



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**Modulación de los receptores GABA_A por la taurina y sus análogos
estructurales en la línea celular STC-1**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:
BIOL. ELIZABETH CABRERA RUIZ**

**TUTORES
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)
DR. DANIEL REYES HARO (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. STEPHANIE THEBAULT (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)
DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ CÓRDOVA (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)**

Campus Juriquilla Querétaro. FEBRERO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

**Modulación de los receptores GABA_A por la taurina y sus análogos
estructurales en la línea celular STC-1**

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Biol. Elizabeth Cabrera Ruiz

Directores de Tesis
Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Dr. Daniel Reyes Haro

Campus Juriquilla, Querétaro. 2013

**Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Elizabeth Cabrera Ruiz, cuyo título es: Modulación de los receptores GABA_A por la taurina y sus análogos estructurales en la línea celular STC-1 se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez

Secretario (Tutor)

Dr. Daniel Reyes Haro

Vocal

Dr. Edgar Heimer de la Cotera

Suplente

Dra. Veronica M. Rodríguez Córdova

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Aprobado por el Comité Académico

**Dra. Teresa Morales Guzmán
Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)**

Resumen

El ácido γ -amino butírico (GABA) es uno de los principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso central (SNC), el cual ejerce su función por medio de receptores ionotrópicos ($GABA_A$) y/o metabotrópicos ($GABA_B$). Los receptores ionotrópicos $GABA_A$ comprenden 19 subunidades, que incluyen las subunidades $GABA\rho$. Las subunidades $GABA\rho$ forman receptores homoméricos que pueden ser activados o modulados por aminoácidos como la glicina, la β -alanina y la taurina. Por ello el objetivo del proyecto fue determinar si la taurina y sus análogos estructurales son agonistas de los receptores $GABA_A$ y/o modulan las corrientes iónicas generadas al ser activados por GABA.

Los cultivos de la línea celular STC-1 fueron seleccionados para nuestro estudio porque expresan endógenamente receptores $GABA_A$. La técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa se utilizó para investigar las corrientes producidas por la aplicación de GABA, taurina y sus análogos estructurales hipotaurina y homotaurina.

Una fracción de las células STC-1 generó corrientes activadas por GABA [100 μ M] en el 85% de las células, por taurina [1mM] en el 33% y [3mM] en el 50% de las células, hipotaurina [3mM] en el 46 % de las células y homotaurina [30mM] en el 87% de las células. Adicionalmente, bicuculina [100 μ M] antagonista selectivo de receptores $GABA_A$, bloqueó las respuestas de cada una de estas moléculas.

En la segunda parte del estudio se investigó si la taurina, la hipotaurina o la homotaurina a [1mM] modulan las respuestas de GABA [100 μ M]. Los resultados indican que cada uno de los fármacos incrementan la constante de desactivación *tau* (τ). Las τ 's calculadas fueron GABA ($\tau = 4.5$ ms) < homotaurina ($\tau = 10.7$ ms) < hipotaurina ($\tau = 19.5$ ms) < taurina ($\tau = 35.4$ ms).

Con base en estos resultados concluimos que la taurina y sus análogos estructurales generan respuestas en una población de células STC-1 y modulan la τ de desactivación de las respuestas producidas por GABA.

Abstract

The γ -aminobutyric acid (GABA) is one of the major inhibitory neurotransmitters in the central nervous system (CNS), acting through ionotropic (GABA_A) and/or metabotropic (GABA_B) receptors. The GABA_A receptor comprises 19 subunits, including GABA_ρ subunits that are activated or modulated by other amino acids such as glycine, β -alanine and taurine. Among them, the latest is the most abundant in the brain. Thus, the aim of this project was to determine if taurine and its structural analogs are agonists of GABA_A receptors and/or modulate GABA-currents.

The STC-1 cell line was used for this study because it expresses GABA_A receptors endogenously. The results showed that GABA [100 μ M], taurine [1mM], hypotaurine [3mM] or homotaurine [30mM] evoked currents in 85%, 33%, 46% and 87% of the recorded cells, respectively.

The second part of the study investigated whether taurine, hypotaurine or homotaurine at [1mM], modulated GABA [100 μ M] responses. Our results showed that the deactivation constant *tau* (τ) obtained for GABA ($\tau = 4.5\text{s}$) was slower when homotaurine ($\tau = 10.7\text{s}$), hypotaurine ($\tau = 19.5\text{s}$) or taurine ($\tau = 35.4\text{s}$) were co-applied with GABA.

Therefore, we conclude that taurine, hypotaurine and homotaurine activate GABA_A receptors in a fraction of STC-1 cells and modulate the deactivation rate (τ) of GABA responses.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**

Jefe de Laboratorio

Dr. Ricardo Miledi y Dau

Tutores

Dr. Ataúlfo Martínez Torres y Dr. Daniel Reyes-Haro

Comité Tutelar

Dra. Stéphanie Colette Thebault

Dra. Verónica M. Rodríguez Córdova

Jurado de Examen

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez, Dr. Daniel Reyes Haro, Dr. Edgar Heimer de la Cotera, Dra. Veronica M. Rodríguez Córdova y Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Personal de apoyo en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (D15)

Técnico Académico M. en C. Angeles Edith Espino Saldaña

Auxiliar de laboratorio Lic. Efrén Ruíz Alcibar

Unidad de enseñanza

M. en C. Leonor Casanova Rico

Biblioteca

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

MVZ. Román Pacheco Barrita

Bioterio

MVZ. José Martín García Servín

Videoconferencia

Lic. en Psicología Ma. de Lourdes Lara Ayala

El presente proyecto fue financiado por:

Fondos para la Investigación del CONACYT No. 101851;166964

Proyecto PAPIIT-DGAPA: IA201311, IN202609, IN206411,IA202411

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No:370536

Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

No. Cuenta: 09906837-2

Dedicada a Regina

ABREVIATURAS

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BGT-1	Transportador de betaína
CACA	Ácido-cis-4-aminocrotónico
CAMP	Ácido carboxílico cis-2-aminomethyl-cicloproprano
CCK	Colecistokininas
Cm	Capacitancia de membrana
CSD	Ácido cisteinsulfínico descarboxilasa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC ₅₀	Concentración media máxima efectiva
GABA	Ácido y aminobutírico
GABA _A	Receptor ionotrópico del ácido y aminobutírico tipo A
GABA _B	Receptor metabotrópico del ácido y aminobutírico tipo B
GABA _ρ	Receptor ionotrópico del ácido y aminobutírico tipo rho
GABA-T	Enzima transaminasa de GABA
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GAT	Transportador de GABA
Glu	Glutamato
I4AA	Ácido imidazole-4-acético
pH	Potencial de hidrógeno
PTX	Picrotoxina
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
SSA	Semialdehído succínico
TACA	Ácido trans-4-aminocrotónico
TAMP	Ácido carboxílico trans-2-aminometil-cicloproprano
TAU (τ)	Constante de desactivación
TAUT	Transportador de taurina
THIP	Ácido imidazole-4-acético
TPMPA	Ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-metilfosfínico

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ácido γ -aminobutírico	2
1.2. Receptores a GABA	4
1.2.1. Receptor GABA _B	4
1.2.2. Receptor GABA _A	4
1.3. Taurina	8
1.3.1. Taurina en el Sistema Nervioso	9
1.4 Línea celular STC-1	11
2. ANTECEDENTES	
2.1 Función de la Taurina sobre el sistema GABAérgico	13
2.2 Modulación del receptor GABA _A 1 por taurina y sus análogos estructurales	14
2.3 Receptores GABA _A y su expresión funcional en la línea celular STC-1	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1. Modelo de estudio	20
6.2. Registro electrofisiológico	20
7. RESULTADOS	24
7.1. Activación del receptor GABA _A por taurina	25
7.2. Activación del receptor GABA _A por hipotaurina	27
7.3. Activación del receptor GABA _A por homotaurina	29
7.4. Modulación de las respuestas a GABA	
7.4.1. Por taurina	31
7.4.2. Por hipotaurina	33
7.4.3. Por homotaurina	35

8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	44
10. REFERENCIAS	45
11. LISTA DE TABLAS	54
12. LISTA DE FIGURAS	54

1. Introducción

La comunicación en el sistema nervioso central (SNC) se lleva a cabo mediante la transmisión de señales químicas y eléctricas entre sus elementos neuronales, que son la neurona presináptica y la neurona postsináptica y un tercer elemento implicado que es la glía (Perea *et al.*, 2009). Los neurotransmisores generan señales químicas que pueden ser excitadoras o inhibitoras (Kandel *et al.*, 2000).

Uno de los neurotransmisores inhibitorios más importantes es el ácido γ -aminobutírico (GABA), cuyos receptores están ampliamente distribuidos en el SNC. Los receptores a GABA son objeto de estudios exhaustivos que abordan mecanismos de inhibición neuronal, enfermedades neurodegenerativas, sitios de acción de fármacos como los barbitúricos y benzodiazepinas entre otros (Sieghart, 2006).

Estudios farmacológicos sobre los receptores a GABA han tenido como objetivo la identificación de moléculas capaces de activar, inactivar, bloquear o modular su respuesta, permitiendo el diseño de nuevos fármacos selectivos. También han permitido el reconocimiento de sitios de unión alostéricos que pueden ser nuevos blancos farmacológicos (Sieghart, 2006).

Recientemente en nuestro laboratorio se encontró en un modelo de expresión heteróloga que el receptor GABA_A conformado por la subunidad $\rho 1$ es activado y modulado por la taurina y algunos análogos estructurales. En consecuencia el objetivo de este proyecto consiste en determinar si estas moléculas también modulan la respuesta del receptor GABA_A conformado por distintas subunidades expresadas endógenamente, en la línea celular STC-1 (Ochoa *et al.*, 2008; Ochoa *et al.*, en preparación).

1.1 Ácido γ -aminobutírico

El aminoácido GABA ($C_4H_9NO_2$) (Figura. 1), es uno de los transmisores inhibitorios de mayor abundancia y distribución en el SNC (Kandel *et al.*, 2000), además se ha sugerido que tiene un papel como factor neurotrófico durante el desarrollo (Rae *et al.*, 2009).

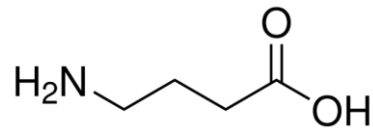


Figura. 1 Estructura química del ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA se sintetiza a partir de la descarboxilación de glutamato por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). La GAD remueve el grupo α -carboxilo del glutamato para producir GABA y libera CO_2 , se encuentra soluble en el citoplasma de la terminal sináptica donde provee a las vesículas de GABA o bien se localiza unida a la membrana presináptica, unión que depende de la presencia de cationes como el Ca^{2+} o el K^+ , presenta dos isoformas la GAD67 y la GAD65 codificadas por genes distintos (Fenalti *et al.*, 2007), su expresión ha permitido determinar la distribución de las células GABAérgicas en el SNC (Kandel *et al.*, 2000). La síntesis del GABA ocurre de manera acoplada a su liberación, esta puede ser de manera rápida mediante un mecanismo de exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Jin *et al.*, 2003) o bien por mecanismos de liberación tónica, a través de un canal aniónico llamado Bestrofina-1 presente en las células gliales y el cual es activado por cambios en el volumen celular (Lee *et al.*, 2010).

El GABA libre en el espacio extracelular puede ser capturado por transportadores de GABA (GAT) presentes en la neurona presináptica o en las células gliales. A la fecha se conocen cuatro tipos; GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1, el último también es transportador de betaina. Los GAT efectúan un transporte electrogénico que requiere de Na^+ y de Cl^- para su funcionamiento (Kanner, 1994). El GABA recapturado en las terminales nerviosas está disponible para su reutilización, mientras que el GABA

recapturado por la glía es catalizado mediante una reacción de transaminación por acción de la enzima transaminasa de GABA (GABA-T), la cual es responsable de la transferencia del grupo amino de GABA al ácido α -cetoglutarico formando el semialdehído succínico (SSA) y ácido glutámico. La enzima deshidrogenasa del semialdehído requiere de NADP como coenzima y oxida el SSA a ácido succínico, que es reincorporado al ciclo de Krebs (Olsen y Betz, 2006) (Figura. 2).

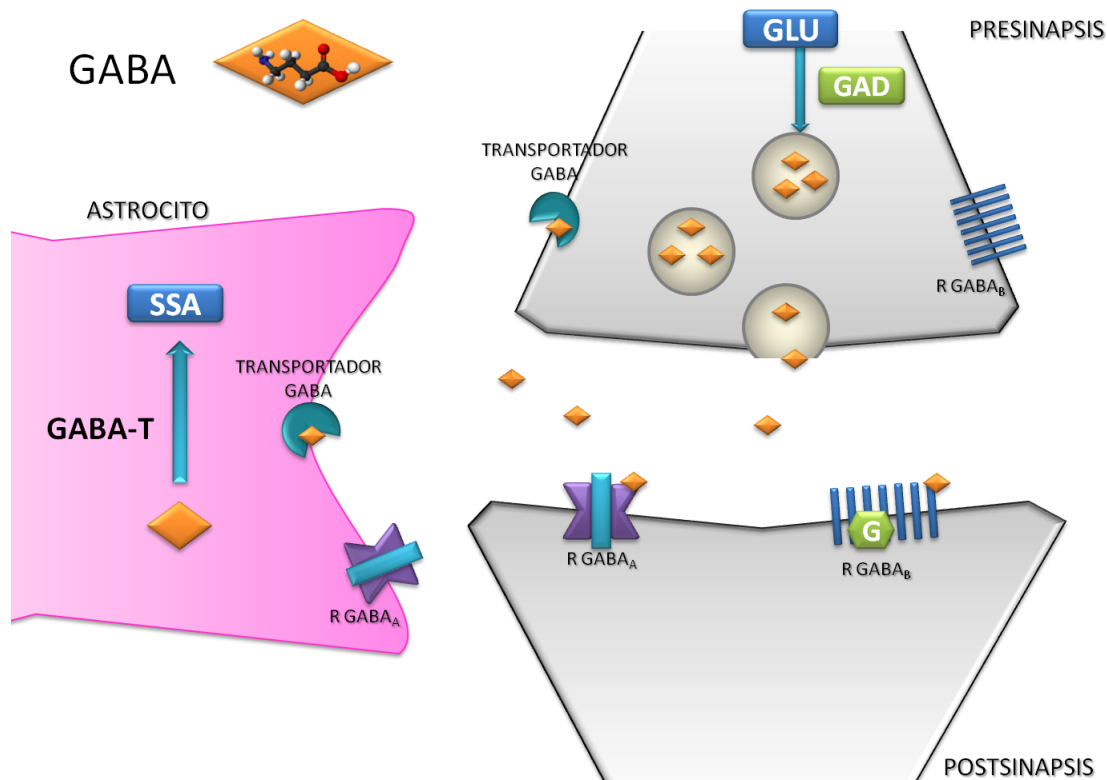


Figura 2. Sistema GABAérgico. Glutamato (Glu), semialdehído succínico (SSA), GABA descarboxilasa (GAD), enzima transaminasa de GABA (GABA-T), receptor GABA_A (RGABA_A) y receptor GABA_B (RGABA_B) (Olsen y Sieghart, 2008; Olsen y Betz, 2006).

El GABA ejerce su acción al unirse a los receptores de membrana que son de dos tipos: los GABA_A de tipo ionotrópico y los receptores GABA_B metabotrópicos (Olsen y Sieghart 2008).

1.2 Receptores a GABA

1.2.1. El receptor GABA_B. Pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, están conformados por dos subunidades: R1 y R2. Cada subunidad es una cadena polipeptídica que consta de 7 segmentos transmembranales, un extremo carboxilo terminal intracelular y el extremo amino terminal extracelular. La activación del receptor GABA_B desencadena diferentes mecanismos de señalización, que incluyen la hiperpolarización celular por el incremento de la conductancia de los canales de K⁺ o bien la inhibición de los canales de Ca²⁺ que resulta en la disminución de la liberación de neurotransmisores (Bowery *et al.*, 2002).

1.2.2. El receptor GABA_A. Es miembro de la superfamilia de receptores canal dependientes de ligando de acción rápida, junto con los receptores ionotrópicos de acetilcolina, glicina y serotonina (5HT₃) (Barnard, 2001). Es un complejo de glicoproteínas formado por 5 subunidades que se ensamblan para formar un receptor funcional (Figura 3). Se conocen 19 diferentes genes de las subunidades GABA_A: α₁₋₆, β₁₋₃, γ₁₋₃, δ, ρ₁₋₃, ε, π y θ (Olsen y Sieghar, 2008), la combinación estequiométrica típica descrita es de 2α, 2β y 1γ, (Tabla I) (McKernan *et al.*, 1996). La organización de las subunidades determina las propiedades funcionales y el perfil farmacológico del receptor (Olsen y Sieghar, 2008).

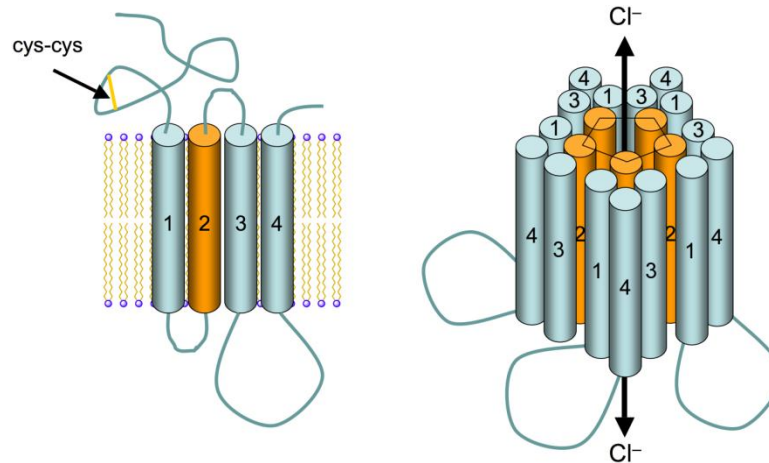


Figura 3. Modelo de la estructura del receptor GABA_A . Las subunidades del receptor forman un complejo pentamérico y cada subunidad forma una cadena polipeptídica de cuatro segmentos transmembranales (1-4) de los cuales el segmento 2 forma el canal permeable a Cl^- . El receptor presenta un dominio amino terminal con un puente intercisteínico (cys-cys), dos asas intracelulares y un dominio carboxilo terminal extracelular (Olsen y Sieghart, 2008).

La activación del receptor GABA_A ocurre con la unión de su ligando lo que permite la apertura del receptor-canal permeable a Cl^- (Olsen y Sieghart, 2008). El flujo del Cl^- estará determinado por el gradiente de concentración de este ión.

En las neuronas, la dirección del flujo del Cl^- es del espacio extracelular hacia el interior de la célula, debido a que la concentración intracelular del ión es menor que su concentración extracelular ($\sim 110 \text{ mM}$; en diferentes tejidos y especies); la entrada del ión con carga eléctrica negativa produce la hiperpolarización de la célula (Koester y Siegelbaum., 2000). En el caso de la neurona la transmisión sináptica será inhibida y el potencial de acción no se producirá (Kandel E y Siegelbaum 2000). En la glía la concentración de Cl^- es mayor que en las neuronas (35 mM vs. $\sim 3\text{-}5 \text{ mM}$; evaluado por métodos radiactivos midiendo el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ o por el uso de microelectrodos sensibles a Cl^-) (Zerbst-Boroffka, 1970) y la activación de los receptores GABA_A incrementa el flujo del Cl^- hacia el espacio extracelular ocurriendo la despolarización, mostrado en cultivos de oligodendrocitos y astrocitos (Bormann y Kettenmann, 1988; Gilbert *et al.*,

1984; Kettenmann *et al.*, 1984). El potencial de equilibrio para el Cl⁻ en astrocitos es cercano a -40mV, mientras que en neuronas es de -70mV (Verkhratsky, 2008).

En la línea celular STC-1, que fue utilizada como modelo de estudio, en contraste a la mayoría de las neuronas el efecto de la activación del receptor GABA_A produce la despolarización y el potencial de equilibrio del Cl⁻ es cercano a 0mV (Glassmeier *et al.*, 1998).

Tabla I. Principales subtipos de conformaciones del receptor GABA_A en el cerebro

Combinación de subunidades	Abundancia relativa (%)	Ejemplos de regiones de localización	Referencias
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	43	En la mayoría de las áreas del cerebro; hipocampo, corteza y células de Purkinje.	Benke <i>et al.</i> , 1991 Fritschy <i>et al.</i> , 1992 Somogyi <i>et al.</i> , 1996
$\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$	18	Motoneuronas de la médula espinal y células piramidales del hipocampo	Benke <i>et al.</i> , 1994 Fritschy <i>et al.</i> , 1998
$\alpha 3\beta 2/3$	17	Neuronas colinérgicas y monoaminérgicas	Fritschy <i>et al.</i> , 1992 Quirk <i>et al.</i> , 1994
$\alpha 2\beta 2/3\gamma 1$	8	Glía de Bergmannn, ganglios basales	Quirk <i>et al.</i> , 1994
$\alpha 5\beta 3\gamma 2/3$	4	Células piramidales hipocámpales	McKernan <i>et al.</i> , 1991 Fritschy y Möhler, 1995
$\alpha 6\beta \gamma 2$	2	Células granulares cerebelosas	Quirk <i>et al.</i> , 1994 Nusser <i>et al.</i> , 1998
$\alpha 6\beta \delta$	2	Células granulares cerebelosas	Quirk <i>et al.</i> , 1994 Nusser <i>et al.</i> , 1998
$\alpha 4\beta$	2	Tálamo y giro dentado del hipocampo	Bencsits <i>et al.</i> , 1999
$\alpha 4\beta \gamma 2$	2	Tálamo y giro dentado del hipocampo	Bencsits <i>et al.</i> , 1999
$\alpha 4\beta \gamma \delta$	1	Tálamo y giro dentado del hipocampo	Bencsits <i>et al.</i> , 1999
Otras	1		

(Modificada de McKernan y Whiting 1996 y Sinkkonen 2004).

Los receptores GABA_A y GABA_B difieren en sus propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas y pueden ser regulados por diferentes agonistas o antagonistas (Tabla II) (Olsen y Sieghart, 2008). Adicionalmente el receptor a GABA_A puede ser activado por otros aminoácidos como glicina, β-alanina y taurina (Bureau y Olsen, 1991; Tiedje *et al.*, 2010).

Tabla II. Receptores a GABA y su caracterización farmacológica

RECEP-TOR	SUBUNIDADES	AGONISTA	ANTAGONISTA	MODULADOR
GABA _A	α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, π, θ	Muscimol	Bicuculina	Benzodiazepinas
		Isoguvacina	PTX	Barbitúricos
		TACA		Neuroesteroides
		THIP		
		14AA		
		TACA	PTX *(ρ1)	
	ρ1, ρ2, ρ3	CACA	TPMPA	
		TAMP	14AA	
		CAMP		
GABA _B	R1, R2	Baclofeno	Faclofeno Saclofeno	

CACA, ácido cis-4-aminocrotónico; CAMP, ácido carboxílico cis-2-aminomethyl-cycloproprano; PTX picrotoxina; TACA, ácido trans-4-aminocrotonico; TAMP, ácido carboxílico trans-2-aminomethyl-cycloproprano; THIP, 4,5,6,7- tetrahydroisoxazolo [5,4-c] pyridine-3-ol; I4AA, ácido imidazole-4-acetico; TPMPA, ácido metilfosfónico (1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl); *(ρ1) únicamente antagonista de la subunidad ρ1. (Bormann, 2000; Bowery *et al.*, 2002; Olsen y Sieghar, 2008; Rae *et al.*, 2009).

1.3. Taurina

La taurina (ácido 2-aminoetano-sulfónico, $C_2H_7NO_3S$) (Figura 4), es un aminoácido azufrado, tiene un pKa de 1.5 y un pKb de 8.74 por lo que en este intervalo se encuentra como un zwitterion, actúa como base o ácido lo que le permite cambiar de conformación espacial al disociarse, a un pH fisiológico el porcentaje de la conformación espacial *trans* es del 27% y el resto para la posición *cis* (Huxtable, 1992; Rodríguez *et al.*, 1989).

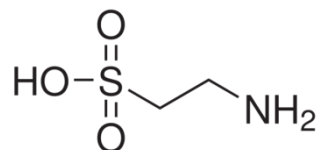


Figura 4. Estructura química de taurina (ácido 2-aminoetano-sulfónico).

Este aminoácido se encuentra en casi todas las células animales, no forma parte de las proteínas y constituye más del 65% de la poza total de aminoácidos libres (Pasantes-Morales *et al.*, 1998). La fuente principal de taurina es a partir de la dieta, sin embargo también es producto del catabolismo de la cisteína por la enzima cisteinsulfínico ácido descarboxilasa (CSD) de forma directa o después de la conversión de metionina a cisteína (Le-Corronc *et al.*, 2011; Oja y Saransaari, 2007) (Figura 5). La taurina es sintetizada en el hígado, se excreta libre o unida a sales biliares (Sturman, 1988).

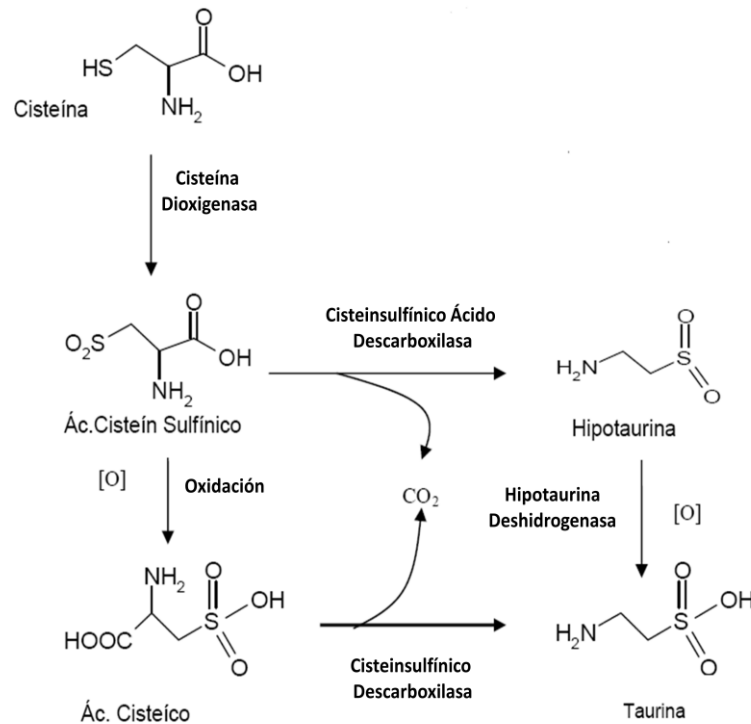


Figura 5. Síntesis de taurina (Le-Corronc *et al.*, 2001; Vitvitsky *et al.*, 2011)

1.3.1 Taurina en el Sistema Nervioso

En el cerebro la síntesis se lleva a cabo mediante la cooperación entre las neuronas y los astrocitos, en estos últimos la cisteína se metaboliza a hipotaurina que posteriormente es exportada hacia las neuronas para su conversión en taurina (Vitvitsky *et al.*, 2011). Estudios realizados mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear reportaron que en cultivos de células gliales de cerebro de rata el 35 % de la cisteína es convertida a hipotaurina y el 23% a taurina (Brand *et al.*, 1998). La taurina proveniente de la circulación es transportada a través de la barrera hematoencefálica por medio de un transportador dependiente de Na⁺ y Cl⁻, con estequiometría de 1:2:1 de taurina, Na⁺ y Cl⁻ respectivamente (Tamai *et al.*, 1995).

La taurina junto con el glutamato son los aminoácidos más abundantes en el SNC (Palkovits *et al.*, 1986). La concentración intracelular de la taurina es muy alta, en

proporción de hasta 400:1 en la retina (Pasantés-Morales, 1986), a la extracelular que es aproximadamente de 100 μM (Huxtable, 1992). Este gradiente, es el resultado de un equilibrio funcional de diferentes mecanismos: la captura por transportadores específicos (TAUT) dependientes de Na^+/Cl^- (TAUT- T_{1-2}) (Levi y Gallo, 1995); la síntesis de una pequeña cantidad proveniente del metabolismo de la cisteína (Brand *et al.*, 1998); también por mecanismos de liberación vía difusión dado por diferentes procesos, por ejemplo como efecto del hinchamiento celular, el mecanismo mecano- o volumen-sensible es activado (Pasantés-Morales *et al.*, 1990; Oja y Kontro, 1989). Así mismo, se reportó que la taurina presenta otro mecanismo liberación parcialmente dependiente del calcio por medio de la activación del receptor NMDA de glutamato en el hipocampo (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2009).

La taurina se encuentra ampliamente distribuida en el SNC, se presenta en concentraciones de hasta 79mM en la retina, en fotorreceptores, en células bipolares y en neuronas glutamatérgicas (Bulley y Shen, 2010, Lombardini, 1991). En áreas corticales, el caudado-putámen, el cerebelo, la eminencia media, el núcleo supra óptico, el hipotálamo y en las células de Purkinje en el cerebelo la concentración intracelular varía en un rango de 5-50mM (Madsen *et al.*, 1987; Magnusson *et al.*, 1989; Ottersen, 1988, Palkovits *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1986) y existe en menor concentración en el tálamo, en núcleos del tallo cerebral y la médula espinal (Decavel y Hatton, 1995; Madsen *et al.*, 1987; Palkovits *et al.*, 1986).

La taurina tiene diferentes funciones en el SNC; destaca como un osmo efector importante, por ejemplo en el balance de la presión osmótica en respuesta a un estímulo hipotónico actúa en la regulación del volumen celular (Pasantés-Morales *et al.*, 1998). Otra función en la que participa es durante la migración y organización celular en el cerebelo y la corteza visual durante el desarrollo temprano, donde es muy abundante en células progenitoras y neuronas inmaduras (Oja y Saransaari, 2000; Sturman, 1993). En el adulto se ha mostrado que está involucrada en la neuroprotección, dado que la reducción de su concentración causa déficit visual y degeneración morfológica en la retina (Militante y Lombardini, 2002). La acción protectora de la taurina también se

observa en condiciones de isquemia, de fibrosis y exposición a la luz (Pasantés-Morales y Hernández-Benitez, 2010).

La categorización de la taurina como un neurotransmisor ha sido poco considerada, por diversas características que posee: su concentración en el rango mM, que en su mayoría no se encuentra en vesículas, que su principal fuente es la dieta y que no se ha descrito que active un receptor específico (Kontro y Oja, 1990; Oja y Saransaari, 2007). Sin embargo, se ha mostrado que la taurina presenta un rol en la neurotransmisión mediante su interacción con los receptores glicina en diferentes modelos experimentales (Lynch, 2004). Por ejemplo: la taurina tiene una acción agonista sobre el receptor a glicina en neuronas de CA3 del hipocampo (Mori *et al.*, 2002), en neuronas corticales durante el desarrollo (la taurina liberada de células gliales locales) (Flint *et al.*, 1998) y sobre el receptor de glicina recombinante humano expresado en células HEK293 (Lewis *et al.* 2003). En neuronas del núcleo supra óptico de la rata, la taurina (liberada de las células gliales locales a través de canales regulados por volumen) (Choe *et al.*, 2012) inhibe el potencial de acción mediante la activación de los receptores a glicina (Hussy *et al.* 1997). También la taurina interacciona con los receptores a GABA como se describe en la sección de antecedentes.

1.4. Línea celular STC-1

La línea celular STC-1 derivó de células gastrointestinales neuroendócrinas que pertenecen al sistema nervioso entérico (SNE) (Erdö y Wolff, 1990; Glassmeier *et al.* 1998). En el SNE las neuronas involucradas en la comunicación GABAérgica que secretan GABA son principalmente interneuronas (Krantis *et al.*, 1998). El GABA ejerce sus efectos sobre las neuronas entéricas a través de los receptores GABA_A y GABA_B, aunque en contraste con el SNC en donde normalmente tiene un efecto inhibitorio, en el SNE GABA actúa como un neurotransmisor excitador o inhibitorio. Las proyecciones axónicas de las células GABAérgicas en el intestino son profusas, se ramifican a través de toda la red nerviosa ganglionar y no ganglionar y en otras capas de la pared

intestinal. La distribución de las fibras GABAérgicas se correlaciona con los datos funcionales que muestran que el GABA actúa en la modificación de la motilidad del intestino, la secreción de moco gástrico, la secreción del ácido gástrico así como el transporte de electrolitos a la mucosa (Poulter *et al.*, 1999).

Adicionalmente, el GABA estimula la secreción de colecistocininas (CCK), mediante la activación de los receptores GABA_A que lleva a la despolarización de la membrana celular y a la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, lo que estimula la liberación de CCK dependiente de Ca²⁺ (Glassmeier *et al.*, 1998). Las CCK juegan un papel importante en la regulación de la digestión, en particular en la contracción de la vesícula biliar, la secreción pancreática, la motilidad intestinal y la saciedad (Liddle, 1997). Además inducen la secreción de otras hormonas intestinales, y neurotransmisores como el GABA, este último participa en la señalización autócrina-parácrina por el mecanismo anteriormente mencionado (Glassmeier *et al.*, 1997).

Respecto a nuestro objeto de estudio no se tienen evidencias de la función de taurina sobre el sistema GABAérgico en el SNE. Sin embargo la taurina es uno de los aminoácidos libres más abundantes en las células epiteliales intestinales y juega un papel importante en las funciones intestinales. Por ejemplo, se sabe que la concentración intracelular de taurina se eleva en situaciones de estrés hipertónico, y que su incremento es vía el TAUT, mediante este mecanismo las células intestinales se protegen del estrés osmótico (Shimizu y Satsu, 2000).

2. Antecedentes

2.1 Función de la Taurina sobre el sistema GABAérgico

En células de Purkinje la taurina y análogos estructurales como la taurociamina, la hipotaurina y la homotaurina tienen una actividad inhibitoria, evaluada en la frecuencia de disparo espontánea (Figura 6). Adicionalmente, se calculó una EC_{50} de taurina 1mM, taurociamina 0.16 mM, hipotaurina 2.2 mM, homotaurina 1.9 μ M y GABA 0.11mM, indicando que la homotaurina es 500 veces más potente que la taurina, (Okamoto y Sakai, 1981).

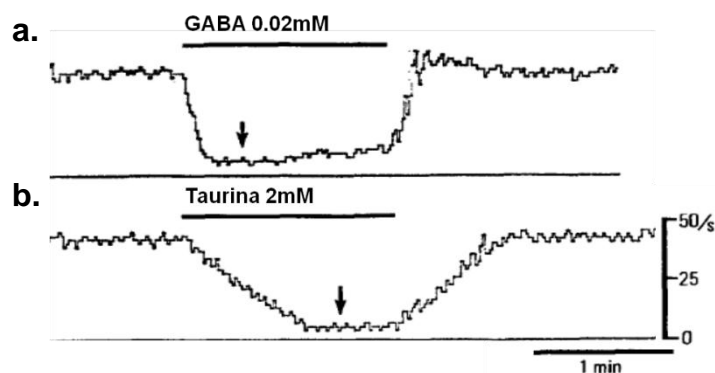


Figura 6. Actividad inhibitoria de la taurina en el SNC. La frecuencia de disparo espontánea registrada en células de Purkinje en rebanadas de cerebelo de cobayo es inhibida por la aplicación de **a.** GABA y **b.** taurina. Escala vertical: número de espigas por segundo. Escala horizontal: tiempo en minutos. Tomado de Okamoto y Sakai, 1981.

En otro modelo experimental se mostró que la taurina activa a los receptores $GABA_A$ en la glía de Bergmann (un tipo de astrocitos cerebelosos especializados, conocidos como glía radial, que durante el desarrollo provee una guía estructural para las células granulares y en el adulto están íntimamente relacionada con las células de Purkinje (Privat *et al.*, 1995)). En estas, se mostró que la aplicación extracelular de taurina produce corrientes de cloruro, las cuales son inhibidas por antagonistas de los

receptores GABA_A, lo que sugiere que parte de su actividad inhibitoria puede ser mediada por estos receptores (Figura 7) (Barakat *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 1994).

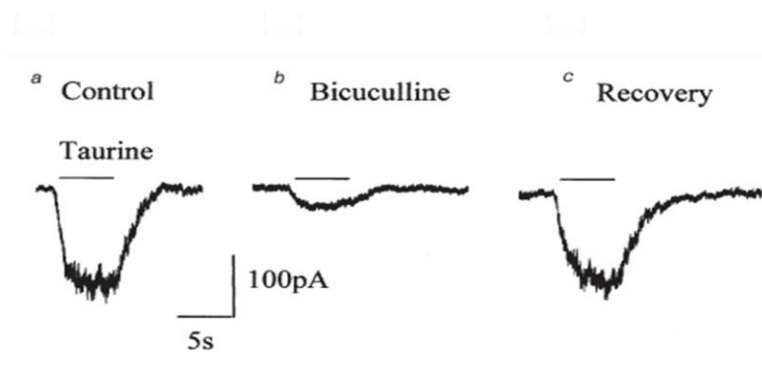


Figura. 7. Activación de los receptores GABA_A por la taurina en la Glía de Bergmann. a. Aplicación de 1mM de taurina, b. aplicación de 1mM de taurina y 150μM de Bicuculina y c. aplicación de 1mM de taurina después del lavado. Modificado de (Barakat *et al.*, 2002).

2.1 Modulación de GABA_{ρ1} por taurina y sus análogos estructurales

Experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo, mostraron que en GABA_{ρ1} humano expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*, la taurina actúa como agonista débil (Figura 8 a.) y que exhibe una función como modulador bifásico dependiente de la concentración (Figura 8 b.) (Ochoa *et al.*, 2008). En este mismo modelo también se observó que la hipotaurina tiene un efecto como agonista débil y que la homotaurina además de activar a este receptor también lo modula negativamente (Figura 8c. y d.) (Ochoa en preparación).

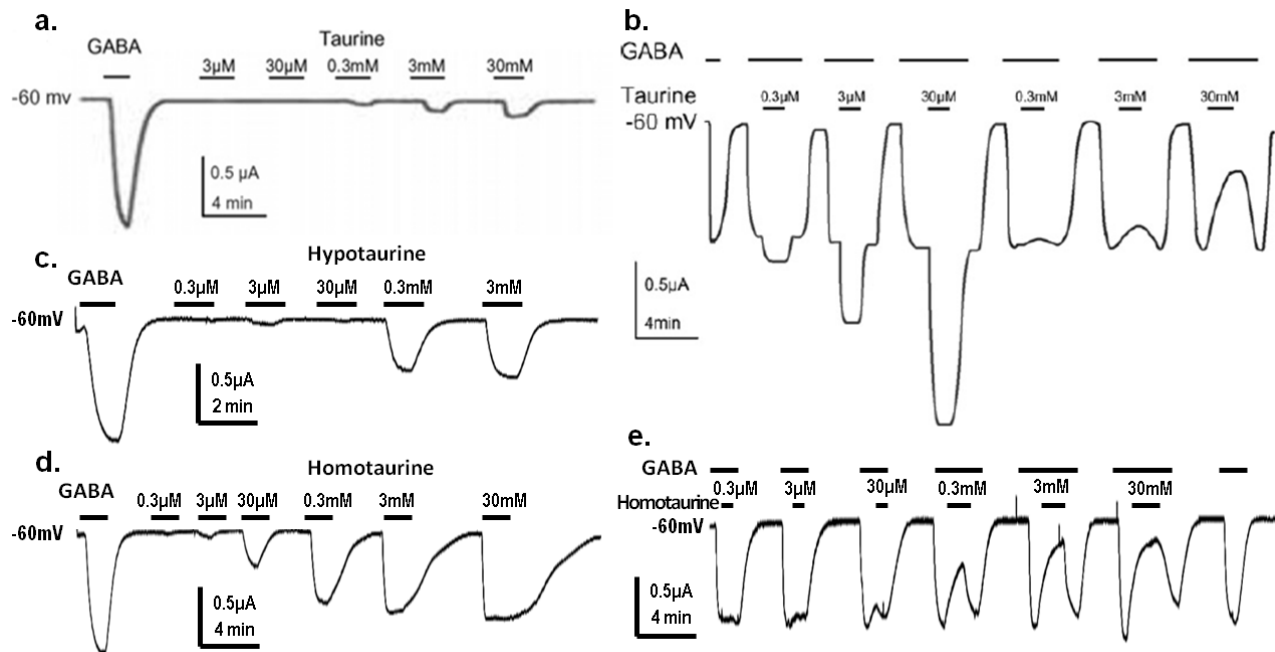


Figura. 8. Activación y modulación del receptor GABA ρ 1 por la taurina, la hipotaurina y la homotaurina en ovocitos de *X. laevis* a. Activación del receptor por la aplicación de taurina a diferentes concentraciones. b. Modulación bifásica por la taurina dependiente de la concentración. c. Activación del receptor por la aplicación de hipotaurina a diferentes concentraciones. d. Activación del receptor por la aplicación de homotaurina a diferentes concentraciones. e. Modulación negativa por la aplicación de homotaurina. Modificado de Ochoa y col. (2008) y Ochoa y col. (en preparación).

2.3 Receptores GABA $_A$ y su expresión funcional en la línea celular STC-1

Estudios electrofisiológicos realizados en la línea celular STC-1 indican la expresión funcional de los receptores GABA $_A$ (Glassmeier *et al.*, 1998). Adicionalmente por medio de RT-PCR se mostró la expresión endógena del ARNm de las subunidades del receptor GABA $_A$ α 2, α 3, α 5, β 1, β 3 y δ (Glassmeier *et al.* 1998) y por estudios realizados por Jansen y col. (2000) y en nuestro grupo de trabajo también mostraron la expresión del ARNm de las subunidades ρ 1 y ρ 2 (Machuca *et al.*, 2012) (Tabla III).

Tabla III. Expresión de diversas subunidades del receptor GABA_A en la línea celular STC-1

α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6	β_1	β_2	β_3	γ_1	γ_2	γ_3	ϵ	π	θ	δ	ρ_1	ρ_2	ρ_3
-	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND

3. Planteamiento del problema

Considerando que la taurina está implicada en el sistema GABAérgico, aunado a que es un agonista débil y modulador bifásico de GABA ρ 1, se planteó la siguiente pregunta: ¿Es posible que la taurina module la actividad del receptor GABA $_A$? Por lo tanto en el presente trabajo se propuso determinar el efecto de la taurina en la línea celular STC-1 que expresa endógenamente el receptor GABA $_A$ (Glassmeier, *et al.*1988, Jansen *et al.* 2000). También es importante considerar que la modulación bifásica de la taurina sobre GABA ρ 1 es dependiente de su concentración, una posible explicación podría ser por su característica zwitterionica, por ello se evaluó la aplicación de hipotaurina y homotaurina que son análogos estructurales de la taurina con una conformación estable (Rodríguez *et al.*, 1989).

4. Hipótesis

La taurina y sus análogos estructurales modulan las respuestas de los receptores GABA_A en la línea celular STC-1

5. Objetivos

- ❑ Determinar si el receptor GABA_A es sensible a taurina en la línea celular STC-1
- ❑ Determinar si los receptores a GABA_A son sensibles a los análogos estructurales de taurina, hipotaurina y homotaurina en la línea celular STC-1
- ❑ Evaluar si se presenta modulación de las respuestas a GABA por la taurina y sus análogos estructurales en la línea celular STC-1

6. Material y Método

6.1. Modelo de estudio

En el laboratorio el cultivo de línea celular STC-1 se mantuvo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) con suero fetal bovino al 3%, suero de caballo al 15%, 100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina y se colocó en cajas Petri sobre cubreobjetos (tratados con Poli-L ornitina 0.01%), en una incubadora a 37° C con una mezcla de aire 95% y 5% de CO₂. Se conservó en la incubadora en las mismas condiciones hasta el registro electrofisiológico (Glassmeier *et al.*, 1998).

6.2. Registro electrofisiológico

El registro se realizó a partir del tercer día de inicio del cultivo celular. Una fracción del cubreobjetos se colocó en un sistema de perfusión constante con solución extracelular (contiene en mM: 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES y 10 glucosa y se ajustó el pH a 7.3), montado en un microscopio invertido a temperatura ambiente (20-24 °C). Las pipetas de registro fueron hechas con capilares de borosilicato (Sutter Instruments, B150-86-15), con ayuda de un estirador de pipetas (Sutter Instruments, P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller). Cada pipeta se llenó con solución intracelular (contiene en mM: 130 KCl, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 2 MgCl₂, y se ajustó el pH a 7.3 con KOH 1N) (Glassmeier *et al.* 1998). La resistencia de las pipetas de registro con esta solución intracelular fue de 4 a 6 MΩ. Para el registro celular se utilizó la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (Hamill *et al.*, 1981), el voltaje de fijación seleccionado fue de -60mV. Se utilizaron el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) y el convertidor análogo-digital Digidata 1200 (Axon Instruments), la señal fue filtrada a 5 KHz y adquirida a 3.3KHz.

Capacitancia de la membrana

La capacitancia de la membrana (C_m) celular, se obtuvo por medio de la ecuación que describe la relación entre la constante de tiempo τ y la resistencia (R) de la membrana celular ($C_m = \tau/R$). A través de un pulso de voltaje de 10mV por 10ms aplicado a la célula. En unidades de pF.

Densidad de corriente

La densidad de corriente (δ), se calculó para cada célula registrada por medio del cociente ($\delta = \text{pA/pF}$) de la amplitud de la corriente generada (pA) entre el tamaño de la célula representado por la C_m (pF).

Constante de desactivación

La constante de desactivación Tau (τ) se calculó a partir del ajuste de la exponencial de la fase de desactivación de las corrientes generadas de cada célula, se calculó tomando como inicio el punto máximo de la corriente generada hasta el estado reposo (Kopanitsa *et al.*, 2002).

Aplicación de Fármacos

Con el fin de caracterizar las respuestas a GABA (adquirido de SIGMA, A2129) en la línea celular STC-1 cultivada en el laboratorio, se realizó una aplicación control de GABA 100 μ M (Glassmeier *et al.* 1998) en el sistema de perfusión y se verificó que la célula presentara la respuesta característica de la activación de los receptores GABA_A (corriente de entrada a Cl⁻) post exposición al fármaco, para determinar el porcentaje de células que respondían a GABA.

El 85% de las células respondió a la aplicación extracelular de GABA. En los experimentos subsecuentes se aplicó GABA 100 μ M como control para garantizar la

expresión funcional de los receptores GABA_A (al final del experimento). Las células que no mostraron respuesta a GABA no fueron incluidas en el análisis de grupos experimentales.

Para abordar el primer objetivo se le aplicó la taurina (adquirida de SIGMA, T0625) a 500µM, 1mM, 3mM y 10mM en diferentes grupos experimentales. Para cumplir el segundo objetivo se utilizaron los análogos estructurales de la taurina: la hipotaurina (adquirido de SIGMA, H1384) a 1, 3 y 10 mM y la homotaurina (adquirido de SIGMA, A76109) a 1, 10 y 30mM (Figura 9), cada concentración fue aplicada en diferentes grupos experimentales y posteriormente en todas las células registradas se corroboró la expresión funcional de los receptores a GABA con la aplicación de GABA 100µM.

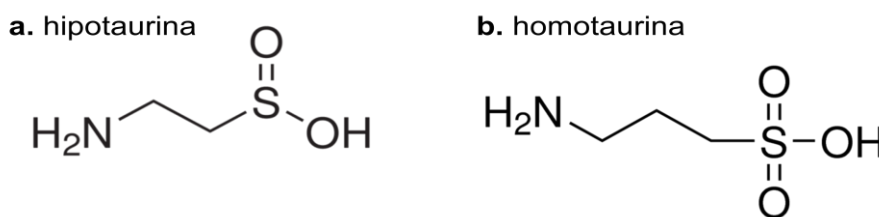


Figura 9. Estructura química de los análogos estructurales de taurina. **a.** Hipotaurina (2-Aminoethanosulfónico ácido) C₂H₇NO₂S, metabolito de la síntesis de la taurina y **b.** homotaurina (3-Amino-1-propanesulfónico ácido) H₂N(CH₂)₃SO₃H producto natural obtenido de algas rojas (Rodríguez *et al.*, 1989).

Se realizó la caracterización farmacológica las respuestas generadas por la aplicación de GABA, taurina y sus análogos estructurales mediante la co-aplicación con bicuculina (adquirido de SIGMA, 14343) a 100µM antagonista clásico de los receptores GABA_A.

Por último, con el fin de efectuar el tercer objetivo se realizó la co-aplicación de GABA 100µM con taurina, hipotaurina u homotaurina a 1mM.

Análisis estadístico

Los resultados de la aplicación de la taurina y sus análogos estructurales a diferentes concentraciones y los resultados de la co-aplicación de GABA 100 μ M con taurina, hipotaurina u homotaurina a 1mM, fueron analizados por la prueba de "U" de Mann-Witney.

En todos los casos se reportan los valores de probabilidad (p) y se aceptó como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fuese $P \leq 0.05$.

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SigmaPlot para Windows Versión 11.0.

7. Resultados

7.1 Expresión funcional del receptor GABA_A en las células STC-1

Nuestro primer paso fue corroborar la expresión funcional del receptor GABA_A en las células STC-1 (Glassmeier *et al.*, 1998). Nuestros datos indican que el 85.18% de las células registradas (n=23 de 27) respondieron a la aplicación extracelular de GABA 100μM con una respuesta de -150.1 ± 28.5 pA (max-505 y min. -40 pA) (Figura 10). Las células que respondieron tuvieron una Cm de 16.71 ± 0.65 pF (en un intervalo de 10 a 23 pF). Además la densidad de corriente media fue de -7.84 ± 1.77 pA/pF, mientras que la constante de desactivación τ fue de 4.5 ± 0.8 ms.

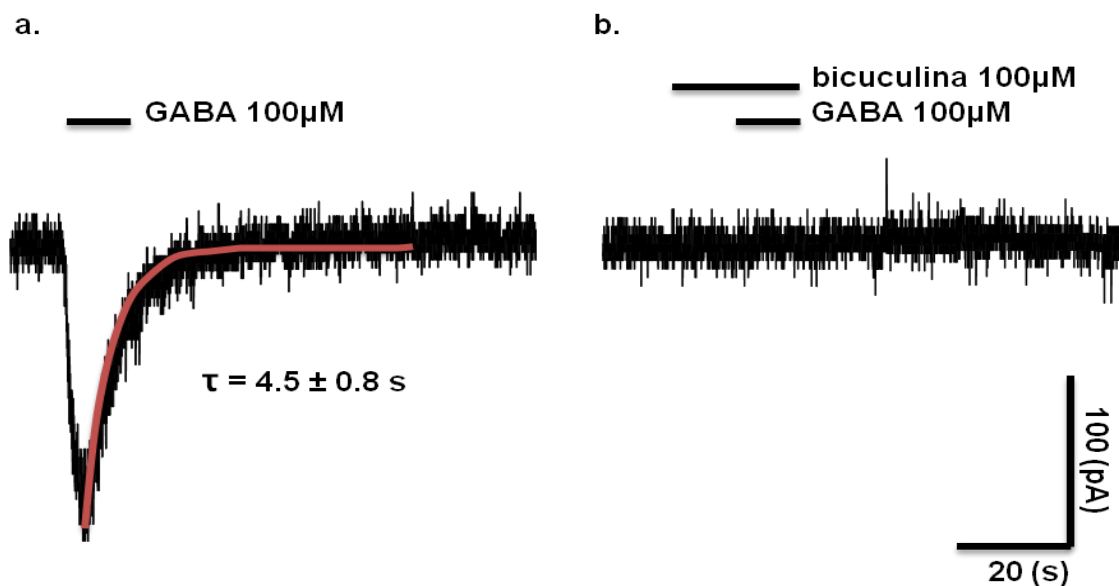


Figura 10. Expresión funcional de los receptores a GABA_A en la línea celular STC-1. a. Corrientes generadas por la aplicación de GABA 100μM y constante de desensibilización (τ). **b.** Bloqueo de las respuestas generadas por GABA 100μM, mediadas por la co-aplicación con bicuculina 100μM.

7.2 Activación del receptor GABA_A

7.2.1 Activación del receptor GABA_A por taurina

La acción agonista de la taurina sobre los receptores GABA_A, evaluó en la línea celular STC-1. La taurina se aplicó a diferentes concentraciones (Figura 11a). A 500μM no se observaron respuestas, a 1mM en el 33.3% (n=6 de un total de N=18 células registradas) se generaron corrientes de -36.0 ± 6.3 pA (max.-55 y min. -15 pA) y una densidad de corriente de 2.17 ± 0.35 pA/pF. Al aumentar la concentración de la taurina (3mM) se observaron corrientes (de amplitud similar (38.33 ± 7.2 pA, máx. -55 y min -35 pA) y una densidad de corriente de 2.24 ± 0.42 pA/pF, pero en un mayor porcentaje de células (50%, n=6 de un total de 12 células registradas) (Fig. 11 c). Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de la taurina a 10mM no fue posible obtener corrientes en ninguna del las células registradas (n=10) (Tabla IV).

Posteriormente para determinar si las corrientes generadas por taurina a 3mM, correspondían a la activación del receptor GABA_A se co-aplicó bicuculina [100μM], la cual bloqueó completamente la respuesta producida por la taurina (Fig. 11 b). En conjunto estos resultados indican que las células STC-1 expresan receptores GABA_A que son sensibles a taurina (o bien receptores GABA_A en donde la taurina funciona como agonista, aunque con una menor afinidad que el GABA).

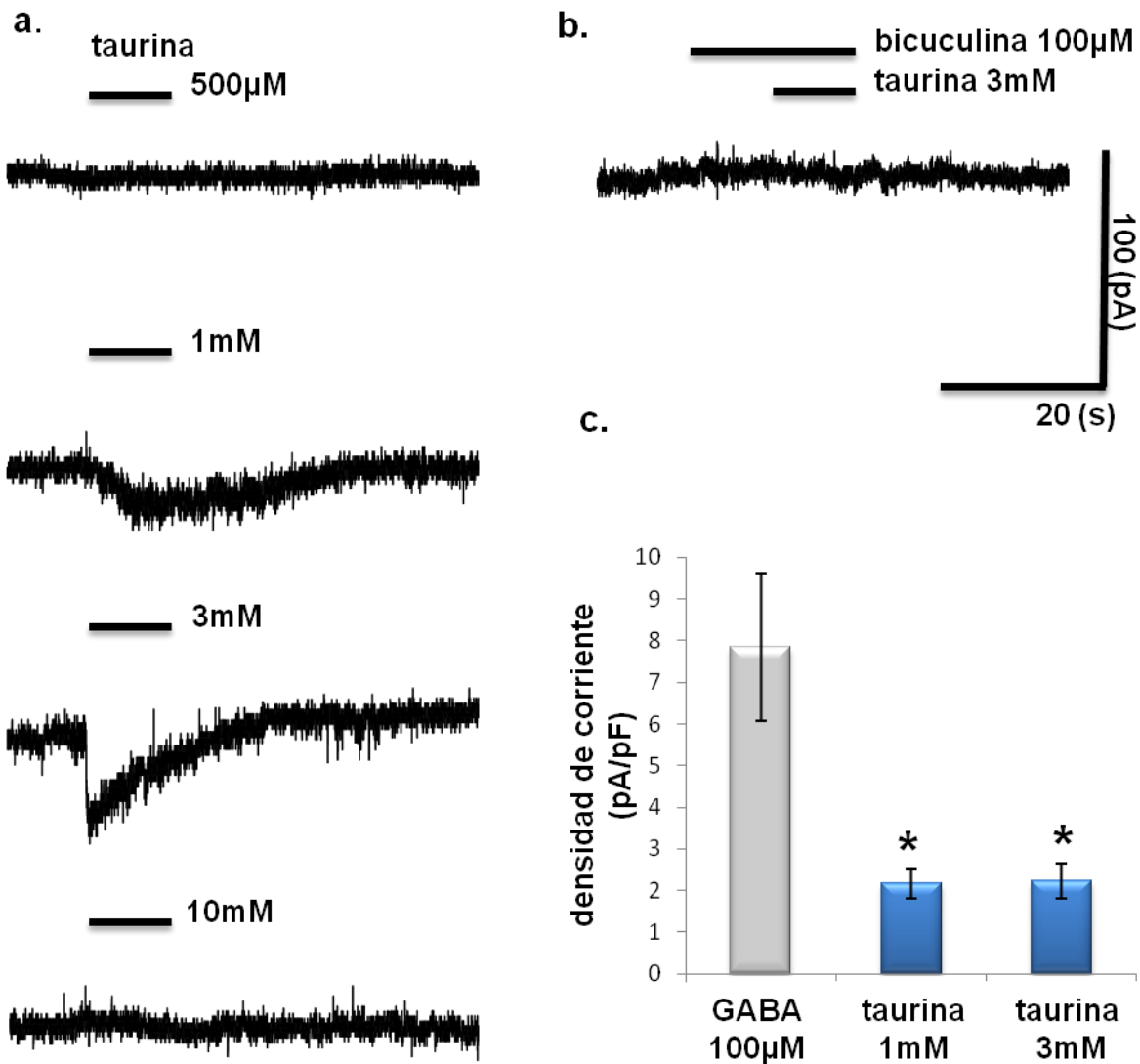


Figura 11. Las corrientes de taurina son bloqueadas por bicuculina. a. Registro de las corrientes generadas por la aplicación de taurina a diferentes concentraciones 500 μM, 1 mM, 3 mM y 10 mM. **b.** Aplicación de Taurina 3 mM en presencia de bicuculina [100 μM]. **c.** Densidad de corriente de las corrientes generadas por la aplicación de GABA 100 μM, taurina 1 y 3 mM. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los fármacos con respecto al control (* P ≤ 0.05).

7.2.2 Activación del receptor GABA_A por hipotaurina

Nuestro siguiente paso fue evaluar si la hipotaurina, análogo estructural de la taurina, funciona también como agonista del receptor GABA_A. La aplicación extracelular de la hipotaurina 1mM no produjo respuestas. Sin embargo al aumentar la concentración a 3mM, se observaron corrientes (n=6) de 196 ± 43.28 pA (máx. -330 y -105 pA) y una densidad de corriente de 10.19 ± 1.29 pA/pF, en el 46% las células registradas (n=6 de N=13). La concentración de 10mM generó corrientes (n=5) de 58 ± 15.37 pA (max.-100 y min. -15 pA) y una densidad 3.29 ± 0.84 pA/pF, en el 87% de las células registradas (n=5 de N=8). Las corrientes presentaron cinéticas heterogéneas y tanto la amplitud como en la densidad de corriente fueron menores en comparación con las generadas por GABA 100 μ M (el resultado de la prueba estadística fue de: P=0.043 y P=0.001 respectivamente) (Figura 12 c). La bicuculina fue preincubada (por 10s) y co-aplicada con la hipotaurina para determinar si las corrientes registradas correspondían a la activación del receptor GABA_A (N=6), lo cual no generó respuesta (Figura 12 b).

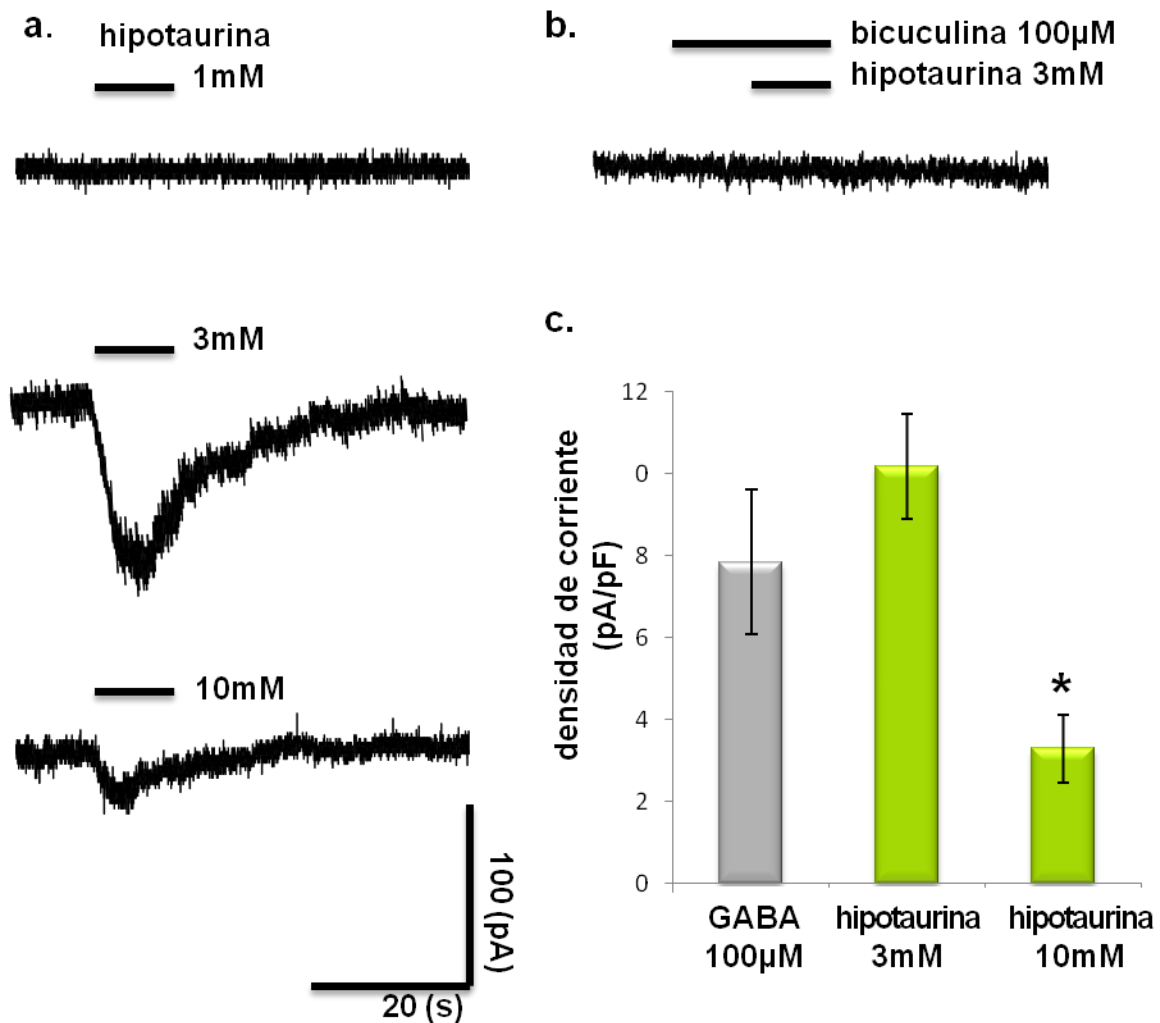


Figura 12. Activación del receptor GABA_A por la aplicación de hipotaurina.

a. Corrientes generadas por la aplicación de hipotaurina a diferentes concentraciones 1mM, 3mM y 10mM. **b.** Aplicación de hipotaurina 3mM en presencia de bicuculina 100µM. **c.** Media y error estándar de la amplitud de las corrientes generadas por la aplicación de GABA 100µM, hipotaurina 3 y 10 mM. El asterisco indica la diferencia significativa entre el fármaco con respecto al control (* P≤ 0.05).

7.2.3 Activación del receptor GABA_A por homotaurina

Al igual que con la hipotaurina, se evaluó si la homotaurina funcionaba como agonista de los receptores GABA_A expresados en las células STC-1. De esta manera se utilizaron diferentes concentraciones de homotaurina: 1, 10 y 30 mM (Figura 13 a, Tabla IV). La homotaurina produjo corrientes sensibles a bicuculina únicamente a la concentración de 30 mM. El promedio de las corrientes registradas con homotaurina 30mM (n=6) fue de 93 ± 12.9 pA (máx.-115 y min -45pA) y una densidad de corriente de 5.8 ± 0.77 pA/pF, en el 85.7% de las células registradas (n=6 de N=7). La amplitud de la corriente no fue significativamente distinta respecto al control ni la densidad de corriente (el resultado de la prueba estadística fue de: $P=0.625$ y $P=0.451$ respectivamente). La aplicación de 30mM de homotaurina en presencia de bicuculina [100μM] no generó respuesta (Fig. 13.b).

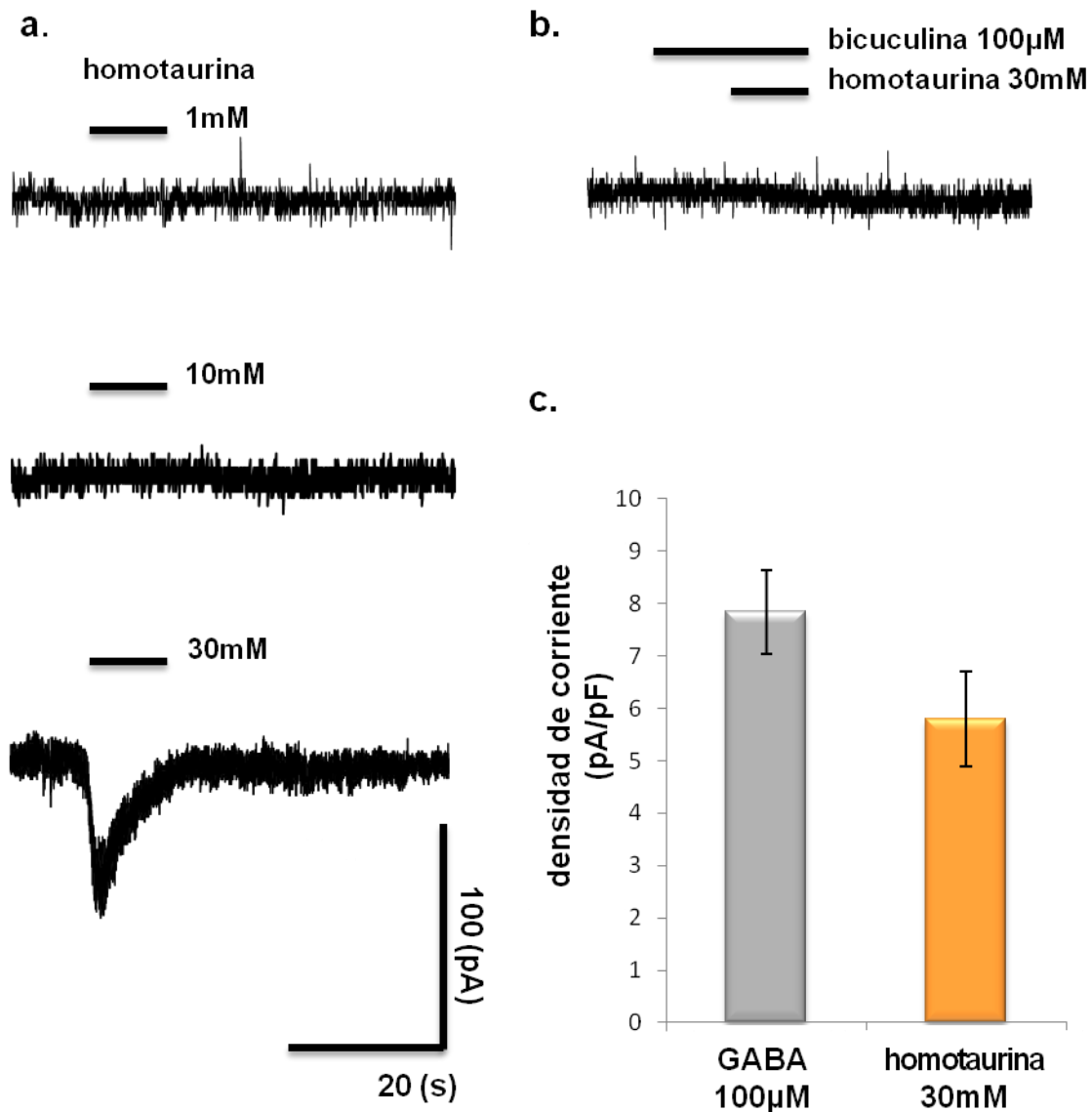


Figura 13 .Respuestas generadas por la aplicación de homotaurina del receptor GABA_A. a. Registro de las corrientes generadas por la aplicación de homotaurina a diferentes concentraciones 1mM, 10mM y 30mM. b. Aplicación de homotaurina a 30mM, en presencia de bicuculina 100µM. c. Media y error estándar de la amplitud de las corrientes generadas por la aplicación de GABA 100µM u homotaurina 30mM.

7.3 Modulación de las respuestas de GABA por taurina y/o sus análogos estructurales

7.3.1 Modulación de las respuestas a GABA por taurina

Los resultados previos de nuestro estudio indicaban que la taurina funciona como agonista de los receptores GABA_A expresados en las células stc-1. Sin embargo, se desconoce si la taurina podría modular la cinética del receptor GABA_A cuando es activado por GABA. Por ello realizamos experimentos de coaplicación GABA 100 μ M mas taurina 1mM.

La co-aplicación de GABA con la taurina (n=9, Tabla IV), no modificó la amplitud de la corriente que se obtuvo al aplicar solo GABA (150 \pm 28 vs. 161 \pm 33.34 pA, máx.-359 y min -57 pA), ni en la densidad de corriente (7.8 \pm 1.7 vs. 8.5 \pm 1.6 pA/pF), el resultado de la prueba estadística fue de: P=0.365 y P=0.530 respectivamente. Sin embargo, la constante de desactivación τ es más lenta en presencia de taurina (35.44 \pm 3.7ms vs. 4.5 \pm 0.8 ms; resultado de la prueba estadística: P<0.001) (Figura 14).

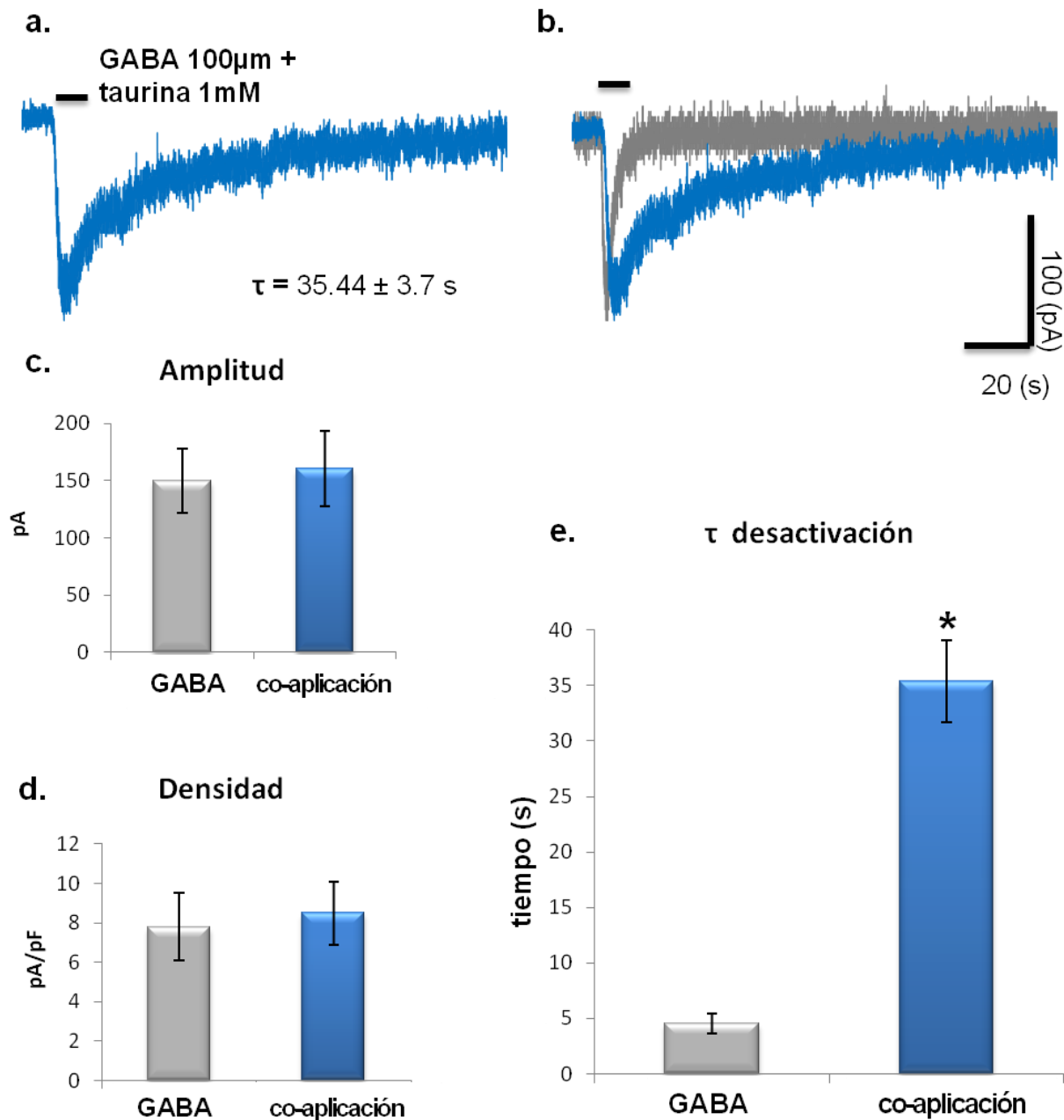


Figura 14. Respuestas a GABA moduladas por taurina. **a.** Respuestas a GABA 100µM mas taurina a 1mM **b.** la aplicación de taurina modifica la respuesta generada por GABA a 100 µM **c.** Amplitud de corriente, **d.** densidad de corriente y **e.** τ de desactivación de ambos grupos. GABA 100 µM , co-aplicación GABA 100µM mas taurina a 1mM . El asterisco indica diferencia significativas entre los fármacos con el control (* P≤ 0.05).

7.3.2. Modulación de las respuestas a GABA por la hipotaurina

La hipoaturina es un metabolito endógeno en el SN (Le-Corronec *et al.*, 2001; Vitvitsky *et al.*, 2011) y al igual que la taurina podría tener un efecto modulador sobre el receptor GABA_A cuando este es activado por GABA (100 μ M). De esta manera se evaluó si la co-aplicación de GABA 100 μ M e hipotaurina 1mM (n=8) (Figura 15), producía corrientes distintas de aquellas en las que solo se aplicaba GABA. Los resultados señalan que no existe diferencia significativa en la amplitud de corriente (98 ± 16.23 pA, máx.-205 y min -60 pA), ni en la densidad de corriente (5.7 ± 0.79 pA/pF) en comparación con el grupo control, que es la respuesta generada por GABA 100 μ M (el resultado de la prueba estadística fue de: P=0.643 y P=0.573 respectivamente). En esta serie de experimentos también se observó que la τ de desactivación aumentó cuando se co-aplicaron hipotaurina y GABA en comparación al control (19.58 ± 3.5 s vs. 4.5 ± 0.8 s, P<0.001) (Figura 15 e.).

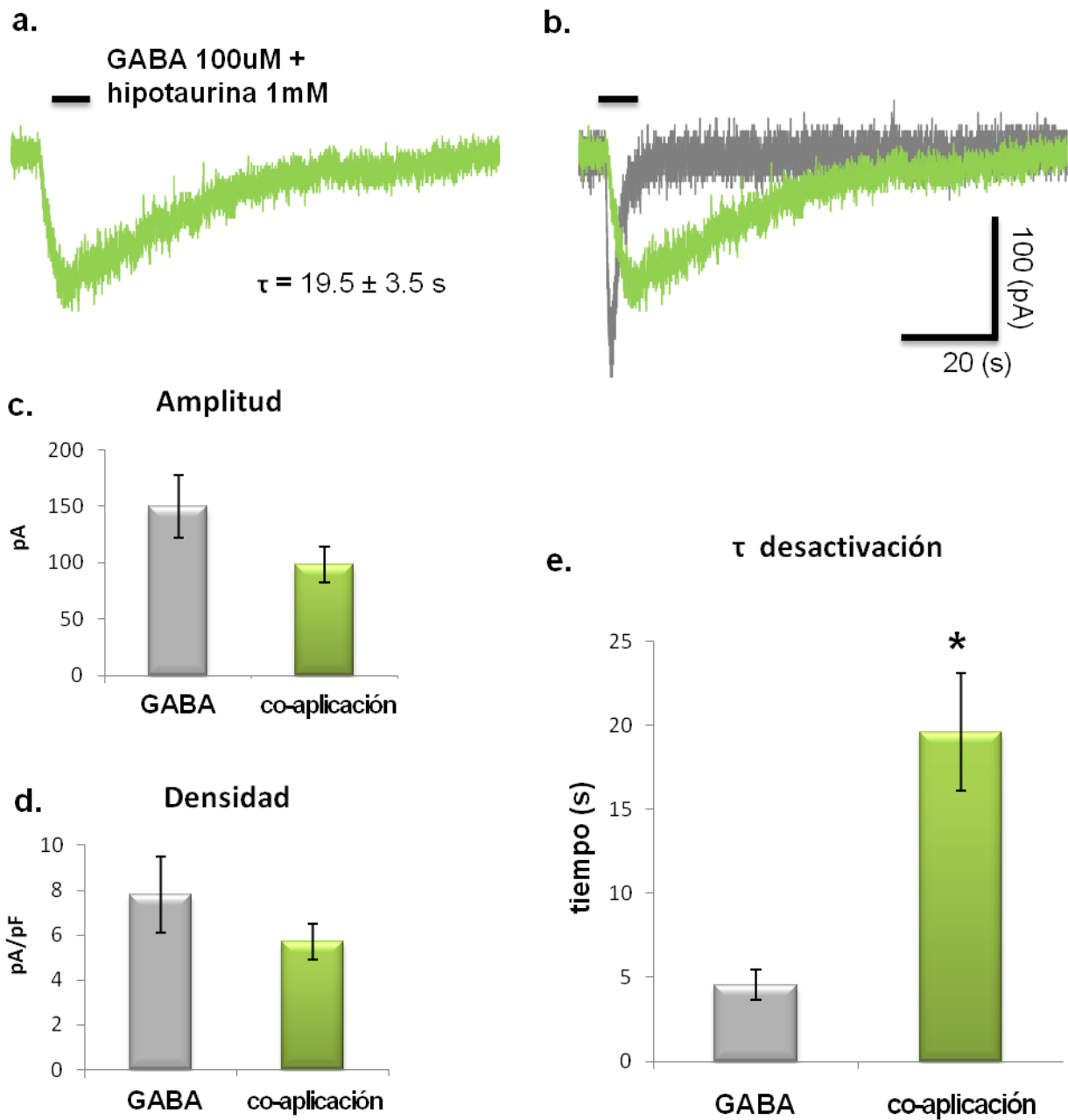


Figura 15. Respuestas a GABA moduladas por hipotaurina. **a.** Respuestas a GABA 100µM mas homotaurina a 1mM, **b.** la aplicación de homotaurina modifica la respuesta generada por GABA a 100 µM **c.** Amplitud de corriente, **d.** densidad de corriente, y **e.** τ de desactivación de ambos grupos. GABA 100 µM , co-aplicación GABA 100µM mas hipotaurina a 1mM . El asterisco indica diferencia significativa entre el fármaco y el control (* $P \leq 0.05$).

7.3.3. Modulación de las respuestas a GABA por la homotaurina

Por último al co-aplicar la homotaurina 1mM con el GABA 100 μ M (n=8) se obtuvo una τ de desactivación mayor que la del GABA (10.79 \pm 2.5 ms vs. 4.5 \pm 0.8 ms, P= 0.018), mientras que no se observaron cambios significativos en la amplitud corriente (129 \pm 45.79pA, máx.-422 y min -45 pA), ni la densidad de corriente son diferentes (6.9 \pm 2.2 pA/pF), el resultado de la prueba estadística fue de: P=0.558 y P=0.456 respectivamente (Figura 16).

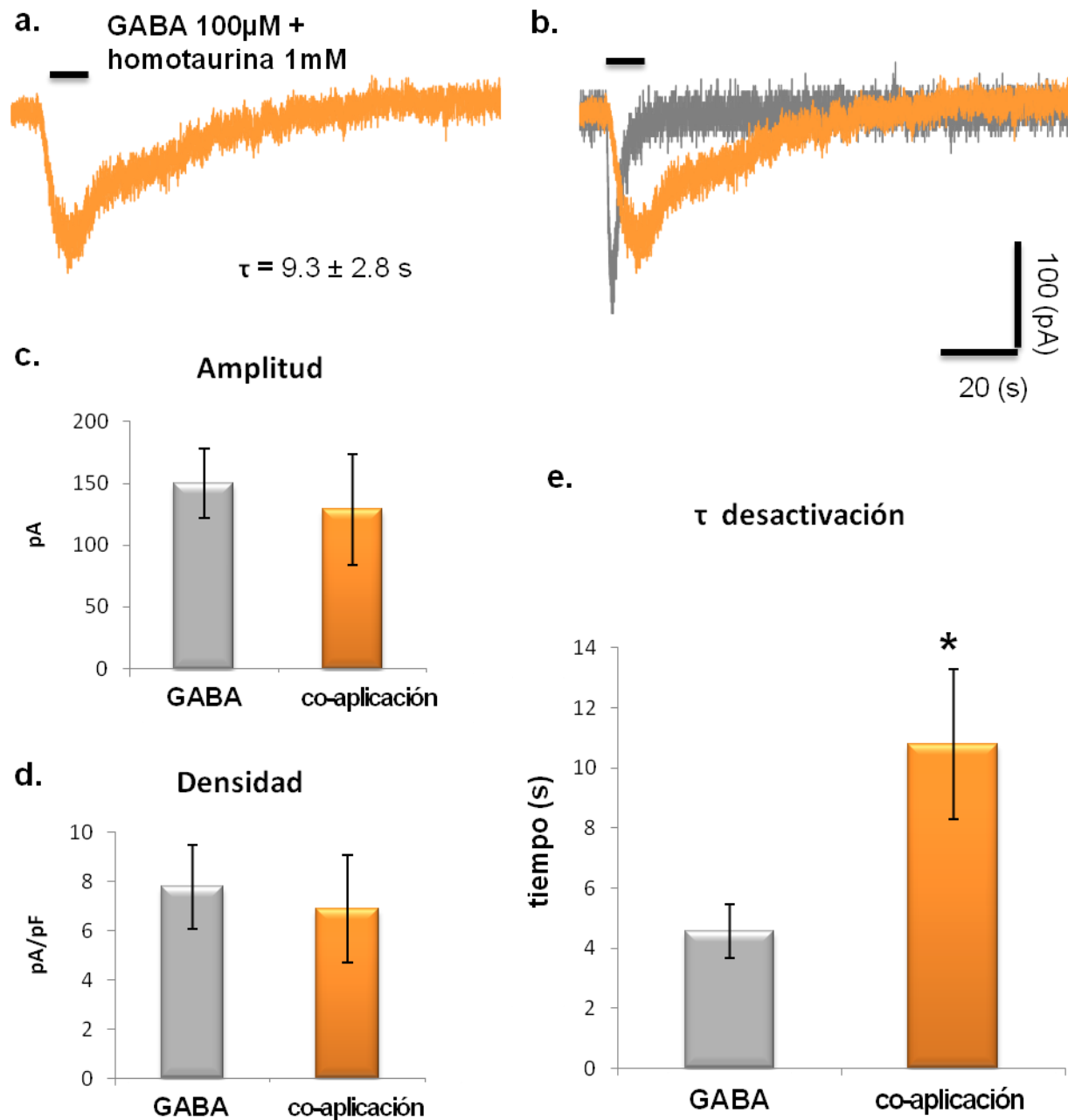


Figura 16. Respuestas a GABA moduladas por homotaurina. a. Respuestas a GABA 100 μ M mas homotaurina a 1mM b. la aplicación de homotaurina modifica la respuesta generada por GABA a 100 μ M c. Amplitud de corriente, d. densidad de corriente y e. τ de desactivación de ambos grupos. GABA 100 μ M \square , co-aplicación GABA 100 μ M mas homotaurina a 1mM \blacksquare . El asterisco indica diferencia significativas entre los fármacos con el control (* P \leq 0.05).

Tabla IV. Resumen de resultados

Fármaco	n	N	% R=	I (pA)		δ (pA/pF)		τ (s)	
GABA									
100 μ M	23	27	85.18	150.19 \pm 28.5		7.84 \pm 1.77		4.5 \pm 0.8	
100 μ M + Bicuculina 100 μ M	0	9	0	—		—		—	
Taurina									
500uM	0	6	0	—		—		—	
1mM	6	18	33.33	*36 \pm 6.3	P=0.001	*2.17 \pm 0.35	P=0.001	*2.0 \pm 0.4	P = 0.043
3mM	6	12	50	*38.33 \pm 7.2	P=0.003	*2.24 \pm 0.42	P=0.002	*1.9 \pm 0.18	P = 0.025
10mM	0	8	0	—		—		—	
3mM + Bicuculina 100uM	0	10	0	—		—		—	
Hipotaurina									
1mM	0	6	0	—		—		—	
3mM	6	13	46.15	196 \pm 43.28	P=0.182	10.19 \pm 1.29	P=0.072	4.0 \pm 0.53	P=0.529
10mM	5	8	87.5	*58 \pm 15.37	P=0.043	*3.29 \pm 0.84	P=0.001	3.5 \pm 0.4	P=0.764
3mM + Bicuculina 100uM	0	6	0	—		—		—	
Homotaurina									
1mM	0	6	0	—		—		—	
10mM	0	6	0	—		—		—	
30mM	6	7	85.7	93 \pm 12.9	P=0.625	5.8 \pm 0.77	P=0.667	4.91 \pm 1.7	P=0.451
30mM + Bicuculina	0	6	0	—		—		—	
Co-aplicación									
GABA 100μM +									
Taurina 1mM	9	10	90	161 \pm 33.34	P=0.365	8.5 \pm 1.6	P=0.530	*35.44 \pm 3.7	P = <0.001
Hipotaurina 1mM	8	8	100	98 \pm 16.23	P=0.643	5.7 \pm 0.79	P=0.573	*19.58 \pm 3.5	P = <0.001
Homotaurina 1mM	8	8	100	129 \pm 45.79	P=0.558	6.9 \pm 2.2	P=0.456	*10.79 \pm 2.5	P = 0.018

n: número de células que respondieron, **N**: número total de células registradas, **%R**: porcentaje de células que respondieron, **I**: amplitud de corriente, **δ** : densidad de corriente, **τ** *tau*; constante de desactivación; **P**: resultado de la prueba estadística. El asterisco indica diferencias significativas entre los fármacos con el control, determinadas mediante la prueba U-Mann-Whitney (* $P \leq 0.05$).

8. Discusión

Los resultados presentados en esta tesis se discutirán en los siguientes apartados:

a) Expresión funcional de los receptores a GABA_A en la línea STC-1

Los datos obtenidos del registro de la línea celular cultivada en el laboratorio mostraron que tras la aplicación de GABA se evocaron respuestas en un mayor porcentaje de células (85.18% vs. el 55%) respecto a lo reportado por Glassmeier y col. 1998, mientras que la amplitud media de la corriente generada fue menor (-150.1 ± 28.5 pA vs. 186 ± 124 pA), indicando cierta heterogeneidad de las células, por lo que solo se incluyó en el análisis de los grupos experimentales las células sensibles a GABA 100 μ M.

Respecto a la estequiometría del receptor GABA_A en esta línea celular aún se desconoce el ensamble de las diferentes subunidades y sería conveniente realizar análisis posteriores. Es posible considerar la hipótesis de que las subunidades GABA ρ formen heteropentámeros con otras subunidades GABA_A en las células STC-1, como se ha mostrado en neuronas del tallo cerebral y en células de Purkinje (Harvey *et al.*, 2006, Milligan *et al.*, 2004). Nuestros resultados mostraron que en presencia del antagonista bicuculina específico para GABA_A la respuesta se bloquea completamente. Mientras que si se encontraran formando homopentámeros posiblemente una fracción de la corriente generada se mantendría durante la aplicación de bicuculina (Rosas-Arellano *et al.*, 2012).

Se ha mostrado que la subunidades GABA ρ co-ensamblan con la subunidad γ_2 (Ekema *et al.*, 2002; Quian y Ripps, 1999; Quian y Pan 2002) y también con la subunidad α_1 (Harvey *et al.*, 2006, Milligan *et al.*, 2004, Pan y Quian, 2005). Sin embargo la línea celular STC-1 no expresa la subunidad α_1 ni γ_2 (Glassmeier *et al.* 1998), pero no se descarta la posibilidad de que las GABA ρ interactúen con otras subunidades de GABA_A en esta línea celular, esto basado en la alta similitud de secuencia que presenta con las subunidades β (Whiting *et al.*, 1999), las cuales en otros modelos interactúan con las subunidades α_2 , α_3 , α_5 , δ (Bencsits *et al.*, 1999; Benke *et al.*, 1994; Fritschy *et al.*, 1992; Fritschy y Möhler, 1995; McKernan *et al.*, 1991; Nusser *et al.*, 1998; Quirk *et al.*, 1994) y

que están presentes en esta línea celular. Además, otra similitud entre las subunidades GABA ρ y β es que *in vitro* ambas forman receptores homoméricos (Moss y Smart, 2001).

b) Efecto de la aplicación de taurina sobre el receptor GABA_A

El receptor GABA_A es uno de los más estudiados de la familia de receptores ionotrópicos activados por ligando, sin embargo, aún se desconocen muchas de sus interacciones a nivel estructural con moléculas como la taurina. En el presente estudio presentamos evidencia de la acción agonista de la taurina sobre los receptores GABA_A en el rango de 1 y 3 mM, en el cual solo fueron sensibles el 33% y el 50% respectivamente de las células STC-1 (tomando como el 100% las células que a su vez eran sensibles a GABA). Aunque la amplitud de las corrientes generadas por la taurina fue menor, las respuestas generadas se inhibieron completamente en presencia de bicuculina, lo que indica que son mediadas por el receptor GABA_A. Estos resultados indican que la taurina funciona como un agonista débil de los receptores GABA_A en las células STC-1, que posiblemente solo active a una población de estos receptores, ya que es sabido que la composición de subunidades que forman al receptor determina sus propiedades farmacológicas, mostrado por medio de la expresión heteróloga de distintas subunidades (Ebert et al., 1994; Minier y Sigel, 2004). Además, es posible que la reducida acción de taurina como un agonista se deba a su baja afinidad con el receptor y su ligera competencia por el sitio de unión, como se mostró en ensayos de radioligando (Dzirkale *et al.*, 2011).

La acción de agonista débil por parte de la taurina sobre los receptores GABA_A expresados en una fracción de células STC-1 es similar a la reportada en las células de Purkinje en donde se encontró que la taurina inhibe la frecuencia de disparo espontánea de estas células pero a niveles muy por debajo de aquellos ejercidos por el GABA (Kd= 0.11mM y de taurina Kd=1mM) (Okamoto y Sakai, 1981). También corresponde con los estudios de Bureau y Olsen (1991), quienes en ensayos de

competencia utilizando extractos de membranas aislados de corteza cerebral estimaron una $EC_{50}=33\mu\text{M}$ para la taurina y una $K_d=1.7\text{ nM}$ (a $100\mu\text{M}$), en contraste con la $EC_{50}=0.5\mu\text{M}$ de GABA y una $K_d=0.5\text{nM}$ (a $10\mu\text{M}$). En este mismo estudio se reportó que la sensibilidad a taurina por los sitios de unión a GABA es mayor en el giro dentado, sustancia nigra, capa molecular del cerebelo, los núcleos del tálamo medio y CA3 del hipocampo.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Ochoa de la Paz y colaboradores, también muestran que la taurina actúa como agonista débil de GABA ρ 1 ($EC_{50}=7\text{mM}$ vs. GABA $EC_{50}=2.3\mu\text{M}$), en el sistema de expresión de ovocitos de *X. laevis*. Posiblemente la aplicación de agonistas específicos de las subunidades GABA ρ como el CACA permitiría conocer si parte de la respuesta generada por la taurina es por la activación de subunidades GABA ρ co-ensambladas con las demás subunidades de GABA $_A$ presentes en esta línea celular. Se ha observado que en receptores heteroméricos que contienen las subunidades GABA ρ la respuesta generada por agonistas específicos como el CACA, se inhibe solo en una fracción al aplicar el antagonista específico TPMPA y solamente se bloquea por completo por la aplicación de bicuculina (Harvey *et al.*, 2006; Milligan *et al.*, 2004).

Es importante considerar que las propiedades fisicoquímicas de la taurina repercuten en sus acciones biológicas. La taurina es un aminoácido perteneciente a la familia de β -aminoácidos y presenta un grupo funcional sulfuro en lugar de un grupo carboxilo. Los grupos sulfúricos son fuertemente ácidos (comparado con los grupos carboxílicos) lo que permite que la taurina sea un zwitterion en el rango de pH fisiológico. Esta naturaleza zwitteriónica de la taurina le provee una alta solubilidad en agua y baja lipoficidad, lo que resulta en alta impermeabilidad en las membranas celulares (Huxtable 1992). Además resultado de su naturaleza zwitteriónica la taurina presenta un alto dipolo y su punto isoeléctrico cae entre el de los aminoácidos carboxílicos como el GABA. Por todo lo anterior se consideró que la taurina interactúa potencialmente con el receptor a GABA, sin embargo nuestros resultados mostraron que la taurina a 3mM solo genera corrientes en el 50% de las células sensibles a GABA, lo que sugiere que solo un porcentaje de la población de los receptores

expresados en esta línea celular son sensibles a la taurina. Pero por otra parte, esta propiedad zwitteriónica también le confiere a la taurina bajo condiciones fisiológicas la propiedad de existir en dos conformaciones estructurales *cis* en un 73% y *trans* en el resto (Huxtable, 1992; Rodríguez *et al.*, 1989), lo que puede ser un factor de la baja actividad de la taurina como agonista, ya que se ha mostrado el efecto opuesto de las distintas conformaciones estructurales sobre los receptores de glicina; la estructura *trans* actúa como un antagonista mientras que la *cis* como un agonista (Schmieden y Betz, 1995).

Considerando la variabilidad estructural de la taurina en este trabajo se utilizaron los análogos estructurales: la hipotaurina y la homotaurina que presentan conformación estructural estable a pH fisiológico, para evaluar si estos pudiesen unirse y activar a receptores GABA_A con mayor eficiencia.

c) Efecto de la aplicación de hipotaurina sobre el receptor GABA_A

Los resultados indican que el 46% de las células registradas fueron sensibles a hipotaurina a una concentración de 3mM generando una corriente de amplitud similar a la del control, sin embargo que esto ocurra solo en dicho porcentaje de las células podría indicar que se tiene una expresión de los receptores heterogénea, que le provee de características electrofisiológicas distintas la cual puede depender de la composición de subunidades que conforman al receptor (Hevers y Luddens 1998). De manera inesperada, las respuestas generadas por una concentración de 10mM fueron de menor amplitud y con una densidad de corriente tres veces menor aunque el porcentaje de las células sensibles aumento al 87%. Estos resultados difieren a los señalados por Ochoa de la Paz (en proceso) en ovocitos de *Xenopus* inyectados con GABA_{ρ1}, en los cuales la amplitud de corriente aumentó de manera dosis dependiente, sin ser mayor a la del control (Figura 8 c.). También estos resultados muestran que la hipotaurina no se comporta como un antagonista de los receptores GABA_A como se ha observado en otras moléculas que poseen una posición *trans* (Schmieden y Betz, 1995).

d) Efecto de la aplicación de homotaurina sobre el receptor GABA_A

La aplicación de homotaurina solo generó respuestas a la concentración de 30mM, misma que fue bloqueada por la bicuculina, resultados que concuerdan con los datos observados previamente en el laboratorio (Ochoa de la Paz, en proceso) donde se mostró que la homotaurina es agonista del receptor GABA_A1. También nuestros resultados concuerdan con los reportados por Schmieden y Betz (1995), donde la conformación *cis* podría proporcionarle la propiedad de agonista sobre el receptor a glicina. Sin embargo estas observaciones contrastan con los observados por Okamoto y Sakai 1981, quienes reportaron que en las neuronas de Purkinje la homotaurina es 500 veces más potente que el GABA para inhibir potenciales de acción espontáneos.

e) Modulación del receptor GABA_A por la taurina y sus análogos estructurales

Por otra parte se evaluó la modulación de las respuestas a GABA por la taurina y sus análogos estructurales. Los resultados indican que ni la amplitud ni la densidad de corriente se modificaron respecto a las respuestas registradas con la aplicación de GABA. Al respecto se ha mostrado que la taurina, al ocupar el mismo sitio de unión del agonista en el receptor de glicina, modifica la amplitud de corriente por un efecto de cooperatividad positiva o negativa entre la glicina y la taurina (Han et al., 2004). Por lo que en las células STC-1 los resultados pueden sugerir que estas moléculas no compiten por el sitio de unión a GABA, aunque se requieren realizar ensayos de competencia entre GABA y estas tres moléculas a diferentes concentraciones para confirmar lo anteriormente expuesto.

La co-aplicación de taurina, hipotaurina y homotaurina sí modificó la constante de desactivación τ de las corrientes generadas por GABA. En presencia de taurina se incrementó casi 7 veces comparada con el control. Una posible explicación de este comportamiento es que el cambio en la cinética de la corriente observada corresponde a la activación de receptores que en su conformación posean subunidades GABA_A por

la taurina, dado que estos no se desensibilizan en presencia del agonista a diferencia de los receptores GABA_A que presentan una cinética de desactivación rápida (Polenzani *et al.*, 1991).

La co-aplicación de hipotaurina y GABA también mostró diferencia significativa en la cinética de inactivación, la cual fue casi 4 veces mayor que la del control; de manera similar la homotaurina también aumentó al doble la constante de inactivación respecto a GABA.

Este último hallazgo sobre la modulación de las respuestas generadas por GABA en presencia de taurina y sus análogos estructurales sugiere que estos fármacos podrían funcionar como moduladores del receptor GABA_A. Una posibilidad de cómo se lleva a cabo la modulación de las respuestas generadas por GABA es que la taurina y sus análogos estructurales pueden actuar sobre sitios de unión alostéricos del receptor GABA_A (Hevers y Lüddens, 1998) o bien taurina podría unirse al sitio de unión a GABA como se ha mostrado recientemente en modelos de acoplamiento del receptor GABA_A con taurina y diferentes análogos estructurales (Estrada-Móndragon *et al.*, en proceso). Se sugiere que la modulación del receptor GABA_A por estas moléculas, ocurre una vez que el receptor se encuentra en su estado abierto activado por su agonista, otras moléculas se unen al receptor retrasando su regreso a el estado de conformación cerrado, como se ha observado con otros moduladores de GABA_A (Goutman *et al.*, 2005, Olsen y Snowman, 1982), y concuerdan con diversos estudios donde se ha observado que taurina presenta propiedades como anti-convulsionante o como modulador de la excitabilidad neuronal (Chapman y Hart, 1988; Durelli y Mutani 1983; Frederickson 1978; Hass y Hosli 1973; Hirai 1980; Huxtable 1981; Kaczmarek 1976).

9. Conclusiones

En el presente trabajo se encontró que los receptores GABA_A son sensibles a taurina, homotaurina e hipotaurina.

- La aplicación de taurina a la concentración de 3mM generó respuestas en el 50% de las células registradas
- La aplicación de hipotaurina a la concentración de 3mM generó respuestas en el 46% de las células registradas.
- La aplicación homotaurina a la concentración de 30mM generó respuestas en el 85% de las células registradas
- Las respuestas fueron bloqueadas presencia de bicuculina en el 100% en cada uno de los fármacos.

La respuesta generada por GABA es modulada por los tres fármacos a la concentración de 1mM:

- En presencia de taurina la τ de desactivación aumentó más de 7 veces.
- En presencia de hipotaurina la τ de desactivación aumentó más de 4 veces
- En presencia de homotaurina la τ de desactivación aumentó más de 2 veces

Con base en estos resultados concluimos que la taurina y sus análogos estructurales generan respuestas en una población de células STC-1 y modulan la τ de desactivación de las respuestas producidas por GABA.

10. Referencias

- Barakat L, Wang D, Bordey A. 2002. Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *J. Physiol.* 541(3), 753–767.
- Barnard, EA. 2001. The molecular architecture of GABA_A receptor. En H. Mohler (Ed.), *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission*. Berlin: Springer-Verlag.
- Benke D, Mertens S, Trzeciak A, Gillessen D, Mohler H.1991. GABA_A receptors display association of gamma 2-subunit with alpha 1- and beta 2/3-subunits. *J. Biol. Chem.* Mar 5;266(7):4478-83.
- Bencsits E, Ebert V, Tretter V, Sieghart W .1999. A significant part of native γ -aminobutyric acid_A receptors containing α 4 subunits do not contain γ or δ subunits. *J. Biol. Chem.* 274:19613-19616.
- Bormann J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21(1),16-19.
- Bormann J y Kettenmann H. 1988. Patch-clamp study of γ -aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Neurobiol.* 85: 9336-9340
- Bowery B, Bettler B ,Froestl W, Gallagher J, Marshall F, Raiteri M, Bonner T, Enna S. 2002. International Union of Pharmacology XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric Acid_B Receptors: Structure and Function. *Pharmacol. Rev.* 54, 247-264.
- Brand A, Leibfritz D, Hamprecht, Dringen R. 1998. Metabolism of Cysteine in Astroglial Cells: Synthesis of Hypotaurine and Taurine. *J. Neurochem.* 71, 827-832.
- Bulley S, Shen W. 2010. Reciprocal regulation between taurine and glutamate response via Ca²⁺-dependent pathways in retinal third-order neurons. *J. Biomed. Sci.* 17(Suppl 1), S5.
- Bureau M, Olsen R. 1991. Taurine acts on a subclass of GABA A receptors in mammalian brain in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 207, 9-16.
- Chapman AG, Hart GP. 1988. Anticonvulsant drug action and regional neurotransmitter amino acid changes. *J Neural Transm.*; 72(3), 201-212.

- Choe K, Olson J, Bourque CW. 2012. Taurine Release by Astrocytes Modulates Osmosensitive Glycine Receptor Tone and Excitability in the Adult Supraoptic Nucleus. *J Neuroscience*. 32 (36):12518 –12527.
- Decavel C, Hatton GI. 1995. Taurine immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: prominent localization in glial cells. *J. Comp. Neurol*. 354,13–26.
- Durell I, L,Mutani R.1983. The current status of taurine in epilepsy. *Clin. Neuropharmacol*. 6, 37-48.
- Dzirkale Z, Pupurea J, Rumaksa J, Svirskisa S, Vaninaa M, Mezhapukeb R, Sileb V, Fernandesc MA, Dubursb G y Klusaa V. 2011. Comparative study of taurine and tauropyrone: GABA receptor binding, mitochondrial processes and behaviour. *J Phar Pharmacol*. 63: 230–237
- Ebert B, Wafford KA, Whiting PJ, Krosggaard-Larsen P, Kemp JA. 1994. Molecular pharmacology of gamma-aminobutyric acid type A receptor agonists and partial agonists in oocytes injected with different alpha, beta, and gamma receptor subunit combinations.*Mol Pharmacol*. 46(5), 957-63.
- Ekema GM, Zheng W y Lu L. 2002. Interaction of GABA receptor/channel rho1 and gamma2 subunit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43:2326-2333.
- Erdö SL, Wolff JR. 1990. Gamma-Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem*. 54(2), 363-372.
- Fenalti G, Law R, Buckle A, Langendorf C, Tuck K, Rosado C, Faux N, Mahmood K, Hampe C, Banga J, Wilce M, Schmidberger J, Rossjohn J, El-Kabbani O, Pike R, Smith A, Mackay I, Rowley M, Whisstock JC. 2007. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 14(4), 280-286.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR. 1998. Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20: 43–53, 1998
- Frederickson, RC, Neuss M, S. L. Morzorati, McBride. 1978. A comparison of the inhibitory effects of taurine and GABA on identified Purkinje cells and other neurons in the cerebellar cortex of the rat. *Brain Res*. 145, 117-126.
- Fritschy JM, Benke D, Mertens S, Oertel WH, Bachi T, Mohler H. 1992. Five subtypes of type A γ -aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and

- triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6726-6730.
- Fritschy JM, Johnson DK, Mohler H, Rudolph U. 1998. Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett*. 1998. 249(2-3):99-102.
 - Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*. 14;359(1):154-94.
 - Gilbert P, Kettenmann H, Schachner M. 1984. Gamma-Aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *J Neurosci*. 4(2):561-569
 - Glassmeier G, Strübing C, Riecken EO, Buhr H, Neuhaus P, Ahnert-Hilger G, Wiedenmann B, Scherübl H. 1997. Electrophysiological Properties of Human Carcinoid Cells of the Gut. *Gastroenterology* 113, 90-100.
 - Glassmeier G, Herzig KH, Hpfner M, Lemmer K, Jansen A, Scherubl H. 1998. Expression of functional GABAA receptors in cholecystokinin secreting gut neuroendocrine murine STC-1 cells. *J. Physiol*. 510(3), 805-814.
 - Goutman et al., 2005. Analysis of macroscopic ionic currents mediated by GABA rho1 receptors during lanthanide modulation predicts novel states controlling channel gating. *Br J Pharmacol*. 146(7): 1000–1009.
 - Haas HL, L. Hosli. 1973. The depression of brain stem neurons by taurine and its interaction with strychnine and bicuculine. *Brai Res*. 52, 399-402.
 - Han NL, Clements JD, Lynch JW. 2004. Comparison of taurine and glycine induced conformational changes in the M2-M3 domain of the glycine receptor. *J Biol Chem*. 7;279(19):19559-65.
 - Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*. 391, 85—100.
 - Harvey V, Duguid I, Krasel C, Stephens G. 2006. Evidence that GABA subunits contribute to functional ionotropic GABA ρ receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 577.1:127–139.

-
- Hevers W y Lüddens H. 1998. The Diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and Electrophysiological. Properties of GABA_A Channel Subtypes. *Mol Neurobiol.* 18; 35-86.
 - Hevers W y Lüddens H. 2002. Pharmacological heterogeneity of γ -aminobutyric acid receptors during development suggests distinct classes of rat cerebellar granule cells in situ. *Neuropharmacol* (42) 34–47.
 - Hirai, K. 1980. Studies of functional roles of taurine in the myocardium, effect of taurine on cardiac metabolism of calcium. *J. Kyoto Sch. Med. Sci.* 89, 51-62.
 - Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F. 1997. Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 502:609–621.
 - Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 72(1):101-63.
 - Jansen A, Hoepfner M, Herzig H, Riecken E, Scherübl H. 2000. GABA_C receptors in neuroendocrine gut cells: a new GABA-binding site in the gut. *J Physiol.* 441, 294-300.
 - Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu C, Kopke R, Wu J. 2003. Demonstration of functional coupling between γ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(7), 4293-4298.
 - Kaczmarek LK. 1976 A comparison of the evidence for taurine and GABA as neurotransmitters. En: *Taurine*, edited by R. J. Huxtable, A. Barbeau. New York: Raven, p. 283-292
 - Kandel E, Schwartz J, Jessell T. 2000. *Principles of Neural Science.* USA: McGraw-Hill.
 - Kandel E y Siegelbaum S. 2000. Synaptic Integration. En: Kandel E, Schwartz J, Jessell T (Ed), *Principles of Neural Science.* (pp 208-219). USA: McGraw-Hill.
 - Kanner B. 1994. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J. Exp. Biol.* 196, 237-49.
 - Kettenmann H, Backus KH, Schachner M. 1984. Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci Lett.* 23;52(1-2):25-29.
 - Koester J y Siegelbaum S. 2000. Membrane Potential. En: Kandel E, Schwartz J, Jessell T (Ed), *Principles of Neural Science.* (pp 126-140). USA: McGraw-Hill.

-
- Kontro P, Oja S. 1990. Interactions of taurine with GABAB binding sites in mouse brain. *Neuropharmacol.* 29(3), 243-247.
 - Kopanitsa MV, Yakubovska LM, Rudenko OP, Krishtal OA. 2002. Modulation of GABAA receptor-mediated currents by benzophenone derivatives in isolated rat Purkinje neurones. *Neuropharmacol.* 43;764–777.
 - Krantis A, Nichols K y Staines W. 1998. Neurochemical characterization and distribution of enteric GABAergic neurons and nerve fibres in the human colon. *J. Auton Nerv Syst.* 68, 33–42.
 - Lee S, Yoon B, Berglund K, Oh S, Park H, Shin H, Augustine G, Lee J. 2010. Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science.* 330, 790-796
 - Le-Corronc H, Rigo JM, Branchereau P, Legendre P. 2011. GABA_A Receptor and Glycine Receptor Activation by Paracrine/Autocrine Release of Endogenous Agonists: More Than a Simple Communication Pathway. *Mol Neurobiol.* 44, 28–52.
 - Levi G y Gallo V. 1995. Release of neuroactive amino acid from glia. En H. Kettenmann, R.B. Ransom (Eds.), *Neuroglia.* (pp. 815–826), New York: Oxford University Press.
 - Lewis TM, Schofield PR, and McClellan AM. 2003. Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *J Physiol.* 549: 361–374.
 - Liddle RA. 1997. Cholecystokinin cells. *Anu. Rev. Physiol.* 59, 221-242.
 - Lombardini J.B. 1991, Taurine: retinal function, *Brain Res. Rev.* 16,151-169.
 - Lynch JW. 2004. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiol Rev.* 84: 1051–1095.
 - Machuca-Parra AI, Miledi R, Martínez-Torres A. 2012. Identification of the minimal promoter for specific expression of the GABA_A1 receptor in retinal bipolar cells. *J Neurochem.* Accepted Article.
 - Madsen S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1987. Immunocytochemical demonstration of taurine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 217,275–284.
 - Magnusson KR, Clements JR, Wu JY, Beitz AJ. 1989. Colocalization of taurine- and cysteine sulfinic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Synapse.* 4,55–69.

-
- McKernan RM, Whiting PJ. 1996. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends Neuro. Sci.* 19(4), 139-143.
 - McKernan RM, Quirk K, Prince R, Cox PA, Gillard NP, Ragan CI, Whiting P. 1991. GABA_A receptor subtypes immunopurified from rat brain with α subunit-specific antibodies have unique pharmacological properties. *Neuron* 7, 667-676.
 - Minier F, Sigel E. 2004. Positioning of the alpha-subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci.* 101(20):7769-74.
 - Militante JD, Lombardini JB. 2002. Taurine: evidence of physiological function in the retina. *Nutr. Neurosci.* 5(2),75-90.
 - Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA. 2004. Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA_A and GABAC receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci.* 24(33):7241-7250.
 - Mori M, Gahwiler BH, Gerber U. 2002. Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 539: 191–200.
 - Moss SJ, Smart TG. 2001. Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2:240–250.
 - Müller T, Fritschy J, Grosche J, Pratt G, Mohler H, Kettenmann H. 1994. Developmental Regulation of Voltage-gated K⁺ Channel and GABA Receptor Expression in Bergmann Glial Cells. *J Neurosci.* 14(5), 2503-2514.
 - Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. 1998. Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18,1693-1703.
 - Ochoa-de la Paz L, Martínez-Dávila I, Miledi R, Martínez-Torres A. 2008. Modulation of human GABA_A1 receptors by taurine. *Neurosci. Res.* 61, 302-308.
 - Oja S, Kontro P. 1989. Release of taurine and GABA from cerebellar slices from developing and adult mice. *Neurosci.* 29 (2), 413-23.
 - Oja S, Saransaari P. 2000. Modulation of taurine release by glutamate receptors and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* 62, 407-425.
 - Oja S, Saransaari. 2007. Pharmacology of Taurine. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 50, 8-15.

-
- Okamoto K, Sakai Y. 1981. Inhibitory actions of taurocyamine, hypotaurine, homotaurine, taurine and gaba on spike discharges of purkinje cells, and localization of sensitive sites, in guinea pig cerebellar slices. *Brain Res.* 206, 371-386.
 - Olsen R, Betz H. 2006. GABA and Glycine. En: Siegel G (Ed.), *Basic Neurochemistry, Molecular, cellular and Medical Aspects.* (pp 291-302). USA: Academic Press.
 - Olsen R, Sieghart W. 2008. International Union of Pharmacology, LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. *Farmacol. Rev.* 60, 243-260.
 - Olsen R y Snowman AM. 1982. Chloride-dependent enhancement by barbiturates of gamma-aminobutyric acid receptor binding. *J Neurosci.* 2, 1812-1823.
 - Ottersen O. 1988. Quantitative assessment of taurine-like immunoreactivity in different cell types and processes in rat cerebellum: an electronmicroscopic study based on a postembedding immunogold labelling procedure. *Anat. Embryol.* 178(5), 407-421.
 - Palkovits M, Elekes I, Ling T, Patthy A. 1986. Taurine Levels in Discrete Brain Nuclei of Rats. *J. Neurochem.* 47 (5), 1333-1335.
 - Pan Y y Qian H. 2005. Interactions between ρ and $\gamma 2$ subunits of the GABA receptor. *J. Neurochem.* 94:482–490.
 - Pasantés-Morales H. 1986. Current concepts on the role of taurine in the retina. En: Osborne N. (Ed.) *Progress in Retinal. Research.* Oxford, UK: Pergamon. (pp. (5), 207-230).
 - Pasantés-Morales H, Moran J, Schousboe A. 1990. Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia.* 3, 427–432.
 - Pasantés-Morales H, Quesada O, Morán J. 1998. Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 442, 209-217.
 - Pasantés-Morales H, Hernández-Benitez R. 2010. Taurine and Brain Development: Trophic or Cytoprotective Actions?. *Neurochem. Res.* 35, 1939–1943.
 - Perea G., Navarrete M., Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neuroscience* 32(8), 421-431.

- Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl. Acad. Sci.* 88(10), 4318-4322.
- Poulter MO, Sigal R, Brown LA, Krantis A. 1999. GABA_A receptor subunit messenger RNA expression in the enteric nervous system of the rat: implications for functional diversity of enteric GABA_A receptors. *Neuroscience.* 93(3), 1159-1165.
- Privat A, Gimenez-Ribotta M, Ridet JL. 1995. Morphology of astrocytes. En: Kettenmann H y Ransom B (Ed). *Neuroglia.* (pp 3-22)
- Quian H y Pan Y. 2002. Co-assembly of GABA_p subunits with the GABA_A receptor γ_2 subunit cloned from white perch retina. *Molecular Brain Research* 103:62–70
- Quian, H., and Ripps, H. 1999. Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA ρ and γ_2 subunits. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 266:2419–2425.
- Quirk K, Gillard NP, Ragan CI, Whiting PJ, McKernan RM. 1994. Model of subunit composition of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes expressed in rat cerebellum with respect to their α and γ/δ subunits. *J Biol. Chem.* 269:16020-16028.
- Rae C, Nasrallah A, Griffin J, Balcart V. 2009. Now I know my ABC. A systems neurochemistry and functional metabolomic approach to understanding the GABAergic system. *J Neurochem.* 109(1), 109-116.
- Rodríguez A, Ciuffo G, Estrada M, Jauregui E. 1989. Estudio Conformacional, utilizando un Potencial Atomo-Atomo Empírico, de Análogos de Taurina. *Acta Farm. Bonaerense.* 8(3), 147-156.
- Rodríguez-Navarro JA, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, González-Viguera JM, Solís JM. 2009. High potassium induces taurine release by osmosensitive and osmoresistant mechanisms in the rat hippocampus in vivo. *J Neurosci. Res.* 87,208-217.
- Rosas-Arellano A, Machuca-Parra AI, Reyes-Haro D, Miledi R, Martínez-Torres A. 2012. Expression of GABA_p receptors in the neostriatum: localization in a spiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells. *J Neurochem.* 122(5):900-910.
- Shimizu M, Satsu H. 2000. Physiological significance of taurine and the taurine transporter in intestinal epithelial cells. *Amino Acids.* 19, 605-614.

-
- Sinkkonen 2004. Imaging and properties of extrasynaptic GABA_A receptors in the brain. University Printing House. Helsinki.
 - Sieghart W. 2006. Structure, Pharmacology, and Function of GABA_A Receptor Subtypes. *Advances in Pharmacology*. 54, 231-263.
 - Sigel E, Stephenson FA, Mamalaki C y Barnard EA. 1983. A γ -aminobutyric acid-benzodiazodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 258, 6965-6971.
 - Schmieden V y Betz H. 1995. Pharmacology of the inhibitory glycine receptor: agonist and antagonist action of amino acids and piperidine carboxylic acid compounds. *Mol Pharmacol.* 48, 919–927.
 - Somogyi P, Fritschy JM, Benke D, Roberts JDB, Sieghart W . 1996. The γ 2 subunit of the GABA_A receptor is concentrated in synaptic junctions containing the β 1 and α 2/3 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus. *Neuropharmacol.* 35, 1425-1444.
 - Sturman J. 1988. Taurine in development. *J. Nutrition.* 118(10), 1169-1176.
 - Sturman J. 1993. Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73,119-147.
 - Tamai I, Senmaru M, Terasaki T y Tsuji A. 1995. Na⁺ and Cl⁻ dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem. Pharmacol.* 50(11),1783-1793.
 - Tiedje K, Stevens K, Barnes S y Weaver D. 2010. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem. Int.* 57 (3),177-188.
 - Verkhratsky A y Butt A. 2008. *Glial Neurobiology*. England: John Wiley & Sons Ltd.
 - Vitvitsky V, Garg S, Banerjee R. 2011. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* 286 (37), 32002-32010.
 - Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, WaffordKA. 1999. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann NY Acad Sci* 868:645–653.
 - Wright C, Tallan H, Lin Y, Gaull G. 1986. Taurine: biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 55,427-453.
 - Zerbst-Boroffka. 1970. Organische Saurereste als wichtigste Anionen im Blut von *Hirudo medicinalis*. *Z. Vergl. Physiol.* 70:313-321.

11. LISTA DE TABLAS

Tabla I. Principales subtipos de conformaciones del receptor GABA_A en el cerebro

Tabla II. Receptores a GABA y su caracterización farmacológica.

Tabla III. Expresión de diversas subunidades del receptor GABA_A en la línea celular STC-1

Tabla IV. Resultados

12. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido γ -aminobutírico (GABA)

Figura 2. Sistema GABAérgico

Figura 3. Modelo de la estructura del receptor GABA_A

Figura 4. Estructura química de taurina (ácido 2-aminoetano-sulfónico)

Figura 5. Síntesis de taurina

Figura 6. Actividad inhibitoria de la taurina

Figura 7. Activación de los receptores GABA_A por la taurina en la Glía de Bergmann

Figura 8. Activación y modulación del receptor GABA_A1 por la taurina, la hipotaurina y la homotaurina

Figura 9. Estructura química de los análogos estructurales de taurina.

Figura 10. Expresión funcional de los receptores a GABA_A en la línea celular STC-1

Figura 11. Las corrientes de taurina son bloqueadas por bicuculina

Figura 12. Respuestas generadas por la aplicación de hipotaurina del receptor GABA_A

Figura 13. Respuestas generadas por la aplicación de homotaurina del receptor GABA_A

Figura 14. Respuestas a GABA moduladas por taurina

Figura 15. Respuestas a GABA moduladas por hipotaurina

Figura 16. Respuestas a GABA moduladas por homotaurina