

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular

EFECTO ESTABILIZADOR DE LA TAURINA
EN LOS FOTORRECEPTORES

TESIS
que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica)

Presenta

CARLOS CRUZ FUENTES

México D.F., Mayo de 1985



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.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes-Morales a quien agradezco profundamente por su confianza y decidido apoyo que siempre me brindó, así como por el interés mostrado durante mi formación profesional.

INGENIERO ALFONSO MIRELES HERNANDEZ
Jefe de la Unidad de Registro e Información
Consejo de Estudios de Posgrado
Ciudad Universitaria.
P r e s e n t e.

000736

Me es muy grato informar a usted que el alumno CARLOS S. CRUZ FUENTES presentará próximamente su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica) ante el siguiente jurado.

Presidente.
1er. vocal.
Secretario.
Suplente.
Suplente.

DR. RICARDO TAPIA IBARGUENGOITIA
DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ
DR. J. ADOLFO GARCIA-SAINZ
DRA. PATRICIA JOSEPH-BRAVO
DRA. GRACIELA MEZA RUIZ

Muy atentamente,
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria D.F., 19 de abril de 1985.

EL DIRECTOR

DOCTOR JAVIER PASTILLA OLIVARES

C.e.p. Coordinador del Area, Dr. Victor Manuel Loyola V.
Jefe de la Coordinación Escolar, Ing. Rebeca Sandoval
Integrantes del Jurado.
Expediente.

INDICE

Resumen

I. Introducción

Generalidades	1
La Taurina en la retina	5
Efectos de la Taurina en la retina	11

II. Publicaciones

Efecto protector de la Taurina y el zinc sobre el daño peroxidativo inducido en los segmentos externos de los fotorreceptores.

La Taurina y la Hipotaurina inhiben la peroxidación lipídica inducida por la luz y protegen la estructura de los segmentos externos de los bastones.

III. Discusión

32

IV. Bibliografía

42

Resumen

La taurina constituye el aminoácido libre presente en mayor concentración en la retina de diversas especies, incluyendo al hombre y se le localiza preferentemente a nivel de la capa de los fotorreceptores. Asimismo la taurina ejerce una serie de efectos fisiológicos y farmacológicos muy diversos en este tejido neural. Estos hechos en conjunto apoyan la idea de que el aminoácido ejerce un papel fisiológico importante en la retina, el cual sin embargo aún se desconoce.

La retina de los vertebrados es uno de los tejidos que regulan de manera más eficiente sus concentraciones internas del aminoácido. Sin embargo se ha descrito que si por medio de la manipulación experimental se produce la deflección de los niveles endógenos de taurina en la retina de diversas especies como el gato o la rata, esta se ve acompañada por la disminución progresiva de la capacidad visual, la cual se origina como consecuencia directa de la destrucción de los diferentes componentes celulares de la retina, particularmente de los fotorreceptores, lo cual susiere fuertemente que el aminoácido participa en el mantenimiento de la estructura y función de las células visuales.

En el presente estudio se analizó el efecto que ejercía la taurina en el mantenimiento de la estructura celular, utilizando para ello una preparación de segmentos externos aislados de los fotorreceptores de la rana mantenidos bajo diversas condiciones experimentales que promueven la degeneración celular tanto in vivo, como in vitro y cuyo mecanismo de

acción parece estar relacionado con la peroxidación de los lípidos de las membranas.

Se discuten algunos posibles mecanismos que podrían estar involucrados en el efecto estabilizador que muestra la taurina sobre la estructura y función de los fotorreceptores (regulación de la permeabilidad iónica, interacción directa con proteínas de membrana, acción antioxidativa)

Abstract

Taurine is the most abundant amino acid in the retina of several species, including man, being preferentially concentrated in the photoreceptor layer. In this tissue taurine produces several pharmacological and physiological effects, and this suggest that the amino acid exerts a very important role in the retina, which is still unknown.

The vertebrate retina has specific mechanism who exerts a very efficient control of the amino acid internal levels. However it has been described that experimental depletion of taurine in cat and rat retina is accompanied by a progresive decrease of the visual capacity, originated as a direct consequence of the disturbance of cellular components of the retina. All this evidence suggest a critical role played by taurine in preserving photoreceptor structure and retinal function.

In this work we described a protective effect of taurine in the maintenance of cellular structure, using an isolated frog rod outer segment preparation exposed to some experimental conditions that are known to cause retinal injury in vivo as in vitro and whose action mechanism is related with peroxidation of membrane lipids.

Some possible mechanism are discussed that could be involved in the protective effect of taurine (control of ionic fluxes, direct interaction

with membrane proteins, antioxidative action, etc..)

Introducción

La taurina, el ácido 2-aminoetano sulfónico, es un aminoácido azufrado presente en la mayoría de los tejidos de todas las especies animales hasta ahora estudiadas (Jacobsen y Smith 1968).

La taurina recibe ese singular nombre por el hecho de que fue descrita y aislada por vez primera en 1827 en la bilis del toro (Tiedeman y Gmelin 1827), en donde se encuentra conjugada con los ácidos biliares. Desde entonces y hasta la fecha ha sido reportada su presencia en los tejidos de diversos phyla, tanto de invertebrados como de vertebrados, hasta llegar ahora a establecerse como uno de los aminoácidos más interesantes y ubicuitos. El aminoácido se encuentra esencialmente ausente en las plantas, aun cuando se ha reportado la presencia de pequeñas cantidades del compuesto en algunas formas de plantas inferiores.

No se ha reportado que la taurina forme parte de la estructura primaria de las proteínas, ni de ninguna otra macromolécula, aún cuando se ha detectado la existencia de di o tri péptidos, como la gama glutamil taurina, en homogenizados de cerebro de ciertas especies como la rata o el ratón (Oja y Kontro 1983). Asimismo, la taurina no parece estar involucrada en reacciones metabólicas, a excepción de su conjugación en el hígado con el ácido cólico para formar el ácido taurocólico.

Por mucho tiempo se consideró a la taurina como un compuesto inerte, producto terminal del metabolismo de los aminoácidos azufrados, pero ahora

es cada vez mas evidente que ejerce un papel regulatorio y funcional en la mayoria de los sistemas y órganos en donde se le ha descrito.

El aminoácido se encuentra particularmente concentrado en los tejidos excitables, tales como el corazón, el músculo tanto liso como esquelético, el sistema nervioso y las glándulas de secreción interna en los cuales alcanza niveles que fluctuan entre 10-40 mM (Jacobsen y Smith).

La concentración de taurina en un tejido o fluido específico varia ampliamente, sin embargo dependiendo de la especie y de su estadio de desarrollo puede alcanzar concentraciones que superan por mucho la de otros aminoácidos libres.

A pesar de su amplia distribución y de sus altas concentraciones, no se le ha adscrito un papel fisiológico para la taurina en los tejidos animales. Sin embargo, se ha observado que el aminoácido ejerce una serie de efectos farmacológicos y fisiológicos, los cuales incluyen la interacción con flujos iónicos (Gruener y Bryant 1975; Pasantes-Morales y cols. 1982), la disminución de la excitabilidad nerviosa, acciones anticonvulsivantes y antiarrítmicas (Welty y Read 1964; Van Gelder 1973; Izumi y cols. 1973; Trusby y Nevis 1974), efectos termorreguladores (Sgarasli y Pavan 1972; Hruska y cols. 1973), así como acciones referentes a la regulación por la insulina del metabolismo de la glucosa (Tokunaga y cols. 1983; Kulakowski y Maturó 1984). En los invertebrados marinos la taurina parece estar relacionada con los procesos de osmoregulación, que permiten a las especies eurihalinas soportar los cambios en la salinidad

del medio, actuando en conjunto con otros aminoácidos como efector osmótico (Vislie 1983). Por otra parte desde el punto de vista nutricional, se ha enfatizado un papel importante para la taurina en los sistemas biológicos, por el hecho de que se le ha identificado como un nutriente esencial para al menos una especie -el gato- y aparentemente puede ser un factor limitante durante el crecimiento y desarrollo de otras especies incluyendo al hombre (Gessel y cols. 1982, Sturman y cols. 1983).

La biosíntesis de taurina en la mayoría de los tejidos animales, se lleva a cabo a partir de precursores endógenos, a través de varios procesos enzimáticos asociados con el metabolismo de los aminoácidos azufrados, los cuales involucran la oxidación enzimática y la conversión de la cisteína obtenida directamente de la dieta o a través de la conversión de la metionina (Jacobsen y Smith 1968, Awapara 1976). No obstante que pueden existir vías sintéticas alternativas, se ha llegado a la conclusión general de que la principal ruta biosintética para la taurina en la mayoría de los tejidos animales de los mamíferos, es la que involucra la oxidación de la cisteína para formar el ácido cisteín sulfínico, reacción catalizada por la cisteín deoxigenasa (L-cisteín oxígeno oxido reductasa E.C. 1.13.11.20.). El ácido cisteín sulfínico se descarboxila por medio de la acción de una enzima dependiente del fosfato de piridoxal, la cisteín sulfinato descarboxilasa (L-cisteín sulfinato carboxi-liasa E.C. 4.1.1.29.), dando origen a la hipotaurina (ácido 2-amino etano sulfínico), la cual es oxidada para formar a la taurina. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación es incierto, existen reportes que sugieren que la reacción se lleva a cabo sin la participación de una enzima determinada, en tanto que

otros sugieren la existencia de una hipotaurin deshidrogenasa, capaz de llevar a cabo la catálisis oxidativa (Sumizu 1962). La enzima limitante en esta ruta metabólica parece ser la descarboxilasa del ácido cisteín sulfínico (CSD). Los intermediarios, así como las enzimas que constituyen esta vía metabólica han sido detectados en la mayor parte de los tejidos, a excepción del músculo esquelético y el corazón.

La capacidad biosintética varía considerablemente dentro de los diferentes tejidos de un mismo animal. Así, observamos que en la rata, el hígado y el riñón se encuentran entre los órganos más activos en cuanto a la síntesis de taurina, el cerebro posee una actividad moderada mientras que el corazón, músculo estriado y los linfocitos poseen una capacidad limitada para sintetizar el aminoácido. Asimismo existen variaciones significativas dependiendo de la especie y del estadio de desarrollo en que estas se encuentren. Así por ejemplo, vemos que en el hígado del perro y de la rata adultos se encuentran altas concentraciones de todas las enzimas requeridas para la biosíntesis, mientras que en hígado del mono, el gato y el humano existe una actividad muy limitada de la CSD, restringiendo así la biosíntesis de taurina en estas especies. La capacidad biosintética en el hígado y cerebro de los animales jóvenes es comparativamente menor a la existente en estos mismos tejidos en los adultos, lo cual parece indicar que los individuos jóvenes dependen más del aporte de taurina en la dieta para mantener los niveles tisulares adecuados del aminoácido (Hayes y Sturman 1981).

En cuanto al catabolismo de la taurina, los únicos compuestos que han

sido considerados como posibles productos de degradación son el sulfato inorgánico y el ácido isetiónico (Jacobsen y Smith 1968). Sin embargo estudios recientes parecen demostrar que las pequeñas cantidades de estos compuestos reportados como derivados de la taurina en el animal intacto, son producto del metabolismo bacteriano. Esto sin embargo no significa que la taurina es utilizada por los tejidos de manera lenta, ya que por ejemplo en órganos parenquimales como el hígado, el riñón o el páncreas se observa un intercambio rápido del compuesto marcado, lo cual ha permitido calcular la vida media de la poza de este aminoácido que en estos tejidos es menor a un día; otros tejidos como el corazón, el músculo esquelético o el cerebro en tanto recambian el compuesto de manera mas lenta, siendo la vida media en estos tejidos de 3 días aproximadamente (Spaeth y Schneider 1974).

La taurina en la retina.

La retina de los vertebrados es uno de los tejidos que junto con el corazón, el cerebro y las glándulas secretorias contienen las concentraciones mas elevadas de taurina de todos los tejidos animales, constituyendo por consiguiente el aminoácido libre presente en mayor concentración en este tejido. El rango de concentración del aminoácido en la retina fluctua, dependiendo de la especie, entre 10-40 mM (Pasantés-Morales y cols. 1972). Estas altas concentraciones de taurina en la retina se presentan a pesar de las diferencias entre las especies y de las diferencias en el contenido del aminoácido en otros tejidos del mismo animal; así es notorio que aun en especies como el conejo, el gato y el cobayo, los cuales poseen niveles reducidos del aminoácido en la mayoría

de sus tejidos, la concentración de taurina en la retina sea muy alta y similar a la que presentan otras especies que son notables por sus elevados niveles tisulares del compuesto.

A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos como el cerebro, las concentraciones de taurina en la retina aumentan a partir del nacimiento de las crías (Pásantes-Morales 1973, Macaione y cols. 1974, Sturman 1979), siendo que el curso temporal de este incremento parece corresponder al evento de la formación de los fotorreceptores, lo cual sugiere que el aumento corresponde a la taurina acumulada en estas células.

Los organismos poseen mecanismos muy eficientes de regulación de sus niveles tisulares de taurina, los cuales son rígidamente mantenidos a través de modificaciones en sus tasas de biosíntesis y de excreción (Hope 1957, Sturman 1973). La retina es dentro de todos los tejidos el más resistente a disminuir sus reservas endógenas, ya que posee un sistema de control tal que mantiene inalterados sus niveles internos del aminoácido, aún bajo condiciones fisiológicas en la que otros tejidos han sido casi o totalmente depletados, lo cual parece enfatizar la importancia que tiene el aminoácido en la función retiniana.

La retina posee una estructura altamente organizada, en la cual los diferentes tipos celulares, así como sus conexiones se encuentran dispuestos en estratos o capas altamente definidos. Esta citoarquitectura característica de la retina ha permitido determinar con relativa certeza, la distribución de los constituyentes en las diferentes capas celulares y

aún en sitios subcelulares específicos como son los segmentos externos e internos de los fotorreceptores, las terminales nerviosas o bien los sitios de conexión sináptica.

La distribución intraretiniana de la taurina sigue un patrón típico entre las diferentes especies hasta ahora estudiadas, siendo en las capas externas de la retina, como son la capa de fotorreceptores, la capa plexiforme externa y el epitelio pigmentario en donde el aminoácido se tiende a concentrar de manera mas abundante. Asimismo la relación existente entre las capas externas e internas, es muy similar entre las diferentes especies estudiadas, a pesar de existir diferencias considerables en el contenido total entre ellas (Orr 1976).

Mediante la utilización de técnicas de microdissección se ha podido observar que del 60 al 70% de la cantidad total de taurina en la retina se encuentra localizada en la capa de los fotorreceptores (Yates y Keen 1974, Kennedy y Voaden 1974, Orr 1976, Schmidt 1981). Resultados similares han sido obtenidos de estudios que comparan la concentración de taurina en la retina antes y después de la destrucción de los fotorreceptores, ya sea ocasionada por distrofias hereditarias o por medio de la manipulación experimental. Así se ha mostrado, que en las retinas de las ratas de la cepa RCS (Royal College of Surgeons), en las cuales las células fotorreceptoras degeneran 2 o 3 semanas después del nacimiento, los niveles de taurina son de alrededor de un 75% menores que los de las ratas que tienen sus fotorreceptores normalmente desarrollados (Schmidt 1981). De manera similar la concentración del aminoácido en ratones de la cepa rd

(retinal degeneration) que presentan una distrofia hereditaria de las células visuales, es menor que en la retina de los animales normales (Cohen y cols, 1973). Los estudios llevados a cabo con compuestos que destruyen selectivamente ciertas capas celulares de la retina han puesto de manifiesto la localización preferencial de la taurina en los fotorreceptores; así los niveles de taurina en la retina disminuyen luego de que los animales son inyectados intraocularmente con iodoacetato el cual produce la destrucción de los fotorreceptores, mientras que no se observa cambio alguno en los niveles endógenos del compuesto en las retinas de los animales tratados con ácido kainico o con glutamato monosódico, en las cuales las capas internas de la retina desaparecen, mientras que las células visuales permanecen íntegras (Karsen y Fonnum 1976, Salceda 1979, Pasantes-Morales y cols. 1981).

La retina parece poseer la capacidad de sintetizar al menos una fracción significativa de la taurina localizada en ese tejido, ya que por una parte se han podido detectar las actividades de todas las enzimas involucradas en la biosíntesis del aminoácido en diversas especies (Pasantes-Morales 1976, Macsione y cols. 1976,1977), así como se ha reportado en homogenados de retina de rana, la conversión de cisteína marcada a taurina y los otros metabolitos relacionados con la ruta sintética antes mencionada (Nishimura y cols. 1983). Sin embargo, la localización de las enzimas parece estar confinada a las capas internas de la retina (Macsione y cols. 1976, Mathur y cols. 1976, Lin y cols. 1983) y particularmente para el caso de la enzima clave del metabolismo biosintético, la CSD, los estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos han

mostrado que esta no se encuentra presente en la capa de los fotorreceptores (Mathur y cols. 1976, Lin y cols. 1983), lo cual resulta aparentemente paradójico dado que en estas células se encuentra más del 50% del contenido total de taurina en la retina (Orr 1976), lo cual indica que la poza de taurina en las células visuales se forma a partir de fuentes diferentes a la de la síntesis endógena. Presumiblemente una cantidad considerable de la taurina presente en la retina es obtenida a partir del plasma, por intermedio del epitelio pigmentario a través de un mecanismo de transporte activo. Estudios autorradiográficos han mostrado que la captura de taurina marcada en las retinas aisladas, ocurre primordialmente en la capa de los fotorreceptores tanto de la rata como del pollo, la rana, el ratón y el sapo *Xenopus* (Lake y cols. 1977, Voaden y cols. 1981, Frederick 1982), además de que se ha reportado que en microsecciones de retina un elevado porcentaje de la marca radioactiva se acumula en aquellas porciones que contienen a la capa de los fotorreceptores (Kennedy y Voaden 1974, Schmidt 1981). Asimismo se han descrito sistemas de transporte de alta afinidad, dependientes de sodio y energía para el aminoácido presentes en las retinas de muy diversas especies, los cuales son capaces de concentrar a la taurina en contra de un muy elevado gradiente de concentración (Starr 1973, Dawson y Neal 1984) y que al parecer son muy específicos puesto que solo son inhibidos por compuestos que presentan una estructura molecular muy similar a la de la taurina, como son la β alanina, la hipotaurina y la taurociamina o guanidinoetanosulfonato (GES) (Quesada, Huxtable y Pasantes-Morales 1984). Estos sistemas de captura no parecen estar confinados a todas las capas celulares. Estudios llevados a cabo con retinas degeneradas experimentalmente demuestran que se localizan

preferencialmente en las capas externas de la retina (Schmidt 1981, Salceda y Pasantes-Morales 1982).

Efectos de la taurina en la retina

La taurina produce un marcado efecto inhibitorio sobre la respuesta electrofisiológica de la retina. Así, cuando se añade al medio de perfusión en retinas aisladas (Pasantes-Morales 1972), o cuando se le inyecta intraocularmente in vivo (Pasantes-Morales 1973), el aminoácido reduce significativamente la amplitud de la onda "b" del electroretinograma, la cual es originada en las capas internas de la retina, sin modificar el registro de la onda denominada "a" correspondiente a la hiperpolarización de los fotorreceptores. Asimismo la taurina produce la hiperpolarización de las células ganglionares y bipolares de la retina de la salamandra *Necturus* (Cunningham y Miller 1980). Estos efectos de la taurina sobre la respuesta de la retina sugieren un posible papel como neurotransmisor inhibitorio en este tejido (Mandel y cols. 1976). Sin embargo todas estas acciones de la taurina son bloqueadas por la estriquina, un antagonista de la glicina en el sistema nervioso central (Bonaventura y cols. 1976), lo cual sugiere que estos efectos pudieran ser debidos a que la glicina y la taurina en virtud de su similitud molecular actuaran sobre un mismo tipo de receptor.

La taurina se libera de retinas aisladas perfundidas en presencia de un estímulo depolarizante, como lo es una alta concentración de potasio, o por acción de la ouabaina, la veratridina y ciertos ionóforos de sodio y calcio (Salceda y Pasantes-Morales 1975, Kennedy y Voaden 1976, Lopez-Colome y cols. 1978). Sin embargo en estudios llevados a cabo en fracciones sinápticas obtenidas de la retina del pollo se ha mostrado,

que los agentes depolarizantes no estimulan la liberación del aminoácido de las terminales nerviosas aisladas, en tanto que si tienen efecto sobre la salida estimulada de otros aminoácidos neuroactivos como el GABA y la glicina (Pasantes-Morales y Lopez-Colome 1978), lo cual indica que su liberación no se lleva a cabo de las terminales nerviosas.

La caracterización de posibles receptores postsinápticos para la taurina en la retina han resultado infructuosos (Lopez-Colome y Pasantes-Morales 1980), lo cual se debe en parte a la ausencia de compuestos agonistas o antagonistas específicos de la acción de la taurina.

Estos resultados en conjunto, aunados al hecho de que los sitios de mayor concentración de la taurina se encuentran localizados en las regiones externas en tanto que los efectos electrofisiológicos parecen ocurrir en la retina interna, sugieren que el aminoácido no desempeña un papel como neurotransmisor inhibitorio en la retina, por lo cual deben de existir funciones alternativas para este aminoácido, en particular en la capa de los fotorreceptores en donde esta preferentemente concentrada.

Se ha mostrado que los niveles de taurina varían dependiendo de las condiciones de luz imperantes. En la retina del pollo el contenido de taurina aumenta cuando los animales son mantenidos bajo total oscuridad durante una semana (Pasantes-Morales y cols. 1973). Asimismo el transporte de taurina en las células de la retina parece ser afectado por las condiciones de iluminación (Frederick y cols. 1982, Dawson y Neal 1984). La influencia de la luz sobre el tamaño de las pozas retinianas de

taurina puede estar relacionada directamente con el efecto estimulador que ésta ejerce sobre la liberación del aminoácido en la retina de diversas especies, como en el pollo, la rata y el conejo (Pasantes-Morales 1973, Schmidt 1978, Kennedy y Neal 1978). Este efecto parece ser específico para la taurina, ya que cuando se realizaron experimentos en paralelo con otros aminoácidos posibles neurotransmisores en la retina, como el GABA y la glicina, estos no respondieron al estímulo luminoso en tanto que si fue observada la salida lenta característica de la taurina. El movimiento del aminoácido en respuesta a la luz en la retina del pollo no se observa en presencia en el medio de perfusión de EGTA un conocido quelante de calcio, sin embargo agentes como el rojo de rutenio o el verapamil que se conoce bloquean la entrada de calcio a las células, no modifican la liberación del aminoácido bajo estas condiciones, a diferencia de lo que ocurre cuando en vez de la luz se utiliza como estímulo liberador una condición depolarizante como lo es una alta concentración de potasio en el medio. (Lopez-Colome y cols. 1976). Un estudio reciente mostró que en esta misma preparación la liberación de la taurina estimulada por la luz no se ve afectada cuando se utilizan bloqueadores específicos de los receptores de la mayoría de los compuestos propuestos como candidatos a neurotransmisores en la retina, como son la acetilcolina, el GABA, el ácido glutámico y las catecolaminas (Datos no publicados), lo cual parece indicar que la liberación de taurina no esta mediada a traves de relevos sinápticos, como ocurre para el caso de otros transmisores como la dopamina o la acetilcolina (Morsán y Kemp 1980, Cunningham y Neal 1983).

Aún cuando no se conoce con certeza el tipo celular del cual se libera

la taurina en respuesta a la estimulación luminosa, es muy probable que se origine de las capas celulares externas, específicamente de la capa de los fotorreceptores. La evidencia experimental más fuerte que se tiene proviene de estudios que muestran que en las retinas de pollo degeneradas selectivamente con el ácido kaínico la liberación del aminoácido sigue el mismo curso temporal que en las retinas de los animales controles, lo cual indica que esta liberación se origina de aquellas células no afectadas por el agente citotóxico, entre ellas los fotorreceptores (Pasantés-Morales y cols. 1981). Asimismo se ha reportado que en los segmentos externos aislados de los fotorreceptores (ROS) de la rana, incubados previamente con taurina radioactiva, es posible producir la salida de la taurina marcada en respuesta a una serie de pulsos luminicos, aun cuando con un curso temporal diferente al descrito para la retina completa (Salceda y cols. 1977).

Los estudios acerca del efecto de la deficiencia en taurina en algunas especies han probado ser un excelente modelo para estudiar el papel que desempeña la taurina en la función de la retina. La gran mayoría de las especies de mamíferos mantienen constantes sus niveles de taurina como resultado tanto de la capacidad biosintética que poseen, como de la ingesta diaria que del aminoácido realizan a través de la dieta, siendo variable la proporción derivada de cada una de estas vías (Huxtable y Lippincot 1982). El gato es sin embargo una especie característica que tiene una capacidad muy limitada para sintetizar a la taurina a partir de metionina o de cisteína como precursores, por lo que dependen exclusivamente de la dieta y en la cual la suplementación de taurina exógena ha mostrado ser esencial para mantener las concentraciones normales del aminoácido de sus tejidos y

órganos (Sturman y cols. 1978).

Así cuando a los gatos se les alimenta con una dieta libre del aminoácido y con caseína purificada como única fuente proteica, se ha observado se desarrolla una disminución gradual de la taurina en la mayoría de los tejidos, a los pocos meses de iniciado este tratamiento (Sturman y cols. 1978). No obstante que como se menciona anteriormente la retina es uno de los tejidos que más se resisten a disminuir sus niveles endógenos del aminoácido, estos llegan inevitablemente a ser depletados en el término de 3 a 5 meses; como consecuencia de este tratamiento los gatos, tanto las crías como los adultos desarrollan en un estadio temprano, aproximadamente cuando los niveles de taurina han disminuido en un 20 a un 25%, una lesión visible a través del oftalmoscopio como una pequeña área blanca hiperreflexiva y granular en el centro del tapetum lucidum. Concomitantemente se observa que el campo total del electroretinograma (ERG) se encuentra reducido considerablemente y en algunos casos ya no es posible detectarlo, lo cual indica que la anomalía retiniana se extiende más allá de la lesión visible (Hayes y cols. 1975, Berson y cols. 1976, Schmidt y cols. 1976, 1977). A medida que la concentración de taurina disminuye por debajo de un 50% se observa no solamente el aumento en el tamaño de la lesión del fondo ocular, sino también la desintegración estructural de los fotorreceptores, así como la disminución en el contenido total de DNA total de la retina (Hayes y cols. 1975).

Ultraestructuralmente los cambios en la morfología de los fotorreceptores se manifiestan inicialmente en los segmentos externos, los

cuales se ven vesiculados, desorientados y con sus membranas tanto externa como de los discos totalmente desintegradas. Esta degeneración se extiende posteriormente a los segmentos internos, la región nuclear de los fotorreceptores y a otras áreas de la retina como el tapetum lucidum, en donde se observa la desorganización en el arreglo reticular de los bastones, así como la fragmentación de las membranas que rodean a estas células produciéndose la compresión y el anostamiento de esta capa en las áreas adyacentes a la zona de degeneración de los fotorreceptores (Wen y cols. 1979).

Estudios posteriores han mostrado que paralelamente a la degeneración de la capa del tapetum lucidum se produce una disminución en el contenido de taurina y de zinc, que normalmente están asociados a las membranas que rodean a las células coroidales, tanto en los gatos deficientes en el aminoácido, como en cierta raza de perros que presentan una anomalía hereditaria en esta capa celular (Sturman y cols. 1982). Se observa asimismo, que si el tratamiento es suspendido antes de un tiempo crítico en un estadio en el cual la mayoría de los núcleos y los segmentos internos de los fotorreceptores se encuentran presentes y se suplementa nuevamente a la dieta con taurina, se produce la reversión total de los efectos degenerativos y funcionales antes mencionados, lo cual no es posible observar cuando se substituye a la taurina con otros aminoácidos precursores, como la metionina o la cisteina (Hayes y cols. 1975), lo cual reafirma el papel vital que desempeña la taurina en el mantenimiento de la estructura de los fotorreceptores.

La estrategia experimental utilizada para disminuir los niveles de taurina en los tejidos y órganos del gato, no tienen efecto en otras especies como la rata que son capaces de sintetizar eficientemente el aminoácido y que bajo las condiciones de privación del compuesto en la dieta son capaces de aumentar su tasa biosintética y de disminuir su excreción en la orina y heces, para de esta manera mantener constantes los niveles tisulares de taurina. No obstante, ha sido posible reproducir la deficiencia de taurina en la retina de las ratas, mediante la utilización de compuestos que como el GES, o la B alanina, producen el bloqueo de los sistemas de transporte de taurina de diversos tejidos tanto in vivo como in vitro (Huxtable 1979, Schaffer y Kocsis 1981). Así se ha descrito que la administración del GES en el agua de beber produce en las ratas una rápida depleción de los niveles de taurina en la retina, la cual es de alrededor de un 60% del nivel basal a los 9 días y llegando a disminuir hasta en un 40% después de ser administrado el compuesto sistemáticamente durante 3 semanas. Bajo estas condiciones no se observan alteraciones en los niveles de otros aminoácidos. La disminución del aminoácido se ve acompañada por la disminución progresiva del ERG (Lake 1982) y por la degeneración de los fotorreceptores (Pasantés-Morales y cols. 1983), siendo idéntico el patrón degenerativo observado al que se presenta en los gatos alimentados con una dieta deficiente en taurina. Estos resultados parecen sugerir que cualquier estrategia experimental que conlleve a una disminución de los niveles de taurina en la retina, tendrá como resultado la desestabilización de la estructura de los fotorreceptores. No obstante es necesario llevar a cabo más estudios en otras especies diferentes al gato o la rata para poder generalizar el requerimiento de taurina que de ellas muestran, es evidente

que el aminoácido juega un papel crítico en el mantenimiento de la estructura y función de los fotorreceptores. Con el objeto de conocer el o los posibles mecanismos moleculares bajo los cuales esta sustentada la acción protectora de la taurina en la retina llevamos a cabo, estudios tendientes a observar el efecto que ejercía la taurina sobre la estabilidad membranal de las células visuales, utilizando para ello una preparación de segmentos externos aislados de los fotorreceptores de la rana mantenidos bajo diversas condiciones experimentales de degeneración celular.

Protective Effect of Taurine and Zinc on Peroxidation-Induced Damage in Photoreceptor Outer Segments

H. Pasantes-Morales and C. Cruz

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México

Exposure of isolated frog rod outer segments (ROS) to ferrous sulfate in a Krebs-bicarbonate medium causes a time-dependent disruption of the membrane organization of the discs. Ferrous sulfate also causes ROS swelling and aggregation. Addition of taurine (5–20 mM) and zinc sulfate (250 μ M) to the incubation medium markedly protected ROS from the disrupting effect of ferrous sulfate. Of other amino acids tested, only β -alanine had a protective effect on ROS structure. Ferrous sulfate caused an increase in lipid peroxidation, measured by malonaldehyde formation. The protective effect of taurine and zinc is not accompanied by a reduction of lipid peroxidation. Water accumulation occurs as a consequence of the peroxidative action of ferrous sulfate, and this effect was counteracted by taurine and zinc. Ferrous sulfate did not cause damage to ROS structure when incubation was carried out in sucrose-HEPES. Sodium, chloride, and bicarbonate ions caused ferrous sulfate to disrupt ROS structure. It is concluded that taurine and zinc protect ROS membranes from ion and/or water entry occurring as a consequence of membrane lipid peroxidation.

Key words: rod outer segments, taurine, zinc, lipid peroxidation, retina

INTRODUCTION

The presence of physiological levels of taurine in the retina (20–40 mM) seems to be necessary to maintain the structure and function of visual cells. In vivo, a decrease of retinal concentration produced by taurine-deficient diets or by blockers of taurine transport leads to a marked disruption of the structure of photoreceptors, followed by severe retinal dysfunction [Hayes et al, 1975; Sturman et al, 1984; Lake, 1982; Pasantes-Morales et al, 1983]. A stabilizing action of taurine on the structure

Address reprint requests to H. Pasantes-Morales, Department of Human Development and Nutrition, Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, 1050 Forest Hill Road, Staten Island, NY 10314.

Received November 21, 1983; accepted January 12, 1984.

of the outer segments of photoreceptors has been observed *in vitro* when isolated rod outer segments (ROS) are exposed to continuous illumination [Pasantes-Morales et al, 1981]. Prolonged illumination produces marked structural damage in isolated rod outer segments as well as in photoreceptors *in vivo* [Noell et al, 1966; Sykes et al, 1981], and this effect has been attributed in part to the occurrence of peroxidation reactions caused by light [Kagan et al, 1973].

To investigate the protective action of taurine on damage produced by peroxidation reactions, in the present work we have explored its effects on the disruption caused by ferrous sulfate in an *in vitro* experimental model using isolated frog ROS. Intravitreal injection of ferrous sulfate in frogs has been found to cause a marked alteration of photoreceptors, concomitant with an increase in lipid peroxidation [Wiegand et al, 1982].

MATERIALS AND METHODS

Dark-adapted frogs were killed by decapitation, the eyes were enucleated, and the retinas excised. For isolation of ROS, retinas were washed in a Krebs-bicarbonate medium, then gently shaken in a Vortex mixer, and the detached ROS were concentrated by centrifugation. Aliquots of a suspension containing ROS were then transferred to a small glass tube (0.25 ml volume) containing Krebs-bicarbonate medium and the additions indicated for each experiment. At the indicated times, samples of the suspension were examined under a light microscope, with a $\times 40$ objective, and the number of ROS with intact or disrupted structures was counted. A total of 200 ROS was counted. Except for the microscope examination, all procedures were carried out in the dark.

Thiobarbituric Acid Assay

Aliquots of 25–100 μl containing about 1 mg protein were mixed with 1 ml (final volume) of a TRIS-HCl buffer, 0.15 M, pH 7.4, and incubated 30 min at 37°C; 0.4 ml of this mixture was removed and 1.5 ml of 20% acetic acid (pH 3.5) were added. Thiobarbituric acid (1.5 ml; 0.8%) was added, and the volume was adjusted to 4 ml with distilled water. The samples were boiled for 45 min, after which 1 ml of 1.2% KCl and 5 ml of a mixture of butanol-pyridine (15:1) were added. The samples were vortexed and centrifuged for 10 min. The upper phase, with a pink color, was removed and read at 532 nm.

Water Accumulation

To measure water accumulation by isolated ROS incubated under different conditions, a sample of the suspension was filtered through a Millipore filter (0.65 μm). The filter containing ROS was weighted and then dried for 2–3 hr. The dry weight represents the amount of tissue in ratio. The weight of dry filters and of filters containing aliquots of the medium but without tissue were subtracted in each case.

RESULTS

Morphological Features

Frog ROS isolated in a Krebs-bicarbonate medium show a well-preserved structure when maintained in the dark, with a normal shape and an ordered disc membrane organization (Fig. 1). A quantitative analysis of the number of ROS with

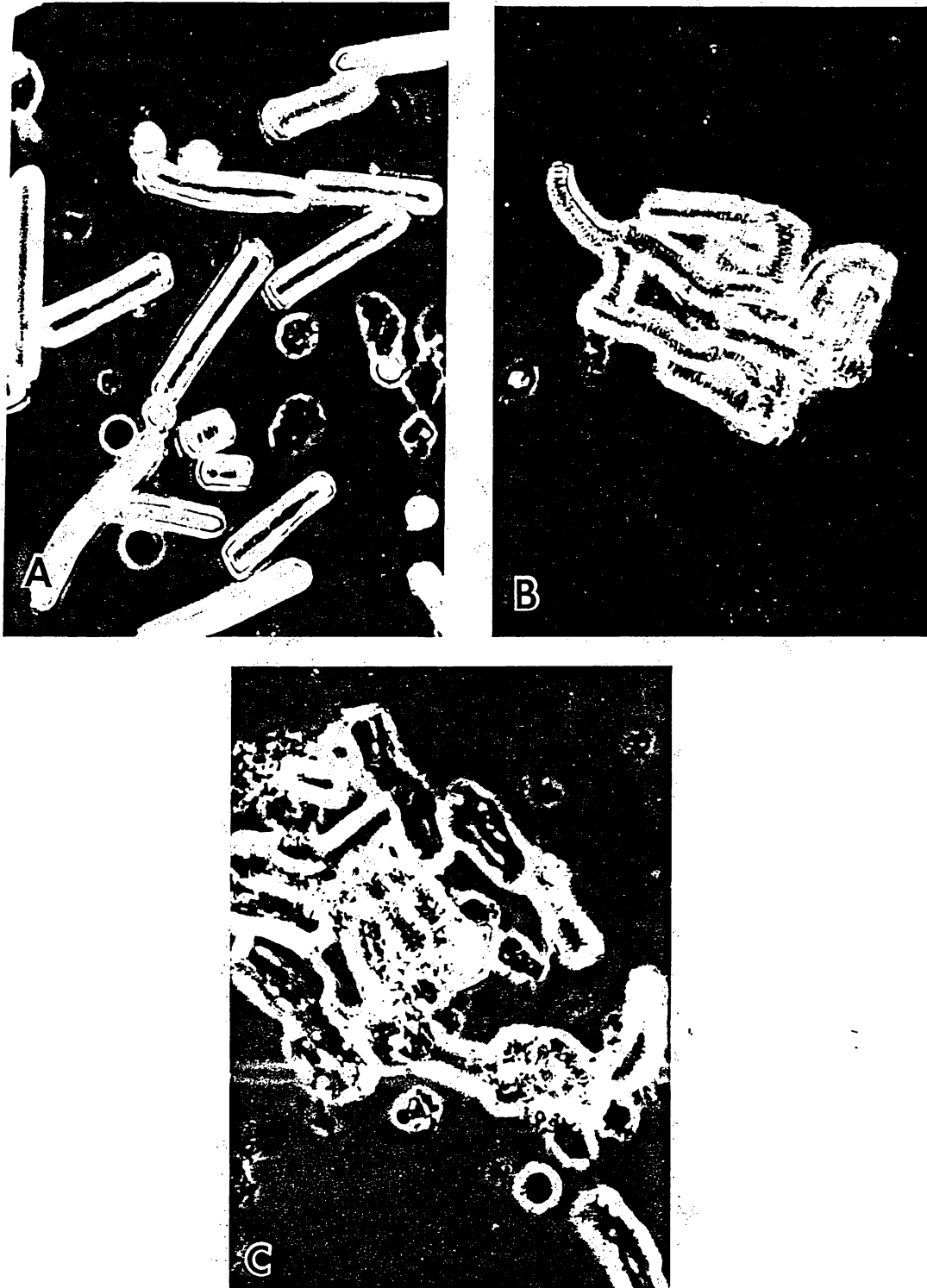


Fig. 1. Rod outer segment structure after exposure to 500 μM ferrous sulfate. A) Control; B) outer segments incubated for 30 min in a Krebs-bicarbonate medium containing 500 μM ferrous sulfate; C) outer segments after 50 min of incubation in the presence of ferrous sulfate.

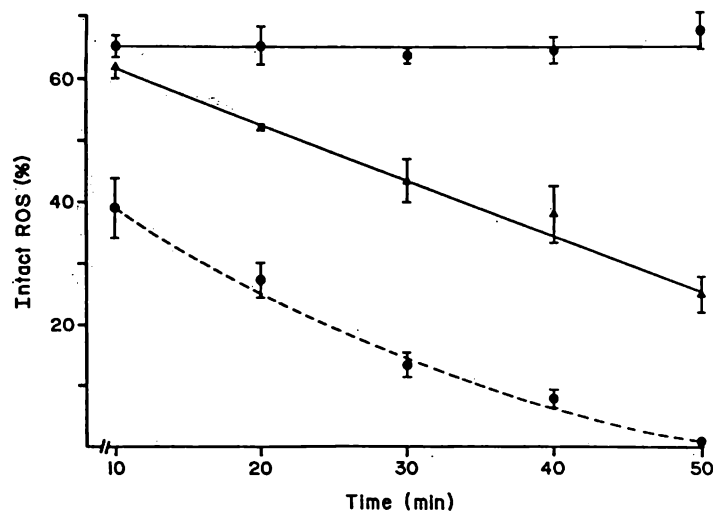


Fig. 2. Effect of taurine and zinc on the ferrous sulfate-induced damage of isolated frog rod outer segments (ROS). ROS were incubated in a Krebs-bicarbonate medium in the presence or absence of 500 μ M ferrous sulfate. At the indicated times, about 200 ROS were observed under a Zeiss microscope with a $\times 40$ phase objective, and the number of ROS showing an altered structure was counted. The results are the means \pm SEM of at least nine separate experiments. ●, Control; ▲, 500 μ M ferrous sulfate; ---, 500 μ M ferrous sulfate + 20 mM taurine + 250 μ M zinc sulfate. Significance of differences between all groups, $P < 0.001$.

normal structure showed that about 25% have been damaged during the isolation procedure. This percentage increased slightly with incubation time, being about 35% after 50 min of incubation. Addition of ferrous sulfate (250–500 μ M) to the incubation medium caused a marked disruption of ROS structure. The outer segments appear markedly enlarged and the disc membranes, which are barely detected in intact ROS, appear protrudent and conspicuous (Fig. 1). The disrupting effect of ferrous sulfate was dose and time dependent. Figure 2 shows the percentage of ROS with damaged structure after different times of exposure to 500 μ M ferrous sulfate. The number of disrupted ROS increased with time, and after 50 min all outer segments appear damaged, forming aggregates (Fig. 1). When ferrous sulfate was used at a concentration of 250 μ M, the disrupting effect was identical, but more time (30–90 min) was necessary to observe its disturbing action.

The Effect of Taurine and Zinc

Taurine added to the incubation medium was ineffective in protecting ROS against the deleterious effect of ferrous sulfate. However, when $ZnSO_4$ (250 μ M) was added together with the taurine, a protective effect was observed at all the times examined (Fig. 2). Addition of zinc alone was ineffective. Taurine concentrations from 5–50 mM protected against ferrous sulfate, 20 mM being the optimal concentration.

The Effect of Amino Acids

Other amino acids structurally or functionally related to taurine were tested for their ability to protect ROS structure from the effect of ferrous sulfate. Figure 3

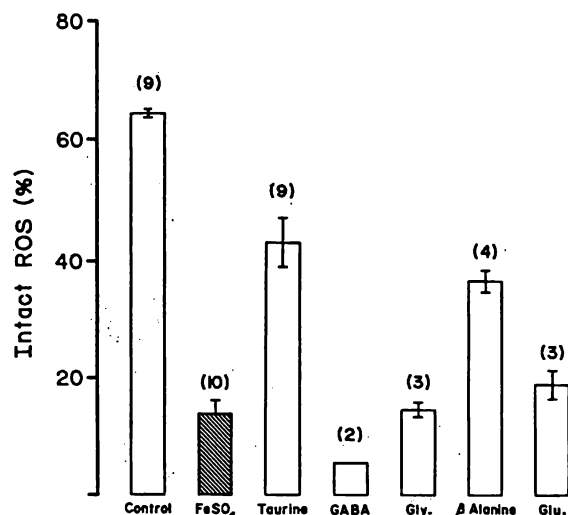


Fig. 3. Effects of amino acids on the ferrous sulfate-induced damage on ROS structure. The experimental conditions are as described in Figure 2. Incubation time was 30 min. Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parenthesis.

shows that except for β -alanine, no protective effect could be observed in the presence of other amino acids.

The Effect of Other Divalent Cations

To test the specificity of zinc as a protective agent, the effects of magnesium and calcium were examined. Increasing the magnesium concentration in the medium to 10 mM did not protect ROS structure. Added in the presence of taurine or of taurine plus zinc, magnesium did not modify their actions. In contrast, increasing the calcium concentration of the incubation medium from 2.5 to 5.0 mM was itself effective in protecting the structure of ROS exposed to ferrous sulfate (Fig. 4), although this effect was not as great as that shown by taurine and zinc. This effect was not increased in the presence of taurine, but it was somewhat enhanced when taurine and zinc were added simultaneously (Fig. 4), so that taurine, zinc, and 5 mM calcium showed the highest protective effect (Fig. 4). Omission of calcium from the incubation medium increased the deleterious effect of ferrous sulfate and also markedly decreased the protective action of taurine plus zinc (Fig. 4).

Malonaldehyde Formation

The extent of peroxidation reactions may be measured by formation of malonaldehyde, formed from the breakdown of polyunsaturated fatty acids. To investigate whether the protective effect of taurine was due to a decrease in lipid peroxidation reactions caused by ferrous sulfate, malonaldehyde formation was measured in ROS incubated in the presence of ferrous sulfate and in media containing taurine plus zinc. Table I shows that ferrous sulfate markedly increased tissue peroxidation and that taurine plus zinc did not decrease peroxidation caused by the oxidant. These results suggest that taurine and zinc do not affect directly the lipid peroxidation produced by ferrous sulfate; thus, the possibility exists that taurine is protecting ROS structure by a process secondary to lipid peroxidation.

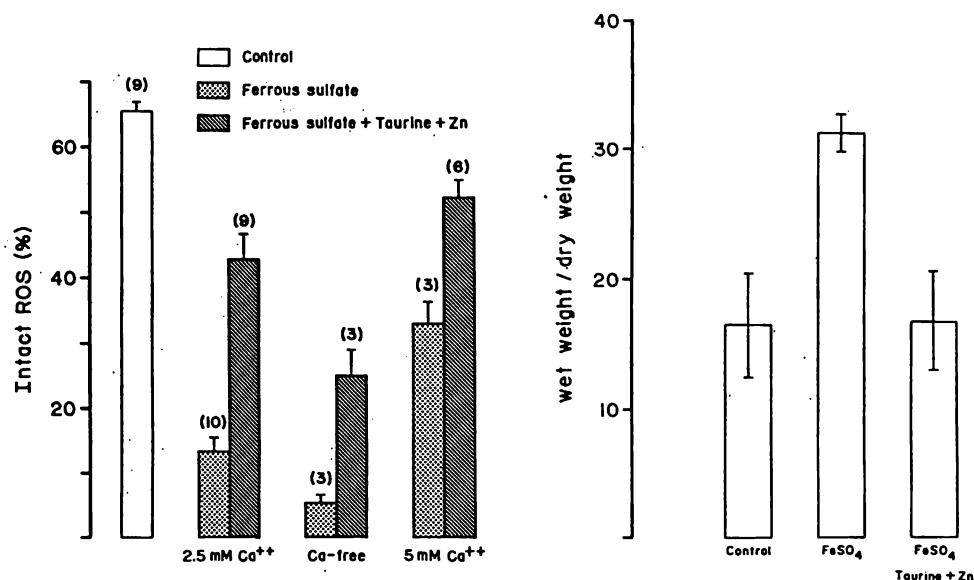


Fig. 4. Effects of calcium omission and of high calcium concentration on the percentage of disrupted ROS exposed to ferrous sulfate for 30 min in the presence or absence of taurine and zinc. Taurine concentration was 20 mM. Zinc, used as zinc sulfate, was 250 μ M. Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parenthesis.

Fig. 5. Water accumulation by frog ROS exposed to ferrous sulfate for 30 min in the presence or absence of taurine and zinc. Water accumulation was measured as described in Materials and Methods. Taurine concentration was 20 mM; zinc sulfate concentration was 250 μ M. Results are the means \pm SEM of six separate experiments.

TABLE I. Malonaldehyde Formation by Rod Outer Segments Exposed to Ferrous Sulfate in the Presence or Absence of Taurine and Zinc*

Incubation conditions	Thiobarbituric acid reactive material (U.D.O./mg protein/30 min)
Control	0.074 \pm 0.019
FeSO ₄ (500 μ M)	0.355 \pm 0.05
FeSO ₄ (250 μ M)	0.301 \pm 0.07
Taurine + zinc	0.089 \pm 0.02
Taurine + zinc + FeSO ₄ (500 μ M)	0.322 \pm 0.05
Taurine + zinc + FeSO ₄ (250 μ M)	0.322 \pm 0.07

*Taurine concentration was 20 mM, and zinc concentration, used as zinc sulfate, was 250 μ M. Results are the means \pm SEM of five separate experiments.

Water Accumulation and Ion Depletion or Substitution

The occurrence of edema subsequent to lipid peroxidation has been observed in a number of tissues [Chan et al, 1982; Willmore and Rubin, 1982]. Therefore, it is possible that swelling is occurring in ROS after lipid peroxidation induced by ferrous sulfate and that taurine protection is being exerted on this process. Figure 5 shows that ferrous sulfate indeed increased water accumulation by ROS, an effect completely

TABLE II. The Effect of Ion Depletion and Substitution on the Ferrous Sulfate-Induced Disruption of ROS Structure*

Condition	Intact ROS (%)
Control	
Krebs-bicarbonate	58.0 ± 0.5 (9)
Ferrous sulfate (500 μM)	
Krebs-bicarbonate	13.5 ± 2.1 (9)
Sucrose-HEPES	47.8 ± 0.9 (3)
Sodium-free medium	10.6 ± 3.9 (3)
Chloride-free medium	5.8 ± 2.1 (3)
Bicarbonate-free medium	20.4 ± 3.8 (3)

*In the sodium-free medium, choline chloride replaced sodium chloride and potassium bicarbonate replaced sodium bicarbonate. The chloride-free medium contained sodium isethionate. In the bicarbonate-free medium, HEPES replaced bicarbonate. The incubation time was 30 min. Results are the means ± SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

reversed by taurine and zinc. Water accumulation may be a process secondary to the changes caused in membrane permeability altered by lipid peroxidation. To explore this possibility, the influence of deletion or replacement of the major ionic constituents of the physiological medium was investigated. Table II shows that ferrous sulfate did not cause any appreciable damage to the structure of ROS incubated in isotonic sucrose buffered with HEPES. Replacement of sodium or chloride by choline or isethionate, respectively, did not protect from the deleterious effect of the oxidant. A slight protection was observed when HEPES replaced bicarbonate in the Krebs medium (Table II).

DISCUSSION

Since the early study of Hayes and co-workers [1975] on taurine-deficient cats, evidence has been accumulated suggesting that taurine is a necessary element for the maintenance of the normal structure of photoreceptors. The possibility that this protective effect of taurine is linked to lipid peroxidation was raised by *in vitro* experiments in which taurine preserved the structure of isolated frog ROS from the deleterious effect of illumination [Pasantes-Morales et al, 1981], which has been suggested to be accompanied by peroxidation reactions [Kagan et al, 1973]. Retinal damage produced by a number of experimental conditions, such as irradiation, oxygen, and iron-induced oxidation, has also been attributed to free radical formation [Hiramitsu et al, 1974, 1976]. Lipid peroxidation usually begins with the abstraction of atoms or molecules having unpaired electrons of a hydrogen atom from an unsaturated fatty acid, resulting in the formation of a lipid-free radical. Lipids of photoreceptor membranes are notable for their unusually high proportion of long chain, polyunsaturated fatty acids [Daemen, 1973]. Apparently, this particular lipid composition involving much unsaturation is critical for providing the high fluidity and specific microenvironment required for normal rhodopsin conformation. Due to this high level of polyunsaturation, ROS membranes are extremely susceptible to lipid peroxidation. Peroxide derivatives of polyunsaturated fatty acids are highly toxic to retinal function *in vivo* [Armstrong et al, 1982]. Free radicals may occur as normal

transients in many essential reactions and might, if uncontrolled, initiate highly deleterious chain reactions eventually causing irreversible tissue and cellular damage. In this study it was shown that taurine and zinc effectively protected the ROS structure from the action of a peroxidative agent, ferrous sulfate. However, neither of them had a direct effect in preventing lipid peroxidation reactions caused by ferrous sulfate. Their action seems rather to be exerted on a process subsequent to lipid peroxidation, apparently related to membrane permeability, water accumulation, and swelling occurring during lipid peroxidation.

It has been reported that a zinc-deficient state alters the ability of cells to maintain their volume and ion balance [Bettger and O'Dell, 1982], suggesting an involvement of the ion in the control of membrane permeability. A similar effect has been described with isolated ROS [Pasantes-Morales et al, 1981]. Therefore, it seems reasonable to consider that the protective effect of taurine and zinc may be related to the maintenance of the regulatory properties of the cell membrane regarding ion transport, in a preparation altered by peroxidative reactions. In nervous tissue, both in vivo and in vitro, lipid peroxidation has been associated with cellular damage and increasing permeability leading to cell edema [Chan et al, 1982; Willmore and Rubin, 1982]. In the present study also, an increase in water accumulation was found associated with peroxidation reactions triggered by ferrous sulfate. The reduction of swelling in ROS incubated in a medium lacking sodium, chloride, and bicarbonate is in line with the notion that the structural disruption of photoreceptors is caused by an altered ionic permeability accompanied by water entry.

The importance of taurine in maintaining photoreceptor structure has now much supporting experimental evidence. Regarding zinc, its involvement in normal vision is suggested by the severe visual dysfunctions observed in zinc-deficient conditions. The retina of zinc-depleted rats or of animals treated with zinc chelators show marked morphological alterations, particularly at the outer segments of photoreceptors, which appear disorganized, vesiculated, and degenerated [Budinger, 1961; Butturini et al, 1953; Leure-Dupree and Bridges, 1982]. These observations point to an in vivo protective effect of taurine and zinc similar to that observed in vitro.

An association of taurine and zinc has been suggested by observations showing that zinc deficiency results in taurine mobilization and loss through elevated concentrations in blood and urine [Hsu and Anthony, 1970]. Conversely, in taurine-deficient animals, a loss of zinc in ocular tissues has been detected [Sturman et al, 1981]. Therefore, it may be speculated that a taurine-zinc complex occurring naturally is more efficient in protecting the structure of photoreceptors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants 5R01 EY02540-05 from NIH and ICAINAL 800 792 from CONACYT. We acknowledge the technical assistance of Araceli Ordonez.

REFERENCES

- Armstrong D, Hiramitsu T, Gutteridge J, Nilsson SE (1982): Studies on experimentally induced retinal degeneration. 1. Effect of lipid peroxides on electroretinographic activity in the albino rabbit. *Exp Eye Res* 35:57-71.

- Bettger JW, Fish TJ, O'Dell BC (1978): Effects of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity *Proc Soc Exp Biol Med* 158:279-282.
- Budinger JM (1961): Diphenylthiocarbazon blindness in dogs. *Arch Pathol* 71:304-310.
- Butturini U, Grignolo A, Baronchelli A (1953): Diabete da ditizone: Aspetti metabolici, oculari ed istologici. *Gior Clin Med* 11:1253-1345.
- Chan PH, Yurko M, Fishman RA (1982): Phospholipid degradation and cellular edema induced by free radicals in brain cortical slices. *J Neurochem* 38:525-531.
- Daemen F (1973): Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochim Biophys Acta* 300:255-258.
- Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY (1975): Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188:949-951.
- Hiramitsu T, Hasegawa H, Hirata K, Nishigaki I, Yagi K (1976): Formation of lipoperoxide in the retina of rabbit exposed to high concentration of oxygen. *Experientia* 32:622-623.
- Hiramitsu T, Majima Y, Hasegawa Y, Hirata K (1974): Role of lipid peroxide in the induction of retinography by X-radiation. *Acta Soc Ophthalmol Jpn* 78:819-825.
- Hsu JM, Anthony WL (1970): Zinc deficiency and urinary excretion of taurine ³⁵S and inorganic sulfate ³⁵S following cystine ³⁵S injection in rats. *J Nutr* 100:1189-1196.
- Kagan V, Shvedova A, Novikov K, Kozlov Y (1973): Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. *Biochim Biophys Acta* 330:76-79.
- Lake N (1982): Is taurine an essential amino acid? *Retina* 4:261-262.
- Leure-Dupree AE, Bridges DB (1982): Changes in retinal morphology and vitamin A metabolism as a consequence of decreased zinc availability. *Retina* 2:294-304.
- Noell WK, Walker US, Kang BS, Berman S (1966): Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5:450-473.
- Pasantes-Mórales H, Ademe RM, Quesada O (1981): Protective effect of taurine on the light-induced disruption of isolated frog rod outer segments. *J Neurosci Res* 6:337-348.
- Pasantes-Morales H, Quesada O, Carabez A, Huxtable RJ (1983): Effects of the taurine transport antagonist, guanidoethane sulfonate, and β -alanine on the morphology of rat retina. *J Neurosci Res* 9:135-143.
- Sturman JA, Wen GY, Wisniewski HKM, Hayes KC (1981): Histochemical localization of zinc in the feline tapetum. *Histochemistry* 72:341-350.
- Sturman JA, Wen GY, Wisniewski HK, Neuringer MD (1984): Retinal degeneration in primates raised on a synthetic human infant formula. *Int J Dev Neurosci* 2:121-130.
- Sykes SM, Robinson GW, Waxler M, Kuwabara T (1981): Damage to the monkey retina by broad spectrum fluorescent light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20:425-434.
- Wiegand RD, Rapp LM, Tarver AP, Anderson RE (1982): Experimental retinal degeneration: Role of photoreceptor lipid peroxidation. *ARVO Abstr* 183.
- Willmore LS, Rubin JJ (1982): Formation of malonaldehyde and focal brain edema induced by subpial injection of FeCl₂ into rat isocortex. *Brain Res* 246:113-119.

IN ALL CORRESPONDENCE
CONCERNING THIS PAPER
REFER TO:
BRES 20669

Date: 3/12

Slips 1- 4

1st proof

303 154-157
Brain Research, 000 (1985) 000-000

Elsevier

BRE 20669

Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure

H. PASANTES-MORALES and C. CRUZ

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. (México)

(Accepted October 23rd, 1984)

Key words: taurine — hypotaurine — lipid peroxidation — retina — photoreceptors — membrane stability

Exposure of isolated frog rod outer segments to light (5000 lux) induces membrane disorganization and swelling. An increase of about 50% on lipid peroxidation, measured by the extent of malonaldehyde formation, accompanied the light-induced damage. Taurine and hypotaurine (25 mM) prevented the increase in lipid peroxidation, and provided an entire protection of rod outer segment structure.

Taurine is a physiological constituent of photoreceptors of vertebrate retinas, in which it is found at very high concentrations¹¹. The role of taurine in photoreceptors is not understood, but evidence has recently accumulated that relates this amino acid to mechanisms preserving the structure and membrane organization of photoreceptor outer segments. In vivo, a decrease in taurine concentration in the retina causes severe disruption of the outer segment structure and retinal dysfunction^{5,14}. In vitro, taurine protects isolated outer segments from structural damage induced by illumination, ferrous sulfate or high oxygen^{12,15}.

Intense and prolonged illumination is known to produce morphological damage in photoreceptor structure in vivo^{10,18}, as well as swelling and disorganization of isolated rod outer segments (ROS) in vitro^{12,17}. We have demonstrated that these in vitro effects of light are prevented by taurine which, at concentrations of 5–25 mM, provides complete protection of ROS structures¹².

Illumination is known to increase lipid peroxidation of retinal membranes⁷ and this effect could account for the damage to photoreceptor structure. Recently, an antioxidant effect of taurine has been de-

scribed in rabbit spermatozoa¹, raising the possibility that its protective effect on illuminated ROS is mediated through an ability to reduce lipid peroxidation in photoreceptor membranes. To explore this possibility, in the present study we have examined the extent of lipid peroxidation of illuminated frog ROS and the effect of taurine on this process.

Dark-adapted frogs were killed by decapitation, the eyes were enucleated and the retinas excised. ROS were separated from retinas by gentle shaking in a Vortex and concentrated by centrifugation at 1000 g. ROS were resuspended in a Krebs-bicarbonate medium, pH 7.4, and transferred to glass tubes (0.25 ml vol.). ROS suspensions were exposed for 30, 60 and 120 min to the light of two fluorescent tubes giving an illumination intensity of 5000 lux. Controls were maintained in the dark. Temperature was kept between 20 and 25 °C. At the indicated times, samples of the suspension were examined under a light microscope with a 40 × objective, and the number of ROS with intact or disrupted structure was counted. A total of 200 ROS from each tube was counted at each experiment. Malonaldehyde formation was assayed by the thiobarbituric acid reaction as previously described¹⁵.

We have previously shown that illumination of rod outer segments (ROS) incubated in a Krebs-bicarbonate medium causes a disruption of ROS structure characterized by swelling and membrane disruption¹². The number of ROS showing an altered structure increased with increasing time of illumination, being about 60% after 2 h of exposure to light (Table I). About 25% of ROS had disruption of structure after 2 h of incubation in the dark (Table I).

The addition of taurine (25 mM) to the incubation medium protected ROS structure from the damage caused by light. At this concentration of taurine, the number of illuminated ROS with intact structure was 70% lower than that of ROS kept in the dark (Table I).

The ability of taurine to protect ROS structure was compared with that of other amino acids, analogues of taurine and antagonists of taurine effects on nervous tissue. From all the compounds tested, only hypotaurine showed an effect comparable to that of taurine. GABA, glycine and β -alanine had some protective effects, whereas guanidino ethanesulfonate (GES), strychnine and bicuculline were ineffective.

The extent of lipid peroxidation in the illuminated ROS preparation was determined by the thiobarbituric acid reaction after 2 h of continuous illumination. Lipid peroxidation increased about 50% in illuminated ROS as compared with controls (Fig. 1). Taurine, at the concentration which provided protec-

TABLE I

Effect of amino acids and taurine antagonists on the light-induced disruption of rod outer segments

Compound*	Disrupted ROS (%)	
	Dark	Light
Control	24.8	60.1
Taurine		22.0
Hypotaurine		20.0
GABA		39.0
Glycine		34.0
β -alanine		51.0
Glutamate		53.0
GES		59.0
Bicuculline		59.0
Strychnine		57.1

Amino acids and GES were used at a concentration of 25 mM. Bicuculline and strychnine were 1 mM. Illumination time was 2 h. Results are the means of 4-10 separate experiments. S.E.M. were always lower than 10%.

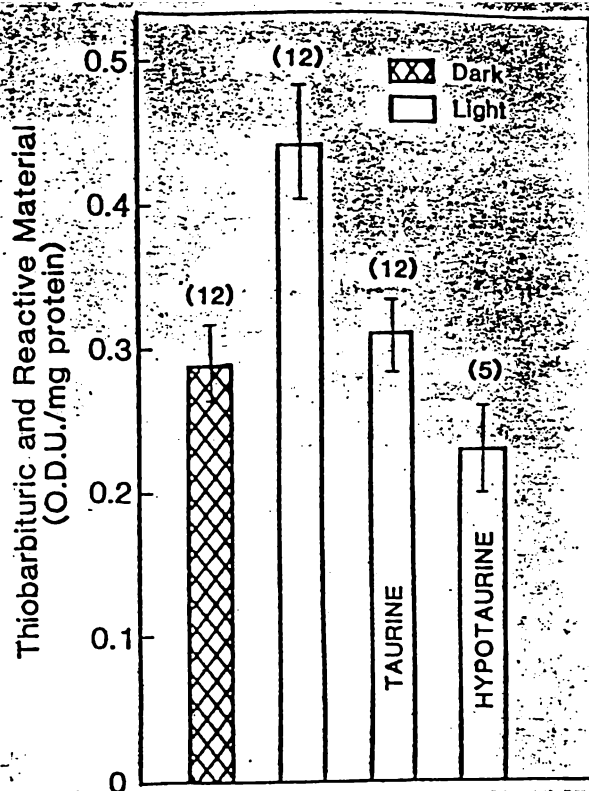


Fig. 1. Malonaldehyde formation by rod outer segments after 2 h of incubation in darkness or light in the presence or absence of taurine or hypotaurine (25 mM). Results are the means \pm S.E.M. of the number of experiments indicated in parenthesis.

tion of ROS structure (25 mM), abolished the increase of lipid peroxidation caused by light (Fig. 1). Hypotaurine had an even stronger effect, decreasing lipid peroxidation to levels lower than those of ROS kept in the dark (Fig. 1). β -Alanine and glycine caused a slight decrease, whereas any other of the tested compounds was ineffective in reducing lipid peroxidation (results not shown).

Membranes of the outer segments of photoreceptors are remarkable for their unusually high proportion of long chain polyunsaturated fatty acids³. Apparently, a lipid composition involving such insaturation is critical for providing the high fluidity and specific micro-environment required by the reactions of phototransduction^{2,20}.

The high oxidative metabolism of the retina, as well as the reactivity of rhodopsin to light, may easily lead to the formation of active free radicals able to cause and to propagate lipid peroxidation⁴. Unsaturated fatty acids, because of their double bonds, are highly susceptible to oxidation, thus making photore-

ceptors extremely vulnerable to lipid peroxidation and to the subsequent membrane structure damage.

Compounds such as vitamin E, superoxide dismutase or glutathione may serve as physiological antioxidants. The results of the present study, showing an effect of taurine in reducing lipid peroxidation in illuminated ROS, associated with a protective effect on membrane structure, suggest that this amino acid may also be involved in the mechanisms responsible for the control of oxidation in photoreceptors. This notion is consistent with the observation that taurine deficiency *in vivo* produces a pattern of vesiculation, disorganization and swelling of outer segments that is similar in some respects to that observed in vitamin E-deficient animals^{6,16}.

We observed that hypotaurine was even more potent than taurine in counteracting lipid peroxidation. This effect, however, may not be relevant for photoreceptor function, since little hypotaurine is present in the retina.

The taurine effect in reducing lipid peroxidation has been previously observed in rabbit spermatozoa, where taurine and hypotaurine are able to protect cells from the loss of motility caused by oxygen, with simultaneous reduction in lipid peroxidation¹. Furthermore, in rats treated with carbon tetrachloride, lipid peroxidation is reduced in liver after administration of taurine⁹.

In a previous study¹⁵ using another experimental model of lipid peroxidation induced damage i.e. exposure of ROS to ferrous sulfate, taurine provided a partial protection of ROS structure but failed to counteract the iron-induced lipid peroxidation. The

differences observed in the effect of taurine in ROS exposed to light or to ferrous sulfate may be due to differences in the free radical species involved in the peroxidation process: it is known that active species in the various agents inducing lipid peroxidation have specific scavengers which differ for each system. The active radical species responsible for the generation of lipid peroxidation occurring in cells after exposure to light or iron have not yet been fully identified.

The protective effect of taurine in the ferrous sulfate model may be related to an action as membrane stabilizer rather than to a direct effect as an antioxidant. Such a stabilizer action may deal with the control of membrane permeability to ions and water, occurring through the known effects of taurine on ionic fluxes^{8,13,19}.

Radical free induced damage to membranes is associated to increased permeability of ions and water, and taurine may contribute to protect cell structure avoiding ion overloading and the subsequent water accumulation.

All these observations suggest that the ability of taurine to protect lipid membranes from peroxidation injury may be an intracellular function of this amino acid. More work is necessary to substantiate this hypothesis as well as to relate this effect of taurine to its physiological role in tissues.

This work was partially supported by National Institutes for Health, Grant EY02540-06. The authors acknowledge the technical assistance of Araceli Ordóñez.

- 1 Alvarez, J. G. and Storey, B. T., Taurine, hypotaurine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility, *Biol. Reprod.*, 29 (1983) 548-555.
- 2 Bonting, S. L., Van Breugel, P. J. G. M. and Daemen, F. J. M., Influence of the lipid environment on the properties of rhodopsin in the photoreceptor membrane, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 83 (1977) 175-189.
- 3 Daemen, F. J. M., Vertebrate rod outer segment membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 300 (1973) 255-288.
- 4 Feeney, L. and Berman, E. R., Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals, *Invest. Ophthalmol.*, 15 (1976) 789-792.
- 5 Hayes, K. C., Carey, R. E. and Schmidt, S. Y., Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat, *Science*, 188 (1975) 949-951.

- 6 Hayes, K. C., Rabin, A. R. and Berson, E. L., An ultrastructural study of nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats, *Amer. J. Pathol.*, 78 (1975) 504-524.
- 7 Kagan, V., Schvedova, A., Novikov, K. and Kozlov, Y., Light induced free radical oxidation of membrane lipid photoreceptors of frog retina, *Biochim. Biophys. Acta*, 330 (1973) 76-79.
- 8 López-Colomé, A. M. and Pasantes-Morales, H., Effect of taurine on ⁴⁵Ca transport in frog retinal rod outer segments, *Exp. Eye Res.*, 32 (1981) 771-780.
- 9 Nakashima, T., Takino and Kuriyama, K., Therapeutic and prophylactic effects of taurine on experimental liver injury. In K. Kuriyama, O. Iwata and R. J. Huxtable (Eds.), *Sulfur Amino Acids: Biochemical and Clinical Aspects*, Alan R. Liss, New York, 1983, pp. 449-459.

- 10 Noell, W. K., Walker, U. S., Kang, B. S. and Berman, S., Retinal damage by light in rats, *Invest. Ophthalmol.*, 5 (1966) 450-473.
- 11 Orr, H. T., Cohen, A. J. and Lowry, O. H., The distribution of taurine in vertebrate retina, *J. Neurochem.*, 26 (1976) 609-612.
- 12 Pasantes-Morales, H., Ademe, R. M. and Quesada, O., Protective effect of taurine on the light-induced disruption of isolated frog rod outer segments, *J. Neurosci. Res.*, 6 (1981) 337-348.
- 13 Pasantes-Morales, H., Arzate, M. E. and Cruz, C., The role of taurine in nervous tissue: its effects on ionic fluxes, *Adv. exp. Med. Biol.*, 139 (1982) 273-292.
- 14 Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Cárabez, A. and Huxtable, R. J., Effects of the taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate and B-alanine on the morphology of rat retina, *J. Neurosci. Res.*, 9 (1983) 135-143.
- 15 Pasantes-Morales, H. and Cruz, C., Protective effect of taurine and zinc on peroxidation induced damage in photoreceptor outer segments, *J. Neurosci. Res.*, 11 (1984) 303-311.
- 16 Robison, W. G., Kuwabara, T. and Bieri, J. G., The roles of vitamin E and unsaturated fatty acids in the visual process, *Retina*, 2 (1982) 263-281.
- 17 Schultze, M. J., Zur Anatomie und physiologie der Retina, *Arch. Mikrosk. Anat.*, 2 (1966) 175-179.
- 18 Sykes, S. M., Robinson, G. W., Waxler, M. and Kuwabara, T., Damage to the monkey retina by broad fluorescent light, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20 (1981) 425-434.
- 19 Welty, J. D., McBroom, M. J., Appelt, A. W., Peterson, M. B. and Read, W. O., Effect of taurine on heart and brain electrolyte imbalance. In R. J. Huxtable and A. Barbeau (Eds.), *Taurine*, Raven Press, New York, 1976, 155-163.
- 20 Wheeler, T. G., Benolken, R. M. and Anderson, R. E., Visual membrane: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination, *Science*, 188 (1975) 1312-1314.

Discusión

Las investigaciones llevadas a cabo por el grupo de Hayes, Berson y Schmidt a mediados de la década pasada, mostraron que la disminución de los niveles de taurina en la retina del gato por debajo de un nivel crítico, producen la degeneración y muerte celular de los fotorreceptores, con la consiguiente pérdida progresiva de la capacidad de la capacidad visual (Hayes y cols 1975, Berson y cols. 1976, Schmidt y cols. 1977). Estos efectos descritos posteriormente en otras especies como la rata (Lake 1982, Pasantes-Morales y cols. 1983) puntualizaron por una parte la necesidad de este tejido de mantener una poza estable del aminoácido para ejercer su función, así como el desempeño de un papel clave de la taurina en el mantenimiento de la estructura y función de las células visuales.

Esta serie de trabajos dieron asimismo un impulso definitivo al interés por descubrir tanto la naturaleza del papel fisiológico, como el mecanismo por el cual actúa el aminoácido, no solamente en la retina sino también en los demás tejidos y órganos en donde se le localiza.

Huxtable, en base a los efectos descritos en ese entonces para el aminoácido, acuñó la frase de estabilizador de membranas (Huxtable 1976) refiriéndose al posible papel ejercido por la taurina en los tejidos animales, y aún cuando este pudiera ser un concepto vago sobre la función del aminoácido, hoy en día describe claramente la acción que el compuesto ejerce sobre la estructura de los fotorreceptores. Sin embargo los mecanismos moleculares íntimos involucrados en el mantenimiento de la

estructura de los fotorreceptores siguen siendo desconocidos.

En base a estos antecedentes, en el presente estudio investigamos el efecto protector de la taurina sobre la estabilidad membranal de los fotorreceptores, bajo diversas condiciones experimentales de degeneración celular.

En un primer modelo hicimos uso de la luz, ya que es el estímulo fisiológico natural que desencadena toda la serie de reacciones químicas y eléctricas que son la base del funcionamiento de la retina y bajo la cual este tejido se encuentra ampliamente expuesto. Es ampliamente conocido el hecho de que la exposición a la luz brillante, excesiva y continua tiene efectos deletereos sobre la retina de numerosas especies que incluyen al humano, la rata, el ratón, el conejo y los monos (Noell 1966, Kuwabara 1970, Ham 1980, Lawwil 1980, Sykes 1981) y en estas los fotorreceptores parecen ser las células más susceptibles de ser dañadas (Robinson y cols. 1982). El grado de daño ocasionado por la luz está relacionado con la intensidad y duración del estímulo y depende de factores tales como la presencia de oxígeno, de pigmentos melanínicos o de antioxidantes presentes en la retina como la vitamina E (o tocoferol), además de que efectos mecánicos y térmicos también parecen incrementar la susceptibilidad del daño lumínico (Schmidt 1984).

Utilizando una preparación de segmentos externos aislados de los fotorreceptores (SE) de la rana hemos observado que la exposición a la luz continua de una intensidad de 5000 lux durante 2 horas, produce la

desestabilización en la estructura de los segmentos externos, caracterizada por la desorganización membranal general, así como por el aumento en el volumen celular. Este efecto degenerativo ocasionado por la luz se contrarresta totalmente cuando se encuentra presente la taurina en el medio de incubación. Cuantitativamente el número de segmentos externos que permanecen intactos en estas condiciones es aún mayor que el de una preparación mantenida en la obscuridad durante el tiempo de la incubación. De todos los aminoácidos que se probaron solamente la hipotaurina mostro un efecto protector comparable al de la taurina.

Posteriormente examinamos el efecto que producía la taurina sobre la degeneración membranal inducida por el sulfato ferroso, un conocido agente prooxidante, que produce daño extenso a las membranas biológicas debido a su capacidad para promover la peroxidación de los lípidos de las membranas. En el sistema nervioso este compuesto provoca daño membranal, edema celular y la generación de descargas epileptiformes (Willmore y Rubin 1982). Asimismo, la inyección intravitreal de este compuesto en la retina del conejo, la rata o el mono produce tanto la disminución en la amplitud del electroretinograma como el daño celular extenso que se manifiesta de manera particular en los segmentos externos de los fotorreceptores (Barber y cols. 1971, Raff y cols. 1982).

En nuestra preparación de SE la presencia del $FeSO_4$ produjo la ruptura de las células, siendo que el patrón degenerativo observado fue muy similar al que se manifiesta en el modelo de degeneración por luz. En estas condiciones la taurina por si sola no previno del daño ocasionado por el

fierro, haciéndose necesaria la presencia específica del zinc para poder observar el efecto protector del aminoácido. El zinc es un elemento traza esencial que se encuentra presente en altas concentraciones en los tejidos oculares de la gran mayoría de las especies animales, incluyendo al hombre (Galín y cols. 1962; Eckhert 1979; Bazan y Reddy 1985). Se ha reportado que la deficiencia de este metal de transición produce entre otros efectos la degeneración retiniana (Leure-Dupree 1981,1982). El papel que desempeña el zinc en la fenomenología de estos efectos se desconoce, aunque se sabe que además de participar como cofactor de diversas metaloenzimas, algunas de las cuales han sido detectadas en los tejidos oculares, posee acciones que lo relacionan con el mantenimiento de la función y la estructura de las membranas biológicas (Bettser y O Dell 1982), quizá por un mecanismo que involucre su nula habilidad para funcionar en un sistema redox, lo cual es esencial para iniciar la peroxidación de los lípidos (Huxtable 1976). La participación del zinc en los mecanismos que sostienen el papel estabilizador membranal de la taurina en los diferentes tejidos ha sido suscitada por diversos autores (Barbeau 1974; Van Gelder 1983).

La acción protectora conjunta de la taurina y el zinc ha sido observada recientemente en una preparación de linfoblastoides humanos mantenidos por tiempos cortos en presencia del ácido retinoico o del retinol, dos agentes citotóxicos que producen la muerte celular (Pasantes-Morales y cols. 1984). En este trabajo la viabilidad, estructura y volumen celular fueron mantenidos cuando se encontraban presentes tanto la taurina como el zinc en el medio de cultivo. Es interesante hacer notar que en esta preparación la capacidad proliferativa

de las células se reduce significativamente cuando son depletadas de taurina, efecto que se revierte cuando se añade el aminoácido al medio (Wristh y cols. 1984). Otra evidencia experimental que apoya la interacción de la taurina y el zinc en el mantenimiento de la estabilidad membranal proviene de estudios que muestran que en perros que sufren degeneración retinal congénita, los niveles oculares de ambos compuestos se ven disminuidos, específicamente a nivel de las membranas que rodean a las células que constituyen la capa del tapetum lucidum (Sturman y cols. 1982).

Existen evidencias experimentales que apoyan la participación de las reacciones de peroxidación de los lípidos de las membranas, como uno de los principales mecanismos responsables del efecto deletéreo ocasionado por la luz a las células de la retina, particularmente de la destrucción de los fotorreceptores (Kagan y cols. 1973; Delmelle 1977; Noell 1980; Wiesand y cols. 1983).

La peroxidación lipídica es originada por la acción de radicales libres, los cuales son moléculas altamente reactivas que poseen un electrón desapareado en uno de sus orbitales externos, y que al interactuar con los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de las membranas provocan la pérdida de un átomo de hidrógeno en la cadena hidrocarbonada del ácido graso, lo cual ocasiona tanto el rearrreglo de las dobles ligaduras, dando origen a la presencia de dienos conjugados, como la formación de un radical libre lipídico. Este radical lipídico reacciona fácilmente con el oxígeno presente convirtiéndose en un radical libre lipoperoxi, el cual tiene la

capacidad de abstraer un nuevo átomo de hidrógeno de las cadenas adyacentes de ácidos grasos (Hidroxi-peróxido lipídico), iniciándose así una nueva serie de reacciones en cadena propagadas y auto-perpetuables o bien puede ciclarse y dar origen a un radical libre endoperoxido que es susceptible de ser degradado. Uno de estos productos de degradación es el malondialdehído el cual se origina de aquellos ácidos grasos que en su estructura tengan por lo menos tres insaturaciones (Slater 1984, Halliwell y Gutteridge 1984).

Se ha descrito que la exposición de las ratas albinas a la luz continua, produce en la retina la disminución en la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados particularmente del ácido docosahexaenoico (22:6), así como el subsecuente aumento en la producción de los dienos conjugados, y del malondialdehído (Joel y cols. 1983, Wiesand y cols. 1983). Asimismo, los niveles de vitamina E en las retinas de estas ratas disminuyen al 50% de sus valores normales cuando son expuestas durante 2 días a la luz continua (Joel y cols. 1983), efecto que se relaciona con el reporte de Kasan que muestra que en las ratas deficientes en vitamina E y que han sido mantenidas bajo luz de alta intensidad, se acumulan productos derivados de la peroxidación lipídica, así como se observa una disminución de la actividad eléctrica de la retina (Kasan y cols. 1981).

El control de las reacciones peroxidativas en la retina es de crucial importancia, particularmente en los fotorreceptores, ya que estas células son extremadamente susceptibles a sufrir daño peroxidativo debido por una parte a la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas de los segmentos externos (Daemen 1973, Anderson 1974) y a

que la retina es un tejido con un alto metabolismo oxidativo, lo cual aunado a la alta reactividad de la rodopsina a la luz podrian llevar a la formación de radicales libres capaces de iniciar y propagar la peroxidación lipídica, causando así la pérdida de la integridad membranal.

En nuestra preparación de segmentos externos, la luz indujo un aumento en los niveles de peroxidación de los lípidos medidos a través de la formación del malondialdehído. La presencia de taurina e hipotaurina en el medio de incubación previno tanto del aumento en la generación de lipoperoxidos, como del daño estructural de los segmentos externos ocasionado por la luz, lo cual podría sugerir que la taurina ejerce su efecto protector en estas células actuando a manera de un antioxidante. Sin embargo, esta proposición no se ve apoyada por los experimentos llevados a cabo con las sales de fierro en donde se mostró que ni la taurina ni la hipotaurina evitaron el aumento en la acumulación del malondialdehído, aún cuando sí protegieron de la degeneración membranal.

Alvarez y Storey han mostrado que tanto estos dos aminoácidos azufrados, como la albúmina son capaces de preservar la movilidad celular de los espermatozoides de conejo, así como de prevenir el aumento en la producción de lipoperoxidos asociado con estos efectos, que ocurre bajo condiciones oxidativas que promueven la peroxidación de los lípidos de las membranas de estas células y que reducen la capacidad de los espermatozoides para movilizarse (Alvarez y Storey 1983). Por otra parte el grupo de Chen y colaboradores han descrito que bajo diferentes condiciones experimentales que generan radicales libres, se produce la

disminución de ciertos fosfolípidos membranales notables por contener en su estructura una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, así como un aumento concomitante en la concentración de ácidos grasos libres (Chen y cols. 1983,1984). Así la liberación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas que han sido dañadas por diversos mecanismos que generan radicales libres (luz, O₂, Fe²⁺) podrían iniciar una serie de reacciones que condujeran a la propagación de las reacciones peroxidativas con el subsecuente daño celular irreversible. Aquí cabe señalar la relación existente entre el efecto protector y antioxidativo que ejercieron tanto la taurina como la albúmina en el modelo de degeneración membranal inducido por la luz, con el hecho de que la degeneración retiniana ocasionada por la deficiencia de taurina en los ratos no ocurre cuando se utiliza a la albúmina en la dieta como fuente proteica (Hayes y cols. 1975).

Como es bien sabido una de las características más sobresalientes de la albúmina es su amplia capacidad para unir ácidos grasos libres (Spector 1975), por lo que existe la posibilidad de que el efecto protector ejercido por la taurina estuviera relacionado con la interacción de los ácidos grasos de las membranas, efecto que podría ocurrir ya sea directamente o bien a través de otra macromoléculas, como proteínas de membrana. Se sabe que el transporte y liberación a través de las membranas de ciertos aminoácidos como la prolina, el GABA, el ácido glutámico o la taurina se ven afectados por la presencia de ácidos libres (Rhoads 1982,1983, Troeser y cols. 1984). Se ha reportado asimismo que en células de retinoblastoma, el funcionamiento de la proteína acarreadora de la taurina se ve afectado

por los cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas (Yorek 1984). La posibilidad de que la taurina ejerza su efecto protector a través de una interacción con los ácidos grasos, se ve apoyada por experimentos recientes que muestran un efecto protector de la taurina y la hipotaurina sobre la destrucción de los segmentos externos que han sido mantenidos en presencia de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico (Resultados no publicados)

Es importante hacer notar que muchos de los efectos descritos para el aminoácido son dependientes de la presencia de ciertos iones del medio, lo cual muestra que la taurina participa en la regulación de la permeabilidad iónica de las células. La taurina modifica la unión de calcio a las membranas de la retina, incrementando la captura de calcio dependiente de energía en tanto que bloquea la permeabilidad pasiva a este catión (Pasantés-Morales 1979,1982), asimismo modifica la salida de potasio del axón nervioso (Gruener y Bryant 1975) y previene el incremento en el influjo de agua y bicarbonato inducido por la luz que se observa en los segmentos externos expuestos a la iluminación continua (Pasantés-Morales y cols. 1981). Nuestros resultados muestran que el efecto estabilizador de la taurina observado en el modelo de degeneración membranar inducido por el sulfato ferroso, depende de la presencia de calcio en el medio, siendo reducida su acción cuando este catión se encuentra ausente y ejerciendo un efecto más potente cuando la concentración de calcio es aumentada. Bajo estas condiciones experimentales el aminoácido previno del aumento en la acumulación de agua que se produjo como consecuencia del daño peroxidativo. En un estudio previo habíamos reportado que la sola presencia de taurina

era una condición suficiente para mantener la estructura de los fotorreceptores cuando estos fueron mantenidos en un medio libre de calcio y con EGTA, bajo lo cual se produce el hinchamiento de las células y la protrusión del contenido citoplásmico de estas (Pasantes-Morales y Cruz 1982).

Las evidencias experimentales mostradas en conjunto muestran que cualesquiera que sean los mecanismos íntimos bajo los cuales actúa la taurina, ya sea a través de una acción directa sobre los procesos peroxidativos, suprimiendo la generación y/o propagación de la peroxidación lipídica o bien previniendo el daño membranal mediante el control de la permeabilidad iónica, desempeña un papel clave en el mantenimiento de la estructura de los fotorreceptores.

Bibliografia

- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. (1983) Taurine, hipotaurine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29:548-555
- ANDERSON, R.E. y RISK, M. (1974) Lipids of ocular tissues IX: The phospholipids of frog photoreceptor membranes. *Vis. Res.* 14:129-131
- AWAPARA, J. (1976) The metabolism of taurine in the animal. En: *Taurine* (R.J. Huxtable y A. Barbeau, eds.) Raven Press, New York, pp. 1-19
- BARBEAU, A. y DONALDSON, J. (1974) Zinc, taurine and epilepsy. *Arch. Neurol.* 30:52-58
- BARBER, A.N., CATSULIS, C. y CANGELOSI, R.J. (1971) *Brit. J. Ophthalmol.* 55:91-105
- BAZAN, N.G. y REDDY, T.S. (1985) Retina. En: *Handbook of Neurochemistry* (A. Lajtha ed.) Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 507-575
- BERSON, E.L., HAYES, K.C., RABIN, A.R., SCHMIDT, S.Y. y WATSON, G. (1976) Retinal degeneration in cats fed casein: Supplementation with methionine, cysteine or taurine. *Invest. Ophthalmol.* 15:52-58
- BETTGER, J.W. y O DELL, B.C. (1982) A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* 28:1425-1438
- BONAVENTURE, N., WIOLAND, N. y MANDEL, P. (1974) Antagonists of the putative inhibitory transmitters effects of taurine and GABA in the retina. *Brain Res.* 80:281-289
- COHEN, A.I., MC DANIEL, M. y ORR, H.T. (1973) Absolute levels of some free amino acids in normal and fractionated retinas. *Invest. Ophthalmol.* 12:686-693
- CUNNINGHAM, R.A. y MILLER, R.F. (1976) Taurine: its selective action on neuronal pathways in the rabbit retina. *Brain Res.* 117:341-345
- CUNNINGHAM, R.A. y MILLER, R.F. (1980) Electrophysiological analysis of taurine and glycine actions on neurons of the mudpuppy retina. I. Intracellular recordings. *Brain Res.* 197:123-138
- CUNNINGHAM, R.A. y MILLER, R.F. (1980) Electrophysiological analysis of taurine and glycine action on neurons of the mudpuppy retina. II. ERG, PNR and Muller cell recordings. *Brain Res.* 197:139-151
- CHAN, P.H., YURKO, M. y FISHMAN, R.A. (1982) Phospholipid degradation and cellular edema induced by free radicals in brain cortical slices. *J. Neurochem.* 38:525-531
- CHAN, P.H., FISHMAN, R.A., SCHMIDLEY, J.W. y CHEN, S.F. (1984) Release of

polyunsaturated fatty acids from phospholipids and alteration of brain membrane integrity by oxygen-derived free radicals. J. Neurosci. Res. 12:595-606

DAEMEN, F.J.M. (1973) Vertebrate rod outer segment membranes. Biochim. Biophys. Acta 300:255-263

DAWSON, C. & Neal, M.J. (1984) Taurine uptake processes in the isolated rabbit retina and the effects of lish. Exp. Eye Res. 38:533-546

DELMELLE, M. (1973) Retinal damage by lish: possible implication of singlet oxygen. Biophys. Struct. Mechanism 3:195-198

ECKHERT, C.D. (1979) A comparative study of the concentration of Ca, Fe, Zn and Mn in ocular tissues. Fed. Proc. 38:872-875

FREDERICK, J.M., LAM, D.K.M. & HOLLYFIELD, J.G. (1982) Retinal taurine: spatial and temporal patterns of uptake, localization and release during development of *Xenopus*. In: The structure of the eye (J.G. Hollyfield, ed.) Elsevier Biomedical, New York, pp.229-236

GALIN, M.A., NAND, H.D. & HALL, T. (1962) Ocular zinc concentration. Invest. Ophthalmol. 1:142-148

GEGGEL, H.S., AMENT, M.E., HECKENLIVELY, J.R. & KOPPLE, J.D. (1982) Evidence that taurine is an essential amino acid in children receiving total parenteral nutrition. Clin. Res. 30:486A

GRUENER, R. & BRYANT, H.J. (1975) Excitability modulation by taurine: actions on axon membrane permeabilities. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194:514-521

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219:1-14

HAM, H.T., RUFFOLO, J.J., MUELLER, H.A. & GUERRY, D. (1980) The nature of retinal radiation damage: Dependence of wavelength, power, level and exposure time. Vision Res. 20:1105-1112

HAYES, K.C., CAREY, R.E. & SCHMIDT, S.Y. (1975) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. Science 188:949-951

HAYES, K.C., RABIN, A.R. & BERSON, E.L. (1975) An ultrastructural study of nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats. Am. J. Pathol. 78:505-524

HAYES, K.C. & STURMAN, J.A. (1981) Taurine in metabolism. Ann Rev. Nutr. 1:401-425

HOPE, D.B. (1957) The persistence of taurine in the brains of pyridoxine deficient rats. J. neurochem. 1:364-369

HRUSKA, R.E., THUT, P.D., HUXTABLE, R. & BRESSLER, R. (1973) Taurine:

hypothermic effect in mice. *Pharmacologist*, 15:301-305

HUXTABLE, R. (1976) Metabolism and function of taurine in the heart. *Ent Taurine* (R.J. Huxtable and A. Barbeau, eds.) Raven Press, New York, pp. 99-119

HUXTABLE, R.J., LAIRD, H.E. & LIPPINCOTT, S.E. (1979) The transport of taurine in the heart and the rapid depletion of tissue taurine content by guanidino ethyl sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211:465-471

HUXTABLE, R.J. & LIPPINCOTT, S.E. (1982) Sources and turnover rates of taurine in newborn, weanling and mature rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 139:23-46

IZUMI, K., DONALDSON, J., MINNICH, J.L. & BARBEAU, A. (1973) Ouabain induced seizures in rats: suppressive effects of taurine and amino butyric acid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51:885-889

JACOBSEN, J.G. & SMITH, L.H. (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48:424-511

JOEL, C.D., STEIN, M.A., THOME, J.A., TARVER, A.P., SIEVERT, T.J. & HANNAH, J.E. (1983) Vitamin E content of retina during prolonged exposure to light in vivo. *J. Neurochem.* 41 (Suppl):134

KAGAN, V., SCHVEDOVA, A., NOVIKOV, K. & KOZLOV, Y. (1973) Light induced free radical oxidation of membranes lipid photoreceptors of frog retina. *Biochim. Biophys. Acta* 330:76-79

KAGAN, V.E., KULIEV, I.Y., SPIRICHEV, V.B., SCHVEDOVA, A.A. & KOSLOV, Y.P. (1981) Accumulation of lipid peroxidation products and depression of retinal electrical activity in vitamin E-deficient rats exposed to high-intensity light. *Bull. Exp. Biol. Med.* 91:144-148

KARLSEN, R.L. & FONNUM, F. (1976) The toxic effect of sodium glutamate on sodium glutamate on rat retina, changes in putative neurotransmitters and their corresponding enzymes. *J. Neurochem.* 27:1437-1442

KENNEDY, A.J. & VOADEN, M.J. (1974) Distribution of free amino acids in the frog retina. *Biochem. Soc. Trans.* 2:1256-1258

KENNEDY, A.J. & VOADEN, M.J. (1976) Studies on the uptake and release of radioactive taurine by the frog retina. *J. Neurochem.* 27:131-137

KENNEDY, A.J. & NEAL, M.J. (1978) The effect of light and potassium depolarization on the release of endogenous amino acids from the isolated rat retina. *Exp. Eye Res.* 26:71-75

KULAKOWSKY, E.C. & MATURO, J. (1984) Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochim. Pharmacol.* 33:2835-2838

KUWABARA, T. (1970) Retinal damage by visible light. *Exp. Eye Res.*

22:549-552.

LAKE, N., MARSHALL, J. y VOADEN, M. J. (1978) High affinity uptake sites for taurine in the retina. *Exp. Eye Res.* 27:713-718

LEURE-DU PREE, A. E. (1981) Electron opaque inclusions in the rat retinal pigment epithelium after treatment with chelators of zinc. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21:1-9

LEURE-DU PREE, A. E. y BRIDGES, C. B. (1982) Changes in retinal morphology and vitamin A metabolism as a consequence of decreased zinc availability. *Retina* 2:294-302

LIN, C. T., LI, N. Z. y WU, J. Y. (1983) Immunocytochemical localization of L-glutamate decarboxylase, gamma aminobutyric acid transaminase, cysteine sulfinic acid decarboxylase, aspartate aminotransferase and somatostatin in rat retina. *Brain. Res.* 270:273-283

LOPEZ-COLOME, A. M., ERLIJ, D. y PASANTES-MORALES, H. (1976) Different effects of calcium flux blocking agents on light and potassium stimulated release of taurine from retina. *Brain Res.* 113:527-534

LOPEZ-COLOME, A. M., SALCEDA, R. y PASANTES-MORALES, H. (1978) Potassium stimulated release of glycine, GABA and taurine from the chick retina. *Neurochem. Res.* 3:431-441

LOPEZ-COLOME, A. M. y PASANTES-MORALES, H. (1980) Taurine interactions with chick retinal membranes. *J. Neurochem.* 34:1047-1052

MACAIONE, S., TUCCI, G., DE LUCA, G. y DI GIORGIO, R. M. (1976) Subcellular distribution of taurine and cysteine sulphinate decarboxylase activity in ox retina. *J. Neurochem.* 27:1411-1415

MACAIONE, S. y DI GIORGIO, R. M. (1977) Subcellular distribution of cysteine oxidase activity in ox retina. *Life Sci.* 20:617-622

MANDEL, P., PASANTES-MORALES, H. y URBAN, P. F. (1976) Taurine, a putative transmitter in the retina. *En: Transmitters in the visual process* (S. L. Bonting, ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 89-105

MATHUR, R. L., KLETHI, J., LEDIG, M. y MANDEL, P. (1976) Cysteine sulfinic acid decarboxylase in the visual pathway of adult chicken. *Life Sci.* 18:75-80

MORGAN, W. W. y KAMP, C. W. (1980) A GABAergic influence on the light induced increase in dopamine turnover in the dark-adapted rat retina in vivo. *J. Neurochem.* 34:1082-1086

NISHIMURA, C., IDA, S. y KURIYAMA, K. (1983) Taurine biosynthesis in frog retina: effects of light and dark adaptation. *J. Neurosci.* 9:59-67

NOELL, W. K., WALKER, V. S., RANG, B. S. y BERMAN, S. (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol.* 5:450-473

- NOELL, W.K. (1980) Possible mechanism of photoreceptor damage by light in mammalian eyes. *Vision Res.* 20:1163-1167
- OJA, S.S. y KONTRÖ, P. (1983) Taurine. En: *Handbook of Neurochemistry* Vol. 3. (A. Lajtha, ed.), Plenum Press, New York, pp.501-533
- ORR, H.T., COHEN, A.L. y LOWRY, O.H. (1976) The distribution of taurine in the vertebrate retina. *J. Neurochem.* 26:609-611
- PASANTES-MORALES, H. (1982) Taurine-calcium interactions in frog rod outer segments: taurine effects on an ATP-dependent calcium translocation process. *Vision Res.* 22:1487-1493
- PASANTES-MORALES, H., KLETHI, J., URBAN, P.F. y MANDEL, P. (1972) Free amino acids in chicken and rat retina. *Brain Res.* 41:494-497
- PASANTES-MORALES, H., KLETHI, J., URBAN, P.F. y MANDEL, P. (1972) The physiological role of taurine in the retina: uptake and effect on ERG. *Physiol. Chem. Physics.* 4:339-348
- PASANTES-MORALES, H., BONAVENTURE, N., WIOLAND, N. y MANDEL, P. (1973) Effect of intravitreal injections of taurine and GABA on chicken ERG. *Int. J. Neurosci.* 5:235-245
- PASANTES-MORALES, H., URBAN, P.F., KLETHI, J. y MANDEL, P. (1973) Lightstimulated release of ³⁵S-taurine from chicken retina. *Brain Res.* 51:375-378
- PASANTES-MORALES, H., KLETHI, J., LEDIG, M. y MANDEL, P. (1973) Influence of light and dark on the free amino acid pattern of the developing chick retina. *Brain Res.* 5:57-65
- PASANTES-MORALES, H., LÓPEZ-COLOME, A.M., SALCEDA, R. y MANDEL, P. (1976) Cysteine sulfinate decarboxylase in chick and rat retina during development. *J. Neurochem.* 27:1103-1106
- PASANTES-MORALES, H., ADEME, R.M. y LOPEZ-COLOME, A.M. (1979) Taurine effects on Ca-transport in retinal subcellular fractions. *Brain Res.* 172:131-138
- PASANTES-MORALES, H., QUESADA, O. y CARABEZ, A. (1981) Light stimulated release of taurine from retinas of kainic acid treated chick. *J. Neurochem.* 36:1583-1586
- PASANTES-MORALES, H., ARZATE, M.E. y CRUZ, C. (1982) The role of taurine in nervous tissue: its effects on ionic fluxes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 139:273-292
- PASANTES-MORALES, H., QUESADA, O., CARABEZ, A. y HUXTABLE, R.J. (1983) Effect of taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate and β -alanine on the morphology of the rat retina. *J. Neurosci. Res.* 9:35-44
- PASANTES-MORALES, H., WRIGHT, C.E. y GAULL, G.E. (1984) Protective effect of

taurine, zinc and tocopherol on retinol-induced damage in human lymphoblastoid cells. *J. Nutr.* 14:64-69

QUESADA, O., HUXTABLE, R. J. y PASANTES-MORALES, H. (1984) Effect of guanidinoethane sulfonate on taurine uptake by the rat retina. *J. Neurosci. Res.* 11:179-186

RAPP, L. P., WIEGAND, R. D. y ANDERSON, R. E. (1982) ferrous ion mediated retinal degeneration: role of rod outer segments lipid peroxidation. En: *Biology of normal and genetically abnormal retinas* (R. Clayton, I. Heywood, H. Reading and A. Wristh, eds.) Academic Press, New York, pp. 109-119

RHOADS, D. E., KAPLAN, M. A., PETERSON, N. A. y RAGHUPATHY, E. (1982) Effects of free fatty acids on synaptosomal aminoacids uptake systems. *J. Neurochem.* 38:1255-1260

RHOADS, D. E., OCKNER, R. K., PETERSON, N. A. y RAGHUPATHY, E. (1983) Modulation of membrane transport by free fatty acids: inhibition of synaptosomal sodium-dependent amino acid uptake. *Biochemistry* 22:1965-1969

ROBINSON, W. G., KUWABARA, T. y BIERI, J. G. (1982) The role of vitamin E and unsaturated fatty acids in the visual process. *Retina* 2:263-281

SALCEDA, R. y PASANTES-morales, H. (1975) A calcium-coupled release of taurine from retina. *Brain Res.* 96:206-211

SALCEDA, R., LOPEZ-COLOME, A. M. y PASANTES-MORALES, H. (1977) Light stimulated release of 35S-taurine from frog retinal rod outer segments. *Brain Res.* 135:186-191

SALCEDA, R., PACHECO, P., CARABEZ, A. Y PASANTES-MORALES, H. (1979) Taurine levels, uptake and synthesizing enzyme activities in degenerated rat retinas. *Exp. Eye Res.* 28:137-146

SALCEDA, R. y PASANTES-MORALES, H. (1982) Uptake, release and binding of taurine in degenerated rat retina. *J. Neurosci. Res.* 8:631-642

SCHMIDT, S. Y. (1978) Taurine fluxes in isolated cat and rat retinas: effects of illumination. *Exp. Eye Res.* 26:529-537

SCHMIDT, S. Y. (1981) Taurine in retinas of taurine-deficient cats and RCS rats. En: *The effects of taurine on excitable tissues* (S. I. Baskin y S. E. Schaeffer, eds.) Spectrum Press, New York, pp. 175-185

SCHMIDT, S. Y., BERSON, E. L. y HAYES, K. C. (1976) Retinal degeneration in cats fed casein. I. Taurine deficiency. *Invest. Ophthalmol.* 15:47-52

SCHMIDT, S. Y., BERSON, E. L., WATSON, G. y HUANG, C. (1977) Retinal degeneration in cats fed casein. III. Taurine deficiency and ERG amplitudes. *Invest. Ophthalmol, Vis. Sci.* 16:673-678

SGARAGLI, G. P. y PAVAN, F. (1972) Effects of aminoacids compounds injected

into cerebrospinal fluid spaces on colonic temperature, arterial blood pressure and behaviour of the rat. *Neuropharmacology* 11:45-46

SHAFFER, J.E. & KOCSIS, J.J. (1981) Taurine mobilizing effects on beta alanine and other inhibitors of taurine transport. *Life Sci.* 28:2727-2736

SPAETH, D.G. & SCHNEIDER, D.L. (1974) Turnover of taurine in rat tissues. *J. Nutr.* 104:179-186

SPECTOR, A.A. (1975) Fatty acid binding to plasma albumin. *J. Lipid Res* 16:165-173

STARR, M.S. & VOADEN, M.J. (1973) The uptake, metabolism and release of ¹⁴C-taurine by rat retina in vitro. *Vision Res.* 12:1261-1269

STURMAN, J.A. (1973) Taurine pool sizes in the rat: effects of vitamin B6 deficiency and high taurine diet. *J. Nutr.* 103:1566-1580

STURMAN, J.A. (1979) Taurine in the developing rabbit visual system: changes in concentration and axonal transport including a comparison with axonally transported proteins. *J. Neurobiol.* 10:221-237

STURMAN, J.A., RASSIN, D.K., HAYES, K.C. & GAULL, G.E. (1978) Taurine deficiency in the kitten: exchange and turnover of ³⁵S-taurine in brain, retina and other tissues. *J. Nutr.* 108:1462-1476

STURMAN, J.A., WEN, G.Y., WISNIEWSKY, H.M., NIEMANN, W.H. & HAYES, K.C. (1982) Taurine and tapetum structure. *En: Taurine in nutrition and neurology* (R.J. Huxtable & H. Pasantes-Morales, eds.) Plenum Press, New York, pp. 65-78

STURMAN, J.A., WEN, G.Y., WISNIEWSKY, H.M. & NEURINGER, M.D. (1984) Retinal degeneration in primates raised on a synthetic human infant formula. *Int. J. Devl. Neuroscience* 2:121-129

SUMIZU, K. (1962) Oxidation of hypotaurine in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 63:210-212

SYKES, S.M., ROBINSON, G.W., WAXLER, M. & KUWABARA, T. (1981) Damage to the monkey retina by broad spectrum fluorescent light. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20:425-428

TIEDEMANN, F. & GMELIN, L. (1827) Einige neue Bestandtheile der Galle de Ochsen. *Ann. Physik. Chem.* 9:326-337

TOKUNAGA, H., YONEDA, Y. & KURIYAMA, K. (1983) Streptozotocin-induced elevation of pancreatic taurine content and suppressive effect of taurine on insulin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 87:237-243

TROEGER, M.B., RAFALOWSKA, V. & ERECINSKA, M. (1984) Effect of oleate on neurotransmitter transport and other plasma membranes functions in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 42:1735-1742

- TRUSBY, M.H. & NEVIS, A.H. (1974) Anticonvulsant activity of taurine in electrically and osmotically induced seizures in mice and rats. *Fed. Proc.* 33:1494-1498
- VAN GELDER, N.M. (1972) Antagonism by taurine of cobalt induced epilepsy in cat and mouse. *Brain Res.* 47:157-168
- VAN GELDER, N.M. (1983) A central mechanism of action for taurine: osmoregulation, bivalent cations and excitation threshold. *Neurochem. Res.* 8:687-699
- VISLIE, T. (1983) Cell volume regulation in fish heart ventricles with special reference to taurine. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A:507-514
- VOADEN, M.J., LAKE, N., MARSHALL, J. & MORJARIA, B. (1977) Studies on the distribution of taurine and other neuroactive amino acids in the retina. *Exp. Eye Res.* 25:249-257
- VOADEN, M.J., DRAENDN, A.C.I., MARSHALL, J. & LAKE, N. (1981) Taurine in the retina. In: *The effects of taurine on excitable tissues* (S.I. Baskin & S.E. Schaffer, eds.) Spectrum Press, New York, pp.145-160
- WELTY, J.D. & READ, W.D. (1964) Studies on some cardiac effects of taurine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 144:110-115
- WEN, G.Y., STURMAN, J.A., WISNIEWSKY, H.M., LIDSKY, A.A., CORNWELL, A.C. & HAYES, K.C. (1979) Tapetum desorganization in taurine-depleted cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18:1200-1206
- WIEGAND, R.D., GIUSTO, N.M., RAPP, L.M. & ANDERSON, R.E. (1983) Evidence of rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 10:1433-1435
- WILLMORE, L.J. & RUBIN, J.J. (1982) Formation of malonaldehyde and focal edema induced by subpial injection of FeCl₂ into rat isocortex. *Brain Res.* 246:113-119
- WRIGHT, C.E., SCHWEITZER, L., GILLAM, B., TALLAN, H.H. & GAULL, G.E. (1984) Taurine promotes growth of human B lymphoblastoid cells. *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.*
- YATES, R.A. & KEEN, P. (1974) The distribution of the amino acids in subdivisions of rat and frog retinas obtained by a new technique. *Brain Res.* 107:117-122
- YOREK, M.A., STROM, D.K. & SPECTOR, A.A. (1984) Effect of membrane polyunsaturation on carrier-mediated transport in cultured retinoblastoma cells: alterations in taurine uptake. *J. Neurochem.* 42:254-261