración en el volumen.

MODIFICACION DE LAS ARGININAS:

Se examinó el efecto de dos reactivos bloqueadores de los residuos de las argininas, el fenilgloxal y la 2,3-Ciclohexanodiona. Ambos reactivos produjeron una inhibición de la liberación de la taurina estimulada por hiposmolaridad, efectos que fueron dependientes de la concentración y tiempo de exposición. Para el efecto de la ciclohexanodiona se obtuvieron las constantes de pseudoprimer orden mostradas en la tabla 2 (pag. 39), con una correlación lineal que se observa al graficar las constantes de pseudoprimer orden contra las concentraciones respectivas de ciclohexanodiona (figura 9, pag. 39); la constante de segundo orden fue de $0.034 \pm 0.02 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ (figura 9 inserto) y su estequiometría fue de 1 a 1, de acuerdo con la expresión: $\log k = \log k' + \log [\text{ciclohexanodiona}]$ (figura 10, pag. 40).

TABLA 2

[ciclohexanodiona] (mM)	k (seg ⁻¹)
30	0.0003558 ± 0.000029
60	0.0007158 ± 0.000039
120	0.0013598 ± 0.000070

Relación entre las constantes de inhibición aparente de pseudo primer orden y las concentraciones de ciclohexanodiona utilizadas. Las k aquí mostradas se obtuvieron a partir del ajuste no lineal de cada una de las concentraciones mostradas en la figura 9 y las constantes expresadas originalmente en min⁻¹ se han cambiado a su equivalente en seg⁻¹, las unidades originales de concentración no se modificaron.

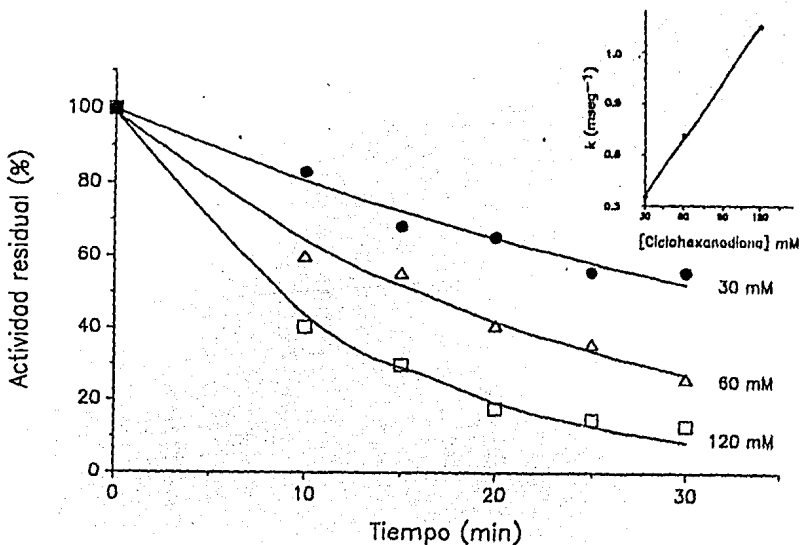


Figura 9. Efecto de la ciclohexanodiona sobre la liberación de ³H-taurina estimulada por hiposmolaridad en función del tiempo. Las células fueron tratadas con la ciclohexanodiona a las concentraciones indicada y a distintos tiempos. La actividad residual (E/E₀) expresada en porcentaje, se grafica como función del tiempo de exposición al reactivo. (Ver métodos). Cada punto representa el promedio de 8 experimentos. En el inserto se observa la constante de inhibición de segundo orden; para obtenerla, se grafican los valores de las constantes de pseudo primer orden obtenidas a partir del ajuste de las curvas a los datos experimentales. La recta se ajustó por mínimos cuadrados. la constante de segundo orden k' obtenida es de 0.034 ± 0.02 M⁻¹ seg⁻¹.

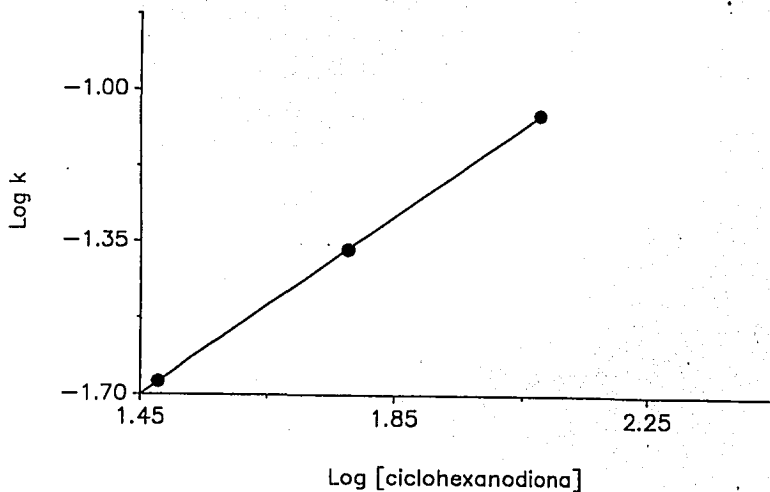


Figura 10. Estequiometría de reacción entre los grupos guanidino y la ciclohexanodiona. En esta figura se presenta la relación logarítmica de la ecuación $k = k'[\text{ciclohexanodiona}]$. Su pendiente es de 1.02 ± 0.008 .

El Fenilgloxal mostró una inhibición del 50% a una concentración de 10 mM y un tiempo de tratamiento de 20 min; sin embargo, en estas condiciones se observó un incremento ostensible en la liberación basal de taurina (Figura 11, pag. 41).

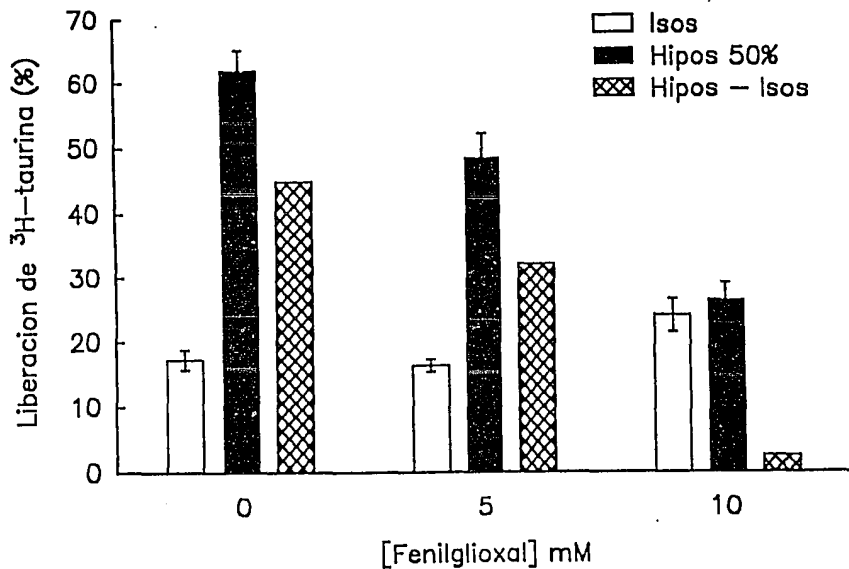


Figura 11. Inhibición de la liberación de la taurina por el fenilgloxal. Las células se trataron como se describe en material y métodos. Las barras blancas indican la liberación basal, las negras representan la liberación estimulada con medio hiposmótico al 50 % y las barras cruzadas indican el cambio en la liberación (liberación en medio hiposmótico - liberación en medio isosmótico). Los datos son promedios \pm ES de 6 experimentos separados.

Discusión:

La participación de la taurina en los procesos regulatorios del volumen celular en el tejido nervioso se ha ido consolidando a la luz de abundante evidencia experimental obtenida tanto *in vivo* como *in vitro* (Atlas y Cols., 1984; Pasantes-Morales., 1988., Solís

y Cols., 1988). Es particularmente clara en el Decremento Regulatorio de Volumen (DRV), en donde se ha demostrado su liberación, tanto en neuronas como en astrocitos, en respuesta específica al hinchamiento celular (Pasantes-Morales y Schousboe., 1988; Pasantes-Morales y Martín del Río., 1990). Sin embargo, los mecanismos que operan y regulan dicha liberación son prácticamente desconocidos. En particular, se desconoce la manera en que la taurina atraviesa la membrana plasmática durante la expresión del componente de difusión en su liberación, el cual como se ha establecido, es aquél involucrado en la respuesta al incremento en volumen (Sánchez Olea y Cols., 1991).

La difusión de la taurina inducida por hiposmolaridad involucra una proteína

Este estudio representa hasta donde nosotros sabemos la primera aproximación en la caracterización del proceso difusional de la taurina inducido por hiposmolaridad en los astrocitos. Una primera conclusión se deriva de la sensibilidad del proceso de liberación a los agentes utilizados; en tanto que dirigidos a estructuras proteicas, sugieren esta naturaleza para la entidad molecular responsable de la liberación de taurina durante el hinchamiento celular (Alcántara y Cols., 1991). En este contexto, los resultados aquí obtenidos muestran el papel esencial que tienen los grupos SH en dicha entidad molecular en astrocitos. Apoya lo anterior el hecho de la poca inhibición del proceso liberador de taurina por los reactivos contra las argininas, que por una parte muestra nuevamente la participación de una proteína y por otra, la poca sensibilidad del fenómeno ante la modificación de los grupos guanidino de las argininas, ya que al comparar las k' de inhibición de la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad

se observa que es nueve ordenes de magnitud más sensible a la modificación de grupos SH que a los guanidino.

Los grupos SH esenciales para el funcionamiento correcto de la difusión se encuentran localizados en la región endofacial de la membrana

Asimismo, este estudio da una idea de la posible localización de esos grupos SH esenciales mediante el uso de reactivos con diferentes capacidades de permear la membrana celular. Los reactivos como el IAEDANS y la EMA, que son de mayor tamaño y no permeantes a la membrana, y por tanto sólo reaccionan con los grupos SH exofaciales (Houstek y Pedersen., 1985), no modificaron la salida de taurina durante el DRV del astrocito. La NEM por otra parte, que permea la membrana celular, inhibió significativamente la salida de taurina durante el DRV. Estos datos sugieren una localización endofacial de los grupos SH críticos para la liberación de taurina estimulada por el aumento del volumen celular. En apoyo a esta conclusión debe mencionarse la insensibilidad del efecto de la NEM a las modificaciones del pH extracelular. Como se sabe, los grupos SH poseen un pK de reacción en un pH entre 7.0 y 8.5 (Lundblad., 1991). Si los grupos SH modificados por la NEM fuesen exofaciales, el cambio del pH externo modificaría las cinéticas de inhibición de este reactivo (Ligeti y Fonyó., 1989). Es posible que en el corto tiempo en el que la NEM ejerce su efecto (30-240 seg) no haya cambios significativos en el pH intracelular, razón por la cual no se observaron modificaciones en la capacidad de inhibición de la NEM.

Los grupos SH podrían encontrarse en un ambiente parcialmente lipofílico y expuestos al medio acuoso.

El efecto inhibitorio de los reactivos parcialmente permeables a la membrana como el mersalil y pCMBS hacen pensar que los grupos SH involucrados en el proceso de difusión de la taurina se encuentran en un ambiente parcialmente lipofílico e hidrofílico.

El efecto contrastado de los reactivos permeantes yodoacetato y yodoacetamida sugiere que estos grupos SH se encuentran en un microambiente cargado, ya que la liberación de taurina se inhibe con el yodoacetato pero no con la yodoacetamida, la cual puede tener un impedimento estérico y de carga (por su grupo amino sustituyente) para alcanzar el grupo SH.

Los grupos SH modificados por los mercuriales podrían ser los responsables de la señal de distensión de la membrana, la cual activa el flujo difusional de taurina.

Los organomercuriales parcialmente permeables a la membrana celular y con gran afinidad a permanecer en ella, en especial el pCMBS (May, 1989), es conocido que desorganizan el citoesqueleto adosado a la membrana celular y promueven un aumento en el volumen celular en otras líneas celulares (Rothstein y Mack, 1992). En el presente estudio, estos compuestos incrementaron notablemente la liberación basal de taurina sin modificar el volumen celular. El efecto inhibitorio observado sobre la liberación de taurina estimulada por hiposmolaridad, podría entonces deberse a una reducción en el tamaño de la poza endógena del aminoácido, más que a un efecto directo de estos compuestos sobre la proteína responsable de su liberación. Estos resultados, junto con

los del reemplazo del cloro por gluconato, hacen pensar que el aumento en la salida basal de la taurina en medio isosmótico provocada por los agentes mercuriales, posiblemente se debe a una alteración en el citoesqueleto adosado a la membrana celular, más que a un aumento en los flujos de agua con el concomitante aumento en el volumen.

Existe abundante evidencia del papel del citoesqueleto adosado a la membrana y de los grupos SH de una gran variedad de proteínas relacionadas con el transporte transmembranal (Klonk y Deuticke, 1992; Gilbert, 1982; Houtek y Pedersen, 1985). Los grupos sulfhidrilo parecen ser importantes en el transporte de aniones y cationes orgánicos (Sokol y Holohan., 1986; Bosin y Kasper., 1991; Zhan y Solomon., 1992), en la difusión facilitada de la glucosa (Czech., 1976; Regen y Cols., 1981) y en el transporte de aminas y aminoácidos dependiente de sodio en varios tipos celulares (Kanner., 1978; Wolfel y Cols., 1989; Alcántara y Cols., 1991). El bloqueo de estos grupos, asimismo, inhibe la liberación de taurina inducida por hiposmolaridad en los eritrocitos de la *Raja* sp. (Ballatori y Boyer., 1992). El mecanismo molecular sensible a la modificación de los grupos sulfhidrilo que subyace a la difusión de la taurina es aún desconocido. Se ha propuesto un intercambio disulfuro sulfhidrilo para explicar la acción de los agentes modificadores de los grupos SH en los transportadores y receptores (Robillard y Konnings., 1982; Gilbert., 1982). Este podría ser el caso para los flujos de taurina en el astrocito, pero hasta la fecha no se ha investigado el papel de los enlaces disulfuro sobre la permeabilidad a los aminoácidos.

Argininas

La participación de los grupos guanidino de las argininas en el transporte de glucosa y de fosfato se ha caracterizado en membranas epiteliales de riñón (Strévey y Brunette, 1984; Strévey y Cols., 1991). La importancia de estos residuos de aminoácidos ha sido puesta de manifiesto para el transporte de la bilirrubina y otros aniones electrogénicos en vesículas de membranas de hígado de rata (Passamonti y Cols., 1990). En los experimentos de la presente tesis, las concentraciones y tiempos necesarios para inhibir la liberación de taurina estuvieron dentro de aquellos reportados en la literatura (fenilglioxal, 10 mM, 20 min, 2,3-ciclohexanediona 60 mM, 20 min). A pesar de esto y de que en nuestras condiciones los controles se comportan como las células en medios normales, los resultados hay que tomarlos con cautela, pues si bien se observa una inhibición del proceso difusional de la taurina, no sabemos, por una parte, si la inhibición es consecuencia de alteraciones en el metabolismo celular y por otra hasta donde sabemos estos modificadores no se han estudiado en células íntegras. En apoyo a lo anterior se encuentra el hecho del aumento en la liberación basal de taurina causado por el fenilglioxal, así como la baja potencia inhibitoria de la ciclohexanediona.

CONCLUSIONES:

1. Los grupos SH endofaciales e intramembranales desempeñan un papel crucial en el proceso de liberación de taurina asociada al hinchamiento celular en astrocitos.
2. A partir de los diferentes grados de permeabilidad de cada uno de los reactivos bloqueadores de los grupos SH se puede decir que los grupos SH exofaciales probablemente no son esenciales para la difusión de la taurina inducida por hiposmolaridad.
3. Hay algunas indicaciones de que los grupos SH esenciales para la difusión de la taurina estimulada por hiposmolaridad están localizados en el dominio hidrofóbico de la membrana o en la superficie endofacial.
4. Los compuestos organomercuriales poco permeantes, mersalil y pCMBS, alteran los flujos de taurina mediante un mecanismo que no parece deberse a cambios en el volumen celular.
5. Las argininas modificadas por el fenilglioal y la ciclohexanediona parecen estar involucradas en el proceso difusional de la taurina estimulado por hinchamiento.
6. Todos estos resultados apoyan la participación de una proteína, como la mediadora del proceso difusional de la taurina estimulado por hiposmolaridad.

BIBLIOGRAFIA:

- Abbott Richard E. and Schachter David. 1988. Topography and functions of sulfhydryl groups of the human erythrocyte glucose transport mechanism. *Mol. Cell. Biochem.* 82:85-90.
- Alcántara, Rafael., López-Corcuera, Beatriz., and Aragón, Carmen. 1991., Group-selective reagent modification of sodium-and-chloride-coupled glycine transporter under native and reconstituted conditions. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1067:64-70
- Armende, L.H., Pierce, S.K. 1980. Cellular volume regulation in salinity stressed molluscs: the response of *Noetia ponderosa* (Arcidae) red blood cells to osmotic variation. *J. Comp. Physiol.* 138:283-289.
- Atlas, M., Bahal, J.J., Roeske, W. and Bresseler, R. 1984., *In vitro* osmorregulation of taurine in fetal mouse hearts, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16:311-320
- Ballatori N, Boyer JI. 1992. Taurine transport in skate hepatocytes. II. Volume activation, energy and sulfhydryl dependence. *Am. J. Physiol.* 262(Gastrointyest. Liver Physiol.):G451-G460.
- Bourke, R.S., Tower, D.B. 1966 Fluid compartamentation and electrolytes of cat cerebral cortex in vitro I. Swelling and solute distribution in mature cerebral cortex. *J. Neurochem.* 13:1071-1097
- Bourke, R.S. 1969. Studies of the development and subsequent reduction of swelling of mammalian cerebral cortex under isosmotic conditions in vitro. *Exp. Brain. Res.* 8:232-248
- Bourke, R.S., Kimelberg, H.K., Daze, M., Church, G. 1983. Swelling and ion uptake in cat cerebrocortical slices: Control by neurotransmitters and ion transport mechanisms. *Neurochem. Res.* 8:5-24.
- Boyle, P.J., Conway, E.J. 1941. Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J. Physiol. (London)* 100:1-63.
- Brooks, N. 1988. Neutral amino acid transport in Astrocytes: Characterization of Na⁺-Dependent and Na⁺-Independent Components of alfa-Aminoisobutyric Acid Uptake. *J. Neurochem.* 52(6):1913-1918.
- Choi, D.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7:369-379
- Cobb Charles E., and Beth Albert H. 1990. Identification of the EosinyI-5-maleimide

Reaction Site on Human Erythrocyte Anion-Exchange Protein: Overlap with the Reaction Sites of Other Chemical Probes. *Biochem.* 29:8283-8290.

- Cooke, K.R., Macnight, A.D.C. 1984. Effects of medium acetate on cellular volume in rabbit renal cortical slices. *J. Physiol.* (London) 349:135-156
- Crass, M.F. III and Lombardini, J.B. 1977., Loss of cardiac muscle taurine after acute left ventricular ischemia. *Life Sci.* 21:952-958
- Czech, M.P. 1976. Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system. *J. Biol. Chem.* 251:1164-1170
- De la Rosa, J., and Stipanuk, M.H. 1985, Evidence for a rate-limiting role of cysteine sulfinate decarboxylase activity in taurine biosynthesis in vivo *Comp. Biochem. Physiol.* 81B:565
- Dix, J.A., Ausiello, D.A., Jung, C.Y., Verkman, A.S. 1985. Target analysis studies of red cell water and urea transport. *Biochem. Biophys. Acta* 321:243-252.
- Domínguez, L., Montenegro, J., Pasantes-Morales, H. 1989. A volume dependent chloride sensitive component of taurine release stimulated by potassium from retina. *J. Neurosc. Res.* 22:356-361.
- Eveloff, S.L., Warnock, D.G. 1987. Activation of transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252:F1-F10.
- Fettiplace, R., Haydon, D.A. 1980. Water permeability of lipid membranes. *Physiol. Rev.* 60:510-550.
- Finchman, D.A., Wolowyk, M.W., Young, J.D. 1987. Volume sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J. Memb. Biol.* 96:45-56.
- Fushimi, K. Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F., Sasaki, S.; 1993.; Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature.* 362(6412):549-52
- García, J.J., Sánchez Olea, R., and Pasantes-Morales, H. 1991. Taurine Release Associated to Volume Regulation in Rabbit Lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* 45:207-212.
- Gilbert, H.F. 1982. Biological disulfides: the third messenger? *J. Biol. Chem.* 257:12086-12091.
- Gilles, R. 1979. Intracellular organic osmotic effector. In Gilles R. (ed). "Mechanisms of Osmoregulation in animals: Maintenance of Cell Volume". New York: Jhon Willey,

pp 111-154.

- Griffith, O.W. 1983, Cysteinsulfinate metabolism *J. Biol. Chem.* 258:1591.
- Grinstein, S., Rothstein, A., Sarkadi, B., and Gelfand, E.W. 1984. Responses of lymphocytes to anisotonic media: Volume regulating behavior. *Am. J. Physiol., Cell. Physiol.*, 15:C204-C215.
- Gujaray, F. and Sachs, F. 1984. Stretch-activated single ion currents in tissue cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.(Lond.)*, 352:685-701.
- Hoffmann, E.K. 1987. Volume regulation in cultured cells. *Curr. Topics Membr. Transp.*, 30:125-180
- Hoffmann, E.K., Simonsen, L.O. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol.Rev.* 69(2):315-382
- Hoffmann, E.K. 1992. Introduction III. Cell swelling and volume regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70:S310-S313.
- Housteck J, and Pedersen P.L. 1985. Adenine Nucleotide and Phosphate Transport Systems of Mitochondria. Relative location of sulfhydryl groups based on the use of the novel fluorescent probe eosin-5-maleimide. *J. Biol. Chem.* 260(10):6288-6295.
- Huxtable, R.J. and Bressler, R. 1973, Effect of taurine on a muscle intracellular membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, 323:573-583
- Huxtable, R:Y: 1992, The physiological actions of taurine, *Physiological Reviews* 72:101
- Islas, L., Pasantes-Morales, H., Sánchez J.A.; 1993. Characterization of Stretch-Activated Ion Channels in Cultured Astrocytes. *Glia* 8:87-96.
- Jessell, T.M. and Kandel, E.R. 1993., Synaptic Transmission: A Bidirectional and Self-Modifiable Form of Cell-Cell Communication. *Cell, Vol 72/Neuron, Vol. 10 (suppl.)*, 1-30 January.
- Jones, D.P., Chesney, R.W. 1991. Regulation of taurine transporter activity in LLC-PK1 cells role of protein synthesis and protein Kinase C activation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2(5):1021-9
- Jocelyn, P.C. (1972) Biochemistry of SH groups. Academic Press, New York.
- Kanner, B.I. 1978. Active transport of γ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17:1207-1211.

- Klonk S, and Deuticke B. 1992. Involvement of Cytoskeletal proteins in the barrier function of the human erythrocyte membrane. I. Impairment of resealing and formation of aqueous pores in the ghost membrane after modification of SH groups. *Biochem. Biophys. Acta* 1106:126-136
- Kontro, P. and Paasonen, M.K. eds., Progress in Clinical and Biological Research 119. Alan R. Liss, Inc., New York
- Kregenow, F.M. 1971. The response of duck erythrocyte to hypertonic media. Further evidence for a volume-controlling mechanism. *J. Gen. Physiol.*58:396-412.
- Kristensen, L.O., Folke, M. 1984. Volume-regulatory K⁺ efflux during conservative uptake of alanine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 221:265-268.
- Kristensen, L.O. 1986. Association between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 251:G575-G584.
- Laidlaw, S.A., Sturman, J.A., and Kopple, J.D. 1987., Effect of dietary taurine on plasma and blood cell taurine concentration in cats, *J. Nutr.* 117:1945
- Lambert, I.H., Hoffmann, E.K. 1993. Regulation of taurine transport in Erlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.* 131(1):67-79.
- Larsson, O.M., Griffiths, R., Allen, I.C. and Schousboe, A., 1986. Mutual inhibition kinetics analysis of gamma-aminobutyric acid, taurine, and beta-alanine high-affinity transport into neurons and astrocytes: evidence for similarity between the taurine and beta-alanine carriers in both cells types., *J. Neurochem.* 47:426-432
- Lau, K.R., Hudson, R.L., Schultz, S.G. 1984. Cell swelling increases a barium-inhibitable potassium conductance in the basolateral membrane of *Necturus* small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3591-3594.
- Lauf, P.K. 1985. On the relationship between volume-and-thiol-stimulated K⁺ Cl⁻ fluxes in red cells membranes. *Mol. Physiol.*8:215-234.
- Lehmann, A. 1989. Effect of microdialysis-perfusion with anisotonic media on extracellular amino acids in the rat hippocampus and skeletal muscle. *J. Neurochem.* 54:525-535.
- Ligeti E, and Fonyó A. 1989. Phosphate transport of rat heart mitochondria: Location of its SH-groups and exploration of their environment. *Biochem. Biophys. Acta* 973:170-175.
- Lipton, P. 1973. Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebral

- cortical slices. *J. Physiol.* 231:365-383.
- Lundblad, R.E. 1991. Chemical reagents for protein modification. CRC Press, Boca Ratón Fla, USA, pp 95-213.
- Macknight, A.D.C. 1983. Volume regulation in mammalian kidney cells. *Mol. Physiol.* 4:17-31
- Macknight, A.D.C. 1985. Cellular responses to extracellular osmolality in: The kidney Physiology and Pathophysiology. Seldin, D.W., Giebisch, G. (eds.). New York: Raven, pp. 117-132
- Macleod, R.J., and Hamilton, J.R. 1991. Separate K⁺ and Cl⁻ transport pathways are activated for regulatory volume decrease in jejunal villus cells. *Am. J. Physiol.*, 260:G405-G415.
- Martin, D.L. and Shain, W. 1979. High affinity transport of taurine and Beta-alanine and low affinity transport of gamma-aminobutyric acid by a single transport system in cultured glioma cells, *J. Biol. Chem.* 254:7076-7084.
- May, J.M. 1989. Interaction of a permeant maleimide derivative of cysteine with the erythrocyte glucose carrier. *Biochem. J.* 263:875-881.
- Moller, M., Mollgard, K., Lund-Andersen, H., and Hertz, L., 1974. Concordance between morphological and biochemical estimates of fluid spaces in rat brain cortex slices. *Exp. Brain. Res.* 22:299-344
- Morán, J., and Patel A.J. 1989. Stimulation of the N-methyl-D- aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain. Res.* 486:15-25.
- Murakami, M., Takada, K., Fujii, T., Muranishi, S. 1988. Intestinal absorption enhanced by unsaturated fatty acids: inhibitory effect of sulfhydryl modifiers. *Biochem. Biophys. Acta.* 939:238-246.
- Morris, J.G., Rogers, Q.R., and Pacioretty, L.M. 1990, Taurine: an essential dietary nutrient for cats, *J. Sm.Anim.Pract.* 31:502-509
- Nanavati, C., Markin, V.S., Oberhauser, A.F., Fernandez, J.M. 1992. The exocytotic fusion pore modeled as a lipidic pore. *Biophys. J.* 63(4):1118-1132.
- Nieminen, M.L., Tuomisto, L., Solatunturi, E., Eriksson, L., Paasonen, M.K. 1988. Taurine in the osmoregulation of the Battleboro rat. *Life. Sci.* 42:2137-2143.

- Olson, J.E., Sankar, R., Holtzman, D., James, A., and Fleischacker, D.; 1986. Energy-Dependent Volume regulation in Primary Cultured Cerebral Astrocytes. *J. Cell. Physiol.* 128:209-215.
- Orkand, R.K., Dietzel, I., Coles, J.A. 1984. Light-induced changes in extracellular volume in the retina of the drone, *Apis mellifera*. *Neurosc. Lett.* 45:273-278.
- Park C. S., Philip, S. Doh., Joo Lee., Dae Suk Han., Robert E. Carraway and Tracy B. Miller. 1990. Cellular Mechanism of Stimulation of Renin Secretion by the Mercurial Diuretic Mersalyl. *J. Pharm. Exp. Ther.* 257(1):219-224
- Parker, J.C. 1983. Volume-responsive sodium movements in dog red blood cells: anion effects. *Am. J. Physiol.* 244:C313-C317.
- Pasantes-Morales, H. and Cruz, C. 1983, Possible mechanisms involved in the protective action of taurine on photoreceptor structure, in "*Sulfur Amino Acids: Biochemical and Clinical Aspect*", K. Kuriyama, R.J. Huxtable, and H. Iwata, pp. 263-276, Alan R. Liss, New York.
- Pasantes-Morales, H., Domínguez, L., Montenegro, J., and Morán, J. 1988. A chloride-dependent component of the release of labeled GABA and taurine from the chick retina. *Brain. Res.* 459:120-130.
- Pasantes-Morales, H., Schousboe, A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoefector. *J. Neurosc. Res.* 20:505-509
- Pasantes-Morales, H. and Martín del Río, R. 1990, Taurine and mechanisms of cell volume regulation, *Progr. Clin. Biol. Res.* 352:317-328
- Pasantes-Morales, H., Moran, J., Schousboe, A. 1990. Volume-Sensitive Release of Taurine From Cultured Astrocytes: Properties and Machanism. *Glia* 3:427-432.
- Pasantes-Morales, H. García, J.J., Sánchez Olea R. 1991. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acid from human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 41(2):303-307.
- Pasantes-Morales, H., Alavez, S., Sánchez Olea, R., and Morán, J. 1993., Contribution of Organic and Inorganic Osmolytes to Volume Regulation in Rat Brain Cells in Culture *Neurochem. Res.*, 18(4):445-452
- Passamonti, S., Battiston, L., Sottocasa, L.G., 1990. Arginine residues are involved in the transport function of bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Acta* 1025:122-126
- Perisamy, N. Kau. H.P., Fushimi, K. and Verkman, A.S.; 1992. Organic osmolytes

- increases cytoplasmic viscosity in kidney cells. *Am. J. Physiol.* 263(Cell Physiol 32):C901-C907.
- Pierce, S.K., Greenberg, M.J. 1972. The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *J. Exp. Biol.* 57:681-692.
- Rasmusson R.L., Davis D.G. y Lieberman M. 1993. Amino acid loss during volume regulatory decrease in cultured chick heart cells. *Am. J. Physiol.* 264(Cell Physiol 33):C136-C145.
- Regen, D.M., Schraw, W.P., Tarpley, H.L., Juliao, S.F. 1981. Effects of thiol reagents on glucose transport in thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 644:62-68.
- Remy, A. Henry, S., and Tappaz, M. 1990. Specific antiserum and monoclonal antibodies against taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase: identity of brain and liver enzyme, *J. Neurochem.* 54:870
- Robillard George T. and Konings Wil N. 1982. A Hypothesis for the Role of Dithiol-Disulfide Interchange in Solute Transport and Energy-Transducing Processes. *Eur. J. Biochem.* 127:597-604.
- Rothstein A. 1970. Sulfhydryl groups in membrane structure and function. In. Current Topics in Membrane Transport, ed. by F. Bronner and A. Kleinzeller, Academic Press, New York, 1970, Vol. 1, pp. 135-176.
- Rothstein A. and Mack E. 1991. Actions of mercurials on cell volume regulation of dissociated MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 260(Cell physiol. 29):C113-C121.
- Rothstein, A., and Mack, E. 1992. Volume-activated calcium uptake: its role in cell volume regulation of Madin-Darby canine Kidney cells. *Am. Jour. Cell. Phys.* 31(2):339
- Roy, G., Sauvé, R. 1987. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.* 100:83-96.
- Saltin, B., Sjogaard, G., Strange, S., Juel, C. 1987. Redistribution of K⁺ in the human body during muscular exercise; its role to maintain whole body homeostasis. En: Shiraki, K., Yousef, M.K. (ed) "Man in Stressful Environments Thermal and Work Physiology". Springfield, pp. 247-267.
- Sánchez Olea, R., Morán, J., and Pasantes-Morales, H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion. *Neurosc. Lett.* 130:233-236

- Sánchez Olea, R., Moran, J., Martínez, A., Pasantes-Morales, H., H. 1993. Volume-activated Rb^+ transport in astrocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 264(Cell Physiol.33):C836-C842.
- Schaffer, S.W., Kulakowski E.C. and Kramer, J.H. 1982. Taurine transport by reconstituted membrane vesicles, in: "Taurine in nutrition and Neurology," R.J. Huxtable and H. Pasantes- Morales, eds, Plenum Press, New York/London, pp. 143-160
- Schoffeniels, E. 1976. Biochemical approach to osmoregulatory processes in crustacea. En Davies PS (ed): "Chemical Zoology". New York: Academic Press Vol.5 pp255-286.
- Schultz, E., Neuhoﬀ, V. 1983. Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Neuroscience* 18:253-258.
- Sokol P.P., Holohan P.D., Ross C.R. 1986: Essential Disulfide and Sulfhydryl Groups for Organic Cation Transport in Renal Brush-border Membranes. *J. Biol. Chem.*261(7):3282-3287.
- Solís, J.M., Herranz, A.S., Herreras, O., Lerma, J. and Martín del Río, R. 1988., Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain?. *Neurosc. Lett.* 91:53-58
- Solomon, A.K., Chasan, B., Dix, J.A., Lukacovic, M.F., Toon, M.R. Verkman, A.S. 1984. The aqueous pore in the red cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 414:79-124.
- Spring, K.R. 1985. Determinations of epithelial cell volume. *Fed. Proc.*44:2526-2529.
- Strévey, J., Brunette, G., Béliveau R., 1984. Effect of arginine modification on Kidney brush-border-membrane transport activity. *Biochem. J.* 223:793-802.
- Strévey, J., Vachon, V., Baumier, B., Giroux, S., Béliveau, R., 1991. Characterization of essential arginine residues implicated in the renal transport of phosphate and glucose. *Biochim. Biophys. Acta* 1106:110-116.
- Sturman, J.A., Wen, G.Y., Winiewski, H.M., and Neuringer, M.D., 1984., Retinal degeneration in primates raised on synthetic human infant formula *J. Dev. Neurosci* 2:121-129
- Trenkener, E. 1990., The role of taurine and glutamate during the early postnatal cerebellar development of normal and weaver mutant mice, in "Excitatory amino acids and Neuronal Plasticity, Y. Ben-Ari, ed., Plenum Press, *Adv.Exp.Med.Biol* 268:239-244

- Thurston, J.H., Hanhart, R.E., Dirg, J.A. 1980. Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26:1561-1568.
- Thurston, J.H., Hanhart, R.E., Naccarato, E.F. 1981. Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian heart. *Science* 214:1373-1374.
- Uchida, S., Kwon, H.M., Preston, A.S., Handler, J.S. 1991. Expression of Madin-Darby canine Kidney cell Na⁺ and Cl⁻-dependent taurine transporter in xenopus laevis oocytes. *J. Biol. Chem.* 266(15):9605-9
- Ussing, H.H. 1982. Volume regulation in frog skin epithelium. *Acta Physiol. Scand.* 114:363-369.
- Ussing, H.H. 1986. Epithelial cell volume regulation illustrated by experiments in frog skin. *Renal Physiol.* 9:38-46.
- Varga, V., Török, K., Feuer, L., Gulyás, J., and Somogyi, J. 1985, gamma-Glutamyltransferase in the brain and its role in the formation of gamma-glutamyl-taurine, in "Taurine: Biological Actions and Clinical Perspectives," S.S.Oja, L. Ahtee,
- Vislie, T., and Fugelli, K. 1975., Cell volume regulation in flounder *Platichthys flesus*) heart muscle accompanying an alteration in plasma osmolality, *Comp. Biochem. Physiol.* 52A:415-418)
- Waltz, W., Kimelberg, H., 1985. Differences in cation transport properties of primary astrocytes cultures from mouse and rat brain. *Brain. Res.* 340:333-340
- Waltz, W. 1987. Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:1051-1057
- Waniewski, R.A., Martin, D.L and Shain, W. 1991., Isoproterenol selectively releases endogenous and [¹⁴C]-labelled taurine from a single cytosolic compartment in astroglial cells. *Glia* 4:83-90
- Wo, J. Y. 1982, Purification and characterization of cysteic acid and cysteine sulfinic acid decarboxylase and L- glutamate decarboxylase from bovine brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4270
- Wolf W.A., and Kuhn D.M. 1992. Role of Essential Sulfhydryl Groups in Drug Interactions at the Neuronal 5-HT Transporter. *J. Biol. Chem.* 267(29):20820-20825.
- Yantorno, R.E., Coca-Prados, T., Krupin, T., and Civan, M.M. 1989. Volume regulation of cultured, transformed, non-pigmented epithelial cells from human ciliary body.

Exp. Eye. Res.,49:423-437.

Zhan, Z., Solomon, A.K. 1992. Effect of pCMBS on anion transport in human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1106:31-39.