

Mecanismos implicados en la potenciación sináptica inducida por la coaplicación de cafeína y taurina

TESIS DOCTORAL

ITZIAR IGARTUA PASCUAL

Madrid, 2015

José María Solís Torralba, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador principal del Departamento de Neurobiología en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación sanitaria (IRYCIS).

Certifica que **Iciar Igartua Pascual**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

Mecanismos implicados en la potenciación sináptica inducida por la coaplicación de cafeína y taurina.

Y considerando que el trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid a 21 de septiembre de 2015.

Fdo. Dr. José María Solís Torralba
Director de Tesis

“No vemos las cosas tal como son sino tal y como somos” El Talmud

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. José M^a Solís, por darme la oportunidad de hacer esta tesis, por dirigirla con paciencia y cariño, por creer en mí. Por toda su dedicación ya que gracias a ella me ha hecho crecer y madurar como científica y como persona. Gracias por soportar mis “paranoias” en el Lab. Sin tu apoyo no habría sido posible.

A Julián, por tu gran sonrisa y paciencia eternas.

Gracias al Dr. Rafael Martín del Río y al Dr. Luis Guerra, ellos me ayudaron aceptándome y facilitándome hacer la tesis en el departamento de Neurofisiología.

Gracias al Dr. Miguel Garzón por su ayuda y consejo.

Gracias a mis compañeros y compañeras de laboratorio ya doctores, que me han acompañado en este viaje que ha sido la tesis: A Lula porque además de ser una sabia compañera es una gran amiga.

Gracias Jose Antonio por esas tardes acompañadas de naranjas; a Paco y a Jose Carlos, por las risas entre trenes.

A mis compañeros y amigos Rafa e Irene, gracias por todos esos ánimos...os hecho de menos.

A Jose, a M^a José y a Águeda porque gracias a vuestra ayuda técnica esto ha salido adelante.

A tod@s los que a lo largo de este tiempo me han ayudado, apoyado y animado: Lili, Toni, Lali, Silvia, M^a José, Diana; porque me he sentido acompañada y arropada durante estos años de esfuerzo.

A todos mis compañeros del pasillo de Bioquímica y de Neurobiología, por esas cañas y seminarios al final de la larga jornada del viernes.

Gracias al Hospital Universitario Ramón y Cajal por ser lugar de oportunidades además de trabajo. Me ha hecho crecer como profesional y también como persona; no podría haber compaginado en ningún otro sitio dos vidas tan diferentes. A Manuel Cuerva por todos sus apoyos y por facilitarme el tiempo suficiente para hacer todos los trámites. A María, a Raquel y todas esas compañeras que me han dado ánimos a lo largo de todos estos años.

Gracias a mi familia, en especial a mi padre y a mi madre, ya que ellos me han hecho como soy, gracias a las oportunidades que me han dado en la vida esto ha sido posible.

Gracias a mi compañero de vida y pareja, Goio, ya que a pesar de pasar largas tardes esperando a que llegara del lab, siempre me apoyó en este proyecto. Creíste en mi capacidad para llevarlo a cabo, y con paciencia y cariño me empujaste hasta el final: sin ti no podría haber llegado hasta aquí.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Taurina	3
1.1.1. Metabolismo de la taurina	4
1.1.1.1. Síntesis de la taurina.....	4
1.1.1.2. Degradación de la taurina.....	6
1.1.2. Receptores de taurina	7
1.1.2.1. Interacciones de la taurina con los receptores de glicina.....	7
1.1.2.2. Interacciones de la taurina con los receptores de GABA.....	8
1.1.2.3. Interacción de la taurina con los receptores de NMDA.....	10
1.1.3. Transportadores de taurina	11
1.1.3.1. Sistemas de transporte de alta afinidad y baja capacidad.....	11
1.1.3.2. Sistema saturable de baja afinidad y alta capacidad.....	12
1.1.3.3. Transporte difusional a favor de gradiente.....	12
1.1.4. Liberación de taurina	12
1.1.5. Localización	13
1.1.6. Funciones de la taurina	14
1.1.6.1. Osmorregulador y osmoefector.....	14
1.1.6.2. Regulación de la homeostasis del calcio.....	15
1.1.6.3. Antioxidante.....	15
1.1.6.4. Papel de la taurina en la plasticidad sináptica.....	16
1.1.7. Papel fisiológico y relevancia clínica de la taurina	18
1.1.7.1. Taurina y diabetes.....	18
1.1.7.2. Inmunomodulador.....	18
1.1.7.3. Formación de sales biliares y arteriosclerosis.....	19
1.1.7.4. Hepatoprotector.....	20
1.1.7.5. Neuroprotector.....	20
1.1.7.6. Durante el desarrollo.....	22
1.2. Cafeína	23
1.2.1. Características generales de la cafeína	23
1.2.1.1. Estructura química de la cafeína.....	23
1.2.1.2. Consumo y metabolismo.....	24
1.2.2. Acciones de la cafeína en el sistema nervioso	25
1.2.2.1. Efectos provocados por altas concentraciones de cafeína.....	25
1.2.2.2. Efectos sobre los receptores de adenosina.....	26

1.2.3. Efectos de la cafeína sobre la neurotransmisión.....	29
1.2.4. Efectos de la cafeína sobre la plasticidad sináptica.....	30
1.2.5. Relevancia clínica de la cafeína.....	31
1.2.5.1. En la enfermedad de Alzheimer.....	31
1.2.5.1. En la enfermedad de Parkinson.....	33
1.3. Las bebidas energéticas.....	34
1.3.1. Bebidas energéticas y alcohol.....	34
1.3.2. Bebidas energéticas y enfermedades psiquiátricas.....	35
1.3.3. Efectos sobre la función cognitiva y estado de ánimo.....	36
1.3.4. Bebidas energéticas y epilepsia.....	37
1.3.5. Consumo durante el ejercicio.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. Obtención de las rodajas de hipocampo.....	42
3.2. Cámara de mantenimiento.....	43
3.3. Cámara de registro.....	45
3.4. Disoluciones de perfusión.....	46
3.5. Registros electrofisiológicos.....	50
3.5.1. Estimulación eléctrica.....	51
3.5.2. Registro de potenciales extracelulares.....	52
3.5.3. Registro de potenciales intracelulares.....	53
3.5.4. Procesamiento de los registros electrofisiológicos.....	54
3.5.4.1. Registros Extracelulares.....	54
3.5.4.2. Registros Intracelulares.....	54
3.5.5. Diseño experimental.....	55
3.6. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	55
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Efecto de la aplicación conjunta de taurina y cafeína sobre la transmisión sináptica.....	58
4.1.1. Análisis de los cambios presinápticos inducidos por la perfusión de taurina y cafeína.....	64
4.1.2. La aplicación de taurina y cafeína también produce un aumento duradero del EPSP registrado intracelularmente.....	68

4.2. La potenciación inducida por la aplicación de taurina y cafeína es imitada y ocluída por los inhibidores de los receptores de adenosina A ₁ y A _{2A}	70
4.2.1. La aplicación de un agonista para los receptores de adenosina de tipo A _{2A} junto con taurina produce un aumento duradero del fEPSP.....	76
4.3. La potenciación inducida por taurina y cafeína requiere actividad sináptica.....	78
4.4. La potenciación sináptica inducida por la aplicación de taurina y cafeína depende de la activación de receptores de ATP.....	84
4.5. La potenciación inducida por taurina y cafeína es inhibida por antagonistas de los receptores GABA _B	93
4.5.1. Los antagonistas CGP55845 y CGP54626 son equipotentes inhibiendo la respuesta GABA _B inducida por baclofeno en registros intracelulares.....	99
4.5.2. La aplicación conjunta de agonistas GABA _B y cafeína no presentan un efecto sinérgico sobre la transmisión sináptica.....	102
4.5.3. La potenciación inducida por taurina y un agonista de los receptores A _{2A} también requiere la activación de receptores GABA _B	105
4.6. Cadenas de señalización intracelular implicadas en la potenciación sináptica inducida por taurina y cafeína.....	107
5. DISCUSIÓN.....	112
5.1. Mecanismo por el que la cafeína potencia la transmisión sináptica.....	114
5.2. Efecto sinérgico de la cafeína y la taurina sobre la transmisión sináptica.....	115
5.3. Papel de los receptores de adenosina A _{2A}	119
5.4. Papel de la taurina en la LTP inducida por cafeína y taurina.....	120
5.5. Mecanismos de la señalización intracelular.....	122
5.6. Relevancia fisiológica y farmacológica.....	125
6. CONCLUSIONES.....	128
7. BIBLIOGRAFÍA.....	130

ABREVIATURAS

A₁	Receptor de adenosina de tipo 1
A₂	Receptor de adenosina de tipo 2
A₃	Receptor de adenosina de tipo 3
AMPA	α-3-amino-3- hiroxi-5-metilsoxazolil-4-propionico
ADO	Cisteamina (2-aminoetanotiol) dioxigenasa
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
APP	Precursor de la proteína b amiloide
ATP	Adenosín trifosfato
CA	Cuerno de Amón
CAF	Cafeína
CAMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina Proteína Kinasa
CDO	Cisteín Dioxigenasa
CREB	Elemento de respuesta AMPc
CSAD	Cisteín sulfónico descarboxilasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
EEM	Valor estándar de la media
EGTA	Ácido N,N,N',N' tetracético
fEPSP	Potencial postsináptico excitatorio de campo
FV	Potencial de fibra poblacional
GABA	Ácido-g-aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
5-HT3	Receptores ionotrópicos de 5-hidroxitriptamina
IP3	Inositol trifosfato
KO	Knock-out
KRB	Krebs-Ringer bicarbonato
LD	Dosis letal
LGICs	Canales iónicos activados por ligando
LLP-TAU	Potenciación sináptica de larga duración inducida por taurina
L-LTP	Potenciación sináptica de larga duración
LVACC	Canales de calcio de bajo umbral
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahydropiridina
nAChR	Receptores de acetilcolina de tipo nicotínico
NMDA	Ácido N-metil D-aspártico
P2X	Receptor Purinérgico ionotrópico de ATP
P2Y	Receptor Purinérgico metabotrópico de ATP
PanK	Pantotenato kinasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa dependiente de calcio
PLC	Fosfolipasa C
PPF	Protocolo de facilitación por pares de pulsos
Rin	Resistencia de entrada

ROS	Proto-oncogén-proteína tirosina quinasa
SNC	Sistema nervioso central
TAU	Taurina
TauCl	Taurina cloroamina
TAUT	Transportador de taurina
TNF-a	Factor de necrosis tumoral
TUDCA	Ácido tauroursodesoxicólico
V_m	Potencial de membrana
VRAC	Canal aniónico regulado por volumen
VSCC	Canales de calcio voltaje dependientes

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las llamadas “bebidas energéticas” son bebidas que pretenden estimular física y mentalmente mediante el uso de una combinación de cafeína (el ingrediente principal), y otros ingredientes como la taurina (*Reissig y cols., 2009*). Desde la introducción de Red Bull® en Austria en 1987 y en los Estados Unidos en 1997, el mercado de dichas bebidas ha crecido exponencialmente (*Heckman y cols., 2010*). Cientos de marcas diferentes son comercializadas con contenidos en cafeína que van desde los 50 mgr (una cantidad modesta) hasta los alarmantes 505 mgr por envase (*Reissig y cols., 2009*). La falta de regulación por parte de las autoridades sanitarias de todo el mundo, especialmente en Estados Unidos, ha dado lugar a una campaña agresiva de publicidad dirigida inicialmente a los más jóvenes, dada su prevalencia de uso entre los estudiantes del 39% al 57% (*Jensen y cols., 2012*). Según los fabricantes, estas bebidas tienen un efecto revitalizador y desintoxicante así como propiedades que incrementan las capacidades físicas y potencian la agilidad mental, publicitando su consumo en el mercado como beneficioso por aumentar aspectos psicomotores como la concentración y el tiempo de reacción y elevando los niveles de vigilia subjetiva (Website Red bull®).

Sin embargo, ha habido un creciente número de casos por intoxicación debido a la ingestión de bebidas energéticas. En niños y adolescentes no es habitual la ingestión de cafeína, y su sensibilidad a ella u otros componentes puede ser mucho mayor debido a la ausencia de tolerancia farmacológica. Existen también factores genéticos que pueden contribuir a una vulnerabilidad individual. Esto, unido al uso combinado de estas bebidas con alcohol u otras sustancias estupefacientes, puede contribuir a incrementar el daño producido por dichas sustancias (*Kendler y Prescott, 1999; Cornelis y cols., 2007*).

INTRODUCCIÓN

Además de cafeína, estas bebidas contienen una importante cantidad de taurina, un aminoácido muy abundante en cerebro; donde desempeña múltiples funciones. Otras sustancias presentes son glucoronolactona, riboflavina, piridoxal fosfato, nicotinamida, otras vitaminas del grupo B, y otros compuestos de origen vegetal (*Aranda y Morlock, 2006*).

Los efectos agudos y a largo plazo de estos compuestos combinados no han sido debidamente estudiados; por ello varios países han intentado regular su venta, distribución, etiquetado y cantidad de cafeína y taurina en su composición, hasta tener garantías sanitarias sobre el efecto de estas bebidas sobre la salud. Esto llevó a países como Francia a prohibir su consumo durante 12 años al no poder asegurar la seguridad del uso de la taurina como alimento. En el 2008 volvió a la venta al público bajo la normativa de la Unión Europea, que requiere solamente que en el etiquetado figure “alto contenido en cafeína”. Sin embargo, en otros países, el etiquetado indica normas de uso como “no debe ser mezclado con alcohol”, el máximo de latas al día o solo se permite su venta en farmacias (*Reissig y cols., 2009*).

1.1. Taurina

La taurina es un aminoácido zwitterónico (fig.1.1), con estructura β en vez de α (*Huxtable, 1992*), que difiere del resto por tener un grupo sulfónico en vez de un grupo carboxílico, lo que le confiere mayor acidez y por lo tanto dificulta su difusión a través de membranas, comparando con otros aminoácidos. La taurina está más concentrada intracelularmente existiendo un gradiente en torno a 500:1 en las células nerviosas.

INTRODUCCIÓN

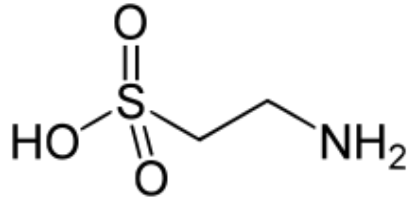


Figura 1.1 Estructura de la taurina

1.1.1. Metabolismo de la taurina

El contenido de taurina en mamíferos puede provenir de la dieta o de la síntesis a partir de la cisteína. Mientras en los herbívoros la taurina deriva de esta vía biosintética, en los carnívoros como los gatos requieren ingerirla en su totalidad a través de la dieta (*Huxtable, 1992*) y los omnívoros una parte la sintetizan y otra proviene de la dieta en una proporción variable, siendo necesaria la que proviene de la dieta para mantener constantes los niveles tisulares de taurina (*Sturman, 1993*).

1.1.1.1. Síntesis de la taurina

La mayor ruta para la biosíntesis de taurina es la procedente de los aminoácidos metionina y serina, cuyo catabolismo da lugar a cisteína (Fig. 1.1). Otras rutas que pueden dar lugar a cisteína (aminoácido esencial en la biosíntesis de taurina) son el glutatión y otras proteínas (*Peck y Awapara, 1967*).

La actividad de la cisteína ácido sulfínico descarboxilasa (CSAD: EC:4.1.1.29) y de la cisteína dioxigenasa (CDO) es alta en el hígado si la comparamos con el riñón y el cerebro (*Stipanuk, 2004*).

Una de las enzimas clave en la formación de la taurina, la cisteína dioxigenasa, (CDO; EC:1.13.11.20), está muy regulada por el metabolismo y su actividad responde a la dieta, aumentando tanto su concentración (hasta 45 veces) como su eficiencia catalítica (hasta 10 veces) en tejido adiposo o en el hígado (*Stipanuk, 2004; Stipanuk y cols., 2009*). La CDO fue clonada e identificada inicialmente en el

INTRODUCCIÓN

hígado (*Reymond y cols., 1996*), y más tarde fue hallada en el riñón así como en el cerebro, donde fue localizada en la glía. Los niveles de CDO son muy bajos en gatos, así como en humanos y otros primates.

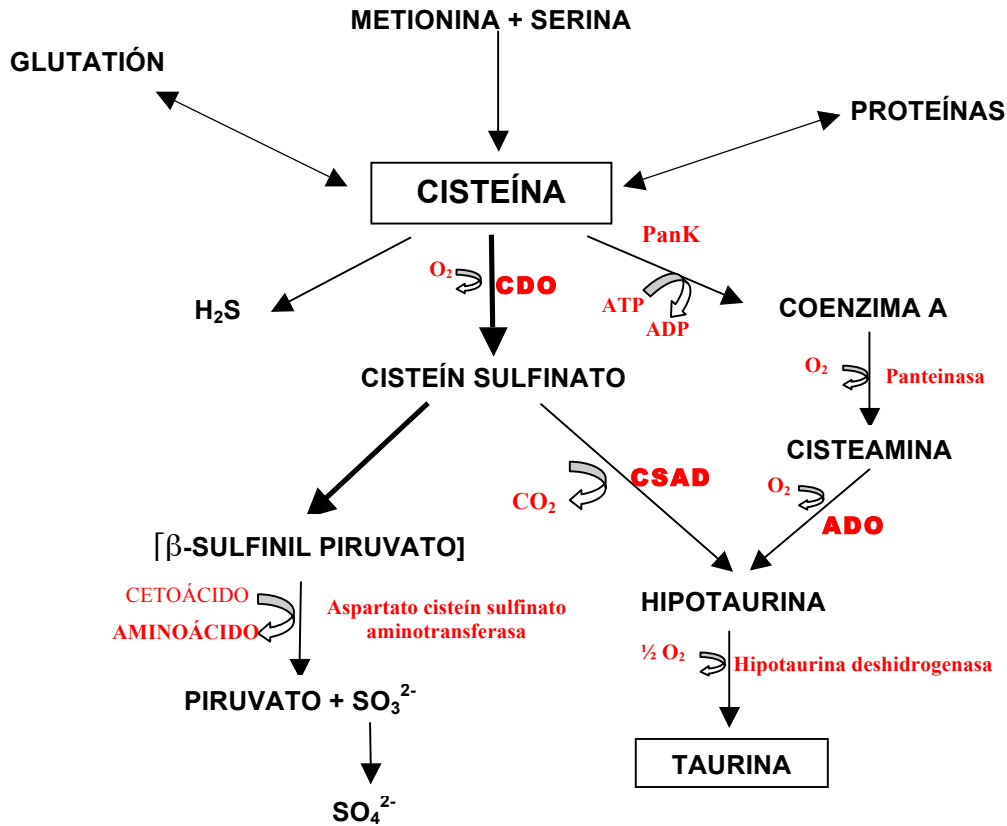


Figura 1.2. Esquema de la ruta de la biosíntesis de la taurina. La ruta biosintética dependiente de la CDO se da preferentemente en el hígado, mientras que la regulada por la ADO se da en cerebro.

La otra enzima involucrada en la ruta biosintética de la taurina es la CSAD (*Tappaz y cols., 1992*). Es la enzima limitante en la síntesis de taurina (*De la Rosa y Stipanuk, 1985*). De los tejidos analizados, solo los hepatocitos tienen una alta capacidad para la síntesis de taurina por esta vía (*Stipanuk, 2004*).

La conversión de hipotaurina a taurina es catalizada por la hipotaurina deshidrogenasa (EC.1.8.1.3). Es una enzima poco activa y la oxidación de hipotaurina a taurina puede ocurrir de manera no enzimática (*Bagley y Stipanuk, 1994*).

INTRODUCCIÓN

Una segunda ruta metabólica derivada de la cisteína puede dar lugar a acetil coenzima A (CoA). El catabolismo del CoA da lugar a cisteamina, la cual a través de la enzima clave de esta ruta, la cisteamina (2-aminoetanotiol) dioxigenasa (ADO; EC: 1.13.11.19) produce hipotaurina. La actividad de la ADO es alta en el cerebro (*Stipanuk, 2004*). Aunque el recambio de la CoA en el cerebro no es muy conocido y representa una ruta muy costosa para producir taurina, hay evidencias de que la síntesis de taurina mediante esta vía es significativa en el sistema nervioso central y en otros tejidos que expresan niveles muy bajos de CDO (*Dominy y Stipanuk, 2004*).

La síntesis de taurina en el cerebro parece requerir la cooperación metabólica entre astrocitos y neuronas (*Dominy y Stipanuk., 2004*). En los cultivos de astrocitos se ha comprobado que, aunque la vía de conversión de cisteína a taurina permanece intacta, acumulan hipotaurina (*Vitvitsky y cols., 2011*), cosa que no ocurre cuando co-cultivaron con neuronas, donde disminuye la hipotaurina y aumenta la taurina (*Vitvitsky y cols., 2011*).

1.1.1.2. Degradación de la taurina

La taurina es un aminoácido inerte, que no forma parte de las proteínas ni es utilizado en procesos metabólicos, por lo que aparte de su conjugación con sales biliares, para ser excretada en forma de taurocolatos, (*Huxtable, 1992*), no tiene funciones metabólicas conocidas (*Huxtable, 1992*). El contenido de taurina en la rata se recambia aproximadamente cada 15 días, y no hay mecanismos conocidos de degradación por lo que la mayor parte se excreta por el riñón sin modificación alguna (*Wright y cols., 1986*).

INTRODUCCIÓN

1.1.2. Receptores de taurina

Aunque se ha propuesto la existencia de receptores específicos de taurina en base a estudios de "binding" (*Wu y cols., 1987; Kontro y Oja, 1987*), esta no ha sido claramente demostrada. No obstante existen numerosas observaciones que demuestran que la taurina activa receptores GABA_A y de glicina en vertebrados.

Los receptores GABA_A y glicinérgicos tienen una estructura pentamérica, formando un canal activado por ligando, que permite el paso de iones cloruro a través de la membrana plasmática. La unión de la taurina a estos receptores aumenta la conductancia de cloruro (*Horikoshi y cols., 1988*), provocando una hiperpolarización en el potencial de membrana e inhibiendo la transmisión sináptica (*del Olmo y cols., 2000a, Sergeeva y Haas, 2001*).

1.1.2.1. Interacciones de la taurina con los receptores de glicina

La taurina activa preferentemente receptores de glicina sensibles a estriknina y su unión depende de las unidades que conforman el receptor de glicina.

Los receptores de glicina pertenecen al grupo I de los receptores ionotrópicos (LGICs), pertenecientes a la familia de receptores con el bucle Cys, en la que además están incluidos el receptor nicotínico (nAChR), el receptor tipo 3 de la serotonina (5-HT₃), y está estrechamente relacionado con los receptores GABA_A (*Betz y Laube, 2006*). Los receptores de glicina son proteínas heteropentaméricas, similares a los receptores nicotínicos del músculo esquelético (*Langosch y cols., 1988*). Su estequiometría se ha determinado como 2 α : 3 β (*Yang y cols., 2012*).

Se ha propuesto que la taurina es más afín a la subunidad α 2 (*De Saint Jan y cols., 2001*) o a la subunidad α 1 (*Schmieden y cols., 1992*), protegiendo la subunidad α 3 al receptor de la desensibilización por taurina (*Sergeeva y Hass, 2001*).

INTRODUCCIÓN

Parece que la taurina es el ligando endógeno de los receptores de glicina en muchas regiones del cerebro como en neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico (*Hussy y cols., 1997*), en las neuronas piramidales del hipocampo (*Mori y cols., 2002*) y en el neocórtex en desarrollo (*Flint y cols., 1998*).

Además se ha demostrado que concentraciones bajas o moderadas de taurina (entre 0,2 a 1 mM) activan los receptores de glicina en la amígdala basolateral (*McCool y Botting, 2000*), en el nucleus accumbens (*Jiang y cols., 2004*), y en el colículo inferior (*Xu y cols., 2004*), en el estriado (*Sergeeva y Haas, 2001*) y en sustancia nigra (*Inomata y cols., 1993*).

1.1.2.2. Interacciones de la taurina con los receptores de GABA

Se han identificado tres tipos de receptores de GABA, llamados GABA_A, GABA_B y GABAC. La taurina se puede unir tanto a los receptores GABA_A como GABA_B (*Krosggaard-Larsen and Falch, 1981; Kontro y Oja, 1990*), por lo que se ha sugerido que parte de la funcionalidad de la taurina en el sistema nervioso puede estar mediada a través de estos receptores.

El receptor GABA_A está constituido por 5 subunidades proteicas siendo la taurina más afín por los receptores que tienen la subunidad α_2 . La taurina es un agonista débil para los receptores GABA_A y se ha demostrado que su afinidad depende de la especie: vaca (IC₅₀= 2,2 μ M) (*Krosggaard-Larsen y Falch., 1981*); rata (IC₅₀= 50 μ M) (*Bureau y Olsen, 1991*); y conejo (IC₅₀= 300 μ M) (*Frosini y cols., 2003*).

En la zona del tálamo en ratón la taurina es un potente inhibidor de neuronas ventrobasales, a concentraciones fisiológicas (10-100 μ M) por activación de receptores GABA_A (*Jia y cols., 2008*). En esta región del cerebro los receptores GABA_A extrasinápticos tienen distintas propiedades farmacológicas que los receptores sinápticos, y han demostrado que la taurina es más potente en las

INTRODUCCIÓN

células con receptores GABA_A extrasinápticos con subunidades α, β, δ . En particular, la taurina es más selectiva para los receptores GABA_A que contienen la subunidad δ que para los que contienen las subunidades γ (Jia y cols., 2008).

Los receptores GABA_B son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G que se encuentran tanto en sinapsis excitadoras como inhibitoras en todas las regiones del cerebro (Ulrich y Bettler, 2007). El receptor es un heterodímero compuesto por dos subunidades B1 y B2. Cada subunidad tiene siete dominios transmembrana y se unen por su C-terminal para formar el receptor funcional. La activación de este heterodímero libera las subunidades G $\beta\gamma$ que inhibe canales de Ca²⁺ activados por voltaje (VSCCs) (Mintz y Bean; 1993) y activa canales de K⁺ (Gähwiler y Brown; 1985). La activación de receptores GABA_B también puede liberar subunidades G_i/G_o que inhiben la adenilato ciclasa, reduciendo los niveles de AMPC y disminuyendo la actividad de la PKA (Xu y Wojcik; 1986).

Del Olmo y cols. (2000a) demostraron, en la región CA1 del hipocampo, que la taurina solo activa receptores GABA_A localizados en la capa de somas; descartando la acción de la taurina sobre los receptores GABA_A situados en las dendritas.

La taurina no parece activar receptores GABA_B pre- o postsinápticos en el hipocampo (del Olmo y cols., 2000a) ni en el bulbo olfatorio (Puopolo y cols. 1998), aunque se han descrito efectos inhibitorios de taurina sobre la liberación de GABA, aspartato y glutamato en sinaptosomas a través de receptores GABA_B (Kamisaki y cols., 1996). También existen evidencias experimentales de la interacción de la taurina con los receptores GABA_B, como el desplazamiento del "binding" de baclofeno (un agonista GABA_B) por taurina en sinaptosomas de cerebro de ratón (Kontro y Oja, 1990) o la inhibición por taurina de los potenciales excitadores en

INTRODUCCIÓN

neuronas mitrales por un proceso inhibido por antagonistas GABA_B (Chaput y cols., 2004).

1.1.2.3. Interacción de la taurina con los receptores NMDA

Los receptores NMDA son complejos heteroméricos formados por 3 tipos de subunidades: NR1, con 8 variantes posibles de procesamiento; NR2, con 4 subtipos diferentes (A-D); y NR3 (A-B). Los receptores NMDA funcionales están formados por una subunidad NR1 y una o más subunidades NR2 (Cull-Candy y cols., 2001). Además pueden contener subunidades NR3 (Perez-Otano y cols., 2001).

Los receptores NMDA dependen de la unión de dos ligandos (glutamato y glicina) y del voltaje. La despolarización de la membrana es necesaria para liberar el canal formado por el receptor NMDA del bloqueo que ejerce el Mg²⁺ en condiciones de membrana en reposo.

El receptor NMDA está formado con mayor frecuencia por las subunidades NR1 con NR2A o NR2B (Tovar y Westbrook, 1999; Sans y cols., 2003).

La taurina no parece activar el lugar de unión de glicina en el receptor NMDA, aunque Suárez y Solís (2006) han presentado evidencias experimentales de la existencia de receptores NMDA que controlan la excitabilidad del axón y que son modulados por taurina. Estos autores también proponen que los lugares de unión de la taurina y de la glicina en el receptor NMDA presináptico tiene una interacción alostérica negativa. Los diferentes efectos de la taurina y la glicina sobre los receptores pre- y postsinápticos podría deberse a una combinación no canónica de subunidades.

La concentración de taurina necesaria para modular al receptor NMDA presináptico sería de EC₅₀=19 μM; estando dentro del rango fisiológico de las concentraciones extracelulares de este aminoácido estimado por otros autores (Lerma y cols., 1986).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, se ha visto que la activación de los receptores de NMDA produce una liberación osmorresistente de taurina (*Menéndez y cols., 1990; Tranberg y cols., 2004*) que puede llegar a incrementar la concentración de taurina extracelular hasta 6 veces. La vía por la que la taurina es liberada, inducida por la activación del receptor NMDA, parece ser dependiente de canales de cloruro activados por calcio (*Tranberg y cols., 2004*).

1.1.3. Transportadores de taurina

El contenido de taurina de muchas células parece estar determinado por la presencia de transportadores específicos en la membrana plasmática. Se conocen tres sistemas de transporte de taurina:

1.1.3.1. Sistema de transporte de alta afinidad y baja capacidad. Es dependiente de sodio y cloro y está presente tanto en el cerebro en desarrollo como en el adulto. Han sido clonados en rata y ratón dos transportadores de taurina con esas características: TAUT-1 en rata con una K_m de 40 μM (*Smith y cols., 1992*) y TAUT-2 en ratón, que transportan tanto taurina como β -Alanina, con una K_m de 4,5 μM (*Liu y cols., 1992*).

Ambos transportadores presentan una homología alta con los transportadores de glicina y de GABA, con 12 dominios transmembrana y varios sitios susceptibles de fosforilación y N-glicosilación (*Liu y cols., 1992; Smith y cols., 1992; Han y cols., 2006*).

En la mayoría de las regiones es predominante la forma TAU-2 (expresada en casi todos los astrocitos), excepto en el córtex cerebral y cerebelo donde sus niveles de expresión son bajos. En cambio, TAUT-1 se expresa casi únicamente en ciertas áreas como retina, pituitaria y cerebelo.

INTRODUCCIÓN

En el hipocampo, el TAUT-1 apenas está presente, mientras que algunos somas y dendritas de la región CA1 y en menor medida del giro dentado, parecen ser muy inmunoreactivos a TAUT-2 (Pow y cols., 2002). Tanto TAUT1 como TAUT2 son sensibles al pH y a la temperatura (Huxtable, 1989; Han y cols., 2006). Actúan contra gradiente, por lo que van acoplados al co-transporte de Na^+ (Huxtable 1989), y es dependiente de la presencia de Cl^- , aunque no de su gradiente (Liu y cols., 1992; Smith y cols., 1992).

1.1.3.2. Sistema saturable de baja afinidad y alta capacidad

No se ha identificado ninguna entidad molecular que medie este transporte. El sistema de baja afinidad para taurina identificado en células aisladas de retina de bovino, tiene una K_m de $507\mu\text{M}$ (Kundaiker y cols., 1996). Los sistemas de baja afinidad trabajan con concentraciones altas de taurina (Lambert y Hoffman, 1993). En algunas especies como la rana solo existe el sistema de transporte de taurina de baja afinidad (Lake y cols., 1977).

1.1.3.3. Transporte difusional a favor de gradiente de concentración

Es posible que estos mecanismos difusionales sean los que están implicados en los movimientos rápidos de taurina durante la regulación del volumen celular. Se han propuesto algunas rutas como un canal aniónico regulado por volumen (VRAC) (Schousboe y cols., 1991; Franco y cols., 2001), a través de un sistema similar al de la banda 3 del eritrocito (Goldstein y Brill, 1991; Martin del Rio y Solís, 1998) o de hemicanales de conexinas (Stridh y cols., 2008).

1.1.4. Liberación de taurina

La taurina es liberada principalmente durante procesos de regulación del volumen celular, ya sean provocados por condiciones isotónicas (p.ej. elevación de potasio), (Solís y cols., 1986; Pasantes-Morales y Schousboe, 1989), anisotónicas

INTRODUCCIÓN

(p.ej. medios hipotónicos) (*Pasantes-Morales y Schousboe 1988; Solís y cols., 1988*) o la activación de algunos receptores de glutamato (*Lehmann y cols., 1983; Menéndez y cols., 1990*).

Aunque la taurina está presente en las terminales sinápticas (*Kontro y cols., 1980; Ottersen y cols., 1988*), no parece ser liberada por un proceso de exocitosis ya que no depende de la presencia de calcio extracelular (*Hanretta y Lombardini 1986; Tuz y cols., 2004; Rodríguez-Navarro y cols., 2009*).

1.1.5. Localización

Las concentraciones de taurina en mamíferos son del orden de micromolar. Aunque la biosíntesis de taurina se realiza principalmente en el hígado, es en el corazón donde se encuentran las mayores concentraciones (60% del total del organismo). También son altas en plaquetas, tejidos excitables y estructuras secretoras (más de 60 μ moles / g de peso), siendo especialmente llamativas las que alcanza en el sistema nervioso central donde es el aminoácido libre más abundante durante el desarrollo y el segundo más concentrado, tras el glutamato, en la edad adulta (*Huxtable, 1992*).

En el líquido cefalorraquídeo, en el espacio extracelular y en el plasma, la concentración es mucho más baja (10–100 μ M) (*Huxtable, 1992*).

Todas las regiones del cerebro que han sido analizadas contienen y captan taurina del medio. Tejidos como la retina o la glándula pineal presentan concentraciones muy altas (más de 70 mM) (*Huxtable, 1992*). Otras regiones del sistema nervioso central como el cerebelo, el córtex cerebral, la médula, el hipocampo o bulbo olfatorio contienen cantidades superiores a 60 nmoles/mgr. de proteína (*Palkovits y cols., 1986*).

INTRODUCCIÓN

En el hipocampo, tanto las neuronas como las células gliales muestran un radiomarcaje intenso (*Clements y cols., 1989*); sobre todo en la región CA1 y en menor concentración en la CA2 y en el giro dentado (*Pow y cols., 2002*), siendo muy bajas en la región CA3 (*Hörtnagl y cols., 1991*). Su localización es principalmente citoplasmática, aunque en algunas estructuras también se ha localizado en los núcleos y en las mitocondrias (*Terauchi, 1998; Lobo y cols., 2000*). La presencia de taurina no se corresponde exactamente con la localización del sistema de transporte de alta afinidad (*Pow y cols., 2002*), lo que podría indicar la existencia de otros sistemas de transporte de taurina diferentes a los clonados.

1.1.6. Funciones de la taurina

La taurina ha sido implicada en múltiples funciones en el cerebro de mamíferos. A continuación detallamos algunas de las más importantes.

1.1.6.1. Osmoregulador y osmoefector.

La taurina es el principal osmolito orgánico que interviene en el reajuste del volumen celular en el Sistema Nervioso Central (*Pasantes Morales y Schousboe, 1988; Solís y cols., 1988*). Sus propiedades biofísicas y bioquímicas hacen de la taurina un excelente osmolito, ya que al no tener carga neta ni función metabólica, su paso por la membrana plasmática no produce cambios en el potencial ni interfiere con el metabolismo celular.

Los cambios de volumen celular se pueden dar ante daños provocados por isquemia, hipoglucemia o excitotoxinas. Durante la regulación de volumen provocada por condiciones hipoosmóticas, los astrocitos llegan a liberar hasta un 64% de su taurina (*Hussy, 2002*).

En el cerebelo de gatos sometidos a condiciones hipoosmóticas se ha observado que existe una redistribución de taurina entre los compartimentos neuronales y

INTRODUCCIÓN

gliales (*Nagelhus y cols., 1993*). Por otra parte la taurina liberada desde los astrocitos en respuesta a cambios de volumen puede activar receptores de glicina como se ha observado en las neuronas de la neurohipófisis, lo que provoca una liberación de vasopresina, una hormona que interviene en la regulación del volumen celular (*Hussy 2002*). Estos resultados han llevado a proponer que la taurina, aparte de su función osmorreguladora, es un osmoefector que interviene en la transmisión glía-neurona.

1.1.6.2. Regulación de la homeostasis del calcio

La taurina juega un papel importante en algunos de los procesos dependientes de calcio modulando las concentraciones intracelulares de calcio en diferentes tejidos (*Lombardini, 1983; El Edrissi y Trenkner 1999, Chen y cols., 2001*). La aplicación de taurina produce un incremento en el transporte de calcio de alta afinidad a través de canales de calcio dependientes de voltaje o a través del intercambiador de sodio-calcio (*Sebring y Huxtable, 1985; Satoh y Sperelakis, 1998*). En presencia de glutamato, la taurina es capaz de afectar a la concentración de calcio intracelular actuando negativamente sobre el intercambiador reversible de sodio-calcio (*Wu y Prentice., 2010*). La taurina también puede inhibir indirectamente la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares, y se ha sugerido que modula canales de calcio voltaje dependientes (VGCC) de tipo L, N, y P/Q y al intercambiador de sodio-calcio (*Satoh y Sperelakis, 1998; León y cols., 2009*).

1.1.6.3. Antioxidante

La taurina ha sido propuesta como antioxidante desde hace tiempo, pudiendo tener un papel adicional en la estabilización de la membrana (*Pasantés-Morales y Cruz, 1984; Wright y cols., 1986*). Aunque el grupo sulfonato de la taurina podría servir como agente reductor, en los mamíferos esta función no es posible porque carecen

INTRODUCCIÓN

de la maquinaria enzimática adecuada (Huxtable, 1992). Sin embargo, el grupo amino de la taurina se puede conjugar con el hipoclorito generado a partir de peróxido y cloruro para formar taurina cloroamina (TauCl), la cual es reducida intracelularmente a cloro y taurina (*Grisham y cols., 1984*). Esto hace que la taurina se encuentre en altas concentraciones en células sometidas a un alto estrés oxidativo como los neutrófilos (*Balkan y cols., 2001; Dawson y cols., 2002*), los cuales producen TauCl en condiciones de inflamación. La TauCl también inhibe la superproducción de O₂ disminuyendo así el estrés oxidativo adicional en las células situadas en las zonas de inflamación.

En el SNC, la taurina contrarresta la acumulación de radicales libres en condiciones de hiperamonemia (*Hilgier y cols., 2003*) e intoxicación por plomo (*Flora y cols., 2004; Yu y cols., 2007*).

1.1.6.4. Papel de la taurina en la plasticidad sináptica

En nuestro laboratorio se demostró por primera vez, en la CA1 del hipocampo, que la taurina (5-10mM) potenciaba el potencial de fibra poblacional (FV) y la eficacia sináptica glutamatérgica, por un mecanismo independiente de la activación de los receptores GABA_A y glicinérgicos (*Galarreta y cols., 1996*). Este fenómeno se denominó LLP-TAU y posteriormente fue también observado en las sinápsis corticoestriatal (*Chepkova y cols., 2002*). Dicha LLP-TAU depende del tiempo de exposición y de la concentración de taurina (*Galarreta y cols., 1996; Chepkova y cols., 2002*).

El aumento de la eficacia sináptica provocada por la taurina en el hipoampo no se ve afectada por antagonistas GABAérgicos (*Galarreta y cols., 1996*), aunque en estriado sí se inhibe en presencia de antagonistas de los receptores de glicina (*Chepkova y cols., 2002*).

INTRODUCCIÓN

Estudios posteriores revelaron que la potenciación inducida por la taurina requería su captación (*del Olmo y cols., 2004*), y de la activación de un sistema de transporte, siendo demostrada esta hipótesis confirmada en ratones nulos para TAUT en el estriado pero no en el hipocampo (*Sergeeva y cols., 2003*).

La potenciación provocada por taurina presenta muchas similitudes con la L-LTP inducida por la estimulación con varios trenes de alta frecuencia y se ocluyen mutuamente (*del Olmo y cols., 2000b*), lo que indica que comparten algunos mecanismos moleculares de inducción. Sin embargo la inducción de la LLP-TAU es independiente de la activación de los receptores NMDA (*Galarreta y cols., 1996*), que por otra parte son indispensables para la LTP inducida por trenes de estímulos. La entrada de calcio necesaria para la inducción de la LLP-TAU se realiza a través de canales de calcio de bajo umbral (LVACC) (*del Olmo y cols., 2000b*) y por la salida de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares al citosol (*del Olmo y cols., 2000b*). El aumento del calcio intracelular, de alguna manera, dispara varios mecanismos similares a los que se ponen en marcha para el mantenimiento de la L-LTP, tales como la activación de la PKA y la síntesis de proteínas de novo (*del Olmo y cols., 2003*). En nuestro laboratorio se describió que la L-LTP inducida por una estimulación sináptica con trenes de estímulos de alta frecuencia, era impedida en presencia de un inhibidor de la captación de taurina (*del Olmo y cols., 2004*). Además, la taurina puede facilitar la inducción de L-LTP (*Suárez y cols., 2014*). Estos resultados indican que la taurina es una pieza clave de los mecanismos requeridos para la L-LTP.

1.1.7. Papel fisiológico y relevancia clínica de la taurina

1.1.7.1. Taurina y diabetes

La diabetes mellitus de tipo 2, es la forma más común de la diabetes y su prevalencia está en constante crecimiento. La importancia de los aminoácidos, especialmente taurina, en el tratamiento de la diabetes mellitus ha sido muy estudiada (*Hansen, 2001; Franconi y cols., 2006*). En ratas con una dieta alta en fructosa, un modelo de resistencia a insulina característico de la diabetes tipo 2, el tratamiento con taurina reduce la resistencia a la insulina, la hiperglicemia, la hiperinsulinemia, la peroxidación de lípidos y la glicosilación de la hemoglobina (*Nandhimi y cols., 2004, Nandhimi y cols., 2005a; 2005b*). En experimentos con receptores de insulina humanos purificados, la taurina también parece potenciar los efectos de la unión de insulina a su receptor (*Kulakowski y Maturo, 1990*) pudiendo dar lugar a un mejor control metabólico. La taurina disminuye la hiperglucemia en animales diabéticos mejorando la secreción de insulina y la sensibilidad a ella (*Wu y cols., 2010*). Un suplemento nutricional de taurina en la etapa postnatal puede normalizar la reducción en volumen y vascularización del páncreas endocrino provocado por una dieta baja en proteínas durante el periodo fetal (*Boujendar y cols., 2003*).

1.1.7.2. Inmunomodulador

La taurina, en determinadas circunstancias, se une al cloruro para formar taurina cloroamina (TauCl) como comentamos anteriormente. La TauCl actúa como un microcida al transferir el cloruro a los grupos aminos de las bacterias, hongos y virus (*Gottardi y Nagl, 2010*).

La TauCl parece tener un potente efecto inmunomodulador (*Wojtecka-Lukasik, 2008*). En particular, la TauCl se ha demostrado que inhibe la producción de

INTRODUCCIÓN

mediadores proinflamatorios tanto en leucocitos humanos como en roedores. También inhibe la formación de TNF- α y lipopolisacáridos, que inducen la activación de los macrófagos y su producción de óxido nítrico (*Schuller-Levis y Park, 2004*); suprime la formación del anión superóxido (O_2^-), e inhibe el factor nuclear kappa β , un potente transductor de las citoquinas inflamatorias (*Kanayama y cols., 2002*). En células T que median la artritis reumatoide de origen autoinmune, se ha comprobado que la TauCl afecta la inducción de la respuesta inmune regulando la producción de mediadores inflamatorios tales como ROS (*Wojtecka-Lukasik y cols., 2005*).

1.1.7.3. Formación de sales biliares y arteriosclerosis

Una de las actividades biológicas mejor documentadas de la taurina es la formación de sales biliares, esenciales para la digestión intestinal y la absorción de lípidos. La taurina y la glicina se conjugan junto con los derivados del colesterol para formar taurocolato y glicolato en humanos. Como consecuencia, una disminución de taurina en humanos está asociada a una menor extracción del colesterol y su subsiguiente acumulación, incrementando así el riesgo de arteriosclerosis, una de las causas principales de mortalidad en las poblaciones adultas de las sociedades desarrolladas. Los efectos antiarterioscleróticos de la taurina han sido estudiados en diferentes modelos animales de hipercolesterolemia e hiperlipidemia, pero el mecanismo exacto no está del todo claro (*Matsushima y cols., 2003*). Los suplementos de taurina administrados en el agua de bebida reducen las grasas de alto peso molecular que inducen la acumulación arterial lipídica (*Murakami y cols., 2000*), facilitan la excreción biliar en la heces y aceleran la regresión de las lesiones inducidas por el colesterol dando lugar a una disminución de la probabilidad de daño (*Balkan y cols., 2002*).

1.1.7.4. Hepatoprotector

El papel de la taurina en el hígado ha sido estudiado en ratones “knockout” para el transportador de la taurina (taut -/-) (*Warskulat y cols., 2006*). Estos ratones taut -/- presentan hepatitis crónica y fibrosis así como una gran destrucción de hepatocitos y apoptosis, síntomas de la patología del hígado. La taurina también parece tener efectos protectores ayudando a mantener la integridad del tejido hepático en condiciones de daño químico (*Hagar, 2004*). En la quimioterapia anti-estrogénica contra el cáncer de mama que induce hepatotoxicidad, la taurina protege al hígado estabilizando los radicales libres (ROS) implicados en la peroxidación lipídica (*Tabassum y cols., 2006*).

1.1.7.5. Neuroprotección

Se ha propuesto a la taurina como una potencial herramienta terapéutica para tratar los desórdenes neurodegenerativo de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación del péptido β -amiloide en las neuronas y la acumulación de glutamato extracelular dando lugar a excitotoxicidad y a la muerte celular. La administración de taurina en ratas, activa receptores GABA_A (*Paula-Lima y cols., 2005*) y protege las neuronas corticales e hipocampales de la acumulación y toxicidad del péptido β -amilóide y de la acumulación extracelular de glutamato.

En pacientes con enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (*Alom y cols., 1991*), la concentración de taurina en el líquido cefalorraquídeo es menor que en los sujetos control (*Engelborghs y cols., 2003*) por lo que se estudió la suplementación con taurina para coadyuvar el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, otras investigaciones demuestran una interacción entre la taurina y la L- Dopa en el caso del Parkinson y con la proteína Tau en el caso del Alzheimer, aconsejándose hacer

INTRODUCCIÓN

más estudios antes de su uso en pacientes con estas enfermedades (Zhang y cols., 2015; Santa-María y cols., 2007).

Sin embargo, derivados de la taurina como el ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) o la Homotaurina (en fase II de estudio), han sido estudiados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y de la de Alzheimer; ya que el TUDCA aumenta la supervivencia en transplantes celulares de sustancia nigra en el caso del Parkinson y ambas sustancias disminuyen la agregación de la proteína β -amiloide en el caso del Alzheimer (Duan y cols., 2002; Solá y cols., 2003; Gervais y cols., 2007).

La enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1, un desorden fatal hereditario, se caracteriza por un defecto en el transporte del colesterol y por una neurodegeneración progresiva. En este modelo, la taurina es capaz de rescatar las neuronas de la apoptosis al inhibir la activación de la caspasa 9 (Huang y cols., 2006).

En el cerebro de humanos y animales con epilepsia han demostrado que las concentraciones de taurina están disminuidas (Van Gelder y cols., 1972; Wade y cols., 1987). Estos déficits parecen ser causados por el daño prolongado causado por las convulsiones y por la persistencia de un estado de hiperexcitabilidad en el cerebro.

Análogos de la taurina como la homotaurina, taltrimida, acamprosato y taumutina actúan como anticonvulsivantes y son usados en el tratamiento de la epilepsia humana (Gupta y cols., 2005).

Es interesante el papel que juega la taurina en el déficit cognitivo provocado por la intoxicación por plomo. La acumulación de este metal da lugar a una disminución de la actividad neuronal, a una disminución en el número de espinas dendríticas (Király y Jones, 1982) y a un bloqueo del receptor NMDA (Lasley y cols., 1999). Un

INTRODUCCIÓN

suplemento nutricional con taurina durante el embarazo protege de estos daños conocidos por la acumulación de plomo durante el desarrollo fetal (*Yu y cols., 2007*).

1.1.2.6. Durante el desarrollo

La taurina también parece participar en el desarrollo, ya que la deficiencia de taurina da lugar a fallos en la diferenciación celular durante la migración en el cerebelo, en hipocampo y en córtex visual en gatos y monos (*Sturman, 1993; Maar y cols., 1995*). Más aun, *Hernandez-Benitez y cols. (2012)* han demostrado que la taurina facilita el desarrollo neuronal no solo en el cerebro embrionario sino también en cultivos de cerebro de ratón adulto, donde en ciertas regiones del cerebro como la zona subventricular, la taurina activa las células madre y las células precursoras neuronales, para diferenciarse en neuronas en vez de en astrocitos (*Hernández-Benítez y cols., 2010*).

La concentración de taurina es máxima en la primera semana de vida postnatal coincidiendo con el periodo de sinaptogénesis (*Sturman, 1993*); pudiendo durante el desarrollo mimetizar parcialmente los efectos tróficos de GABA por un mecanismo mediado a través de sus receptores tipo B (*Behar y cols., 2001*).

Además se ha demostrado que la taurina es esencial para un desarrollo normal, como se ha visto en ratones “Knock-out” para TAU-T (*Heller-Stilb y cols., 2002*).

El hecho de que la taurina sea esencial durante el desarrollo ha llevado a incluir este aminoácido en las leches maternizadas para la nutrición infantil (*Wright y cols., 1986; Sturman y Chesney, 1995*).

1.2. Cafeína

La cafeína es una de las sustancias psicoactivas naturales más consumidas del mundo a través de productos de origen vegetal como el té o el café (*Daly y Fredholm, 1998*). Un ejemplo de la ingesta de cafeína procedente del consumo de café es Estados Unidos y Canadá donde ingieren más de 210 mg por persona y día.

El estudio de la cafeína dio lugar recientemente a “un modelo de droga de abuso (*Gilliand and Bullock, 1983*), por lo que se consideró añadirla a los manuales de diagnóstico (*Hughes y cols., 1998*).

Sin embargo, tanto la ingestión aguda como crónica de cafeína parece tener muy pocas y leves consecuencias sobre la salud. Por esta razón y porque pocos consumidores de cafeína refieren pérdida de control sobre su consumo, las agencias reguladoras de los países no han impuesto restricciones a su consumo, apareciendo tan solo clasificada como de tipo IV en *el Manual de Diagnóstico y Estadística de los Desórdenes Mentales*.

1.2.1. Características generales de la cafeína

1.2.1.1. Estructura Química de la cafeína

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) y la teofilina (1,3-dimetilxantina,) son las metilxantinas más conocidas sintetizadas por ciertas plantas a partir de su precursor purínico, la adenosina (*Fredholm y cols., 1999*). Estas metilxantinas actúan como antagonistas de los receptores de adenosina.

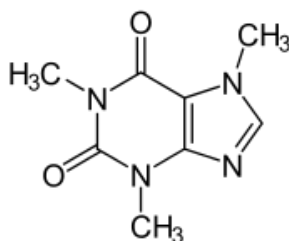


Figura 1.3. Estructura química de la cafeína

INTRODUCCIÓN

1.2.1.2. Consumo y metabolismo

Tanto en humanos como en animales de experimentación, tras 45 minutos de la ingestión de cafeína, se absorbe un 99% en el tracto gastrointestinal, (*Arnaud, 2011*). Sin embargo, su absorción no es tan completa cuando se ingiere en forma de café. Mientras que en ratas los efectos tóxicos aparecen con una Dosis Letal (LD) de 50 y 200 mgr / Kg, en pacientes que fueron hospitalizados por intoxicación aguda con cafeína se midieron unos pocos cientos de micromoles de cafeína en plasma. Las dosis alcanzadas en plasma que se encontraron tras la ingestión de una taza de café fue entre 0,4 y 2,5 mg / kg, estimándose así el pico de concentración de cafeína que se alcanza entre 1 y 10 μ M (*Fredholm y cols., 1999*). Mientras no hay diferencias en la vida media de la cafeína entre humanos adultos y jóvenes (2,5 a 4,5 h) (*Blanchard and Sawers, 1983*), la vida media de la cafeína se incrementa durante el período neonatal (23 horas en el recién nacido) debido a la baja actividad del citocromo P-450 y a la relativa inmadurez de algunas vías de desmetilación y acetilación (*Carrier y cols., 1988*).

Las propiedades hidrofóbicas de la cafeína le permiten su paso a través de las membranas biológicas, traspasando la barrera hemato-encefálica tanto en el estado fetal como en el adulto (*Fredholm y cols., 1999*). No hay tampoco barreras que impidan el paso de la cafeína a través de la placenta y se han detectado altas concentraciones en hijos prematuros de mujeres consumidoras de grandes cantidades de cafeína.

Algunos de los metabolitos de la cafeína como la 1,3- dimetilxantina (teofilina) y 1,7-dimetilxantina (paraxantina) también tienen actividad farmacológica. Estos componentes deben ser tenidos en cuenta cuando se valoren los efectos de las bebidas que contienen cafeína. En roedores, la paraxantina es el metabolito de la

INTRODUCCIÓN

cafeína más abundante en plasma, mientras que en humanos es la teofilina. Este primer paso metabólico representa entre el 72 y el 80% del metabolismo de la cafeína (*Arnaud, 2011*).

¿Qué concentraciones alcanza la cafeína en el cerebro? Una cantidad aproximada de 73 mg de cafeína por kilo y día en ratas dan lugar a una concentración de cafeína de unos 32 μM en plasma y de 23 μM en el líquido cefalorraquídeo (*Duarte y cols., 2009*), equivalente a lo encontrado en el plasma de humanos consumidores de 6 tazas de café diarias (*Denaro y cols., 1990; Benowitz y cols., 1995*). En extractos de hipocampo fueron medidos 0,4 μg de cafeína, lo que corresponde a una concentración estimada de 22 μM de cafeína, si asumimos que el volumen total del hipocampo es de 95 μl (*Wolf y cols., 2002*). Teniendo en cuenta estos datos y que la concentración en el cerebro de cafeína es de aproximadamente un 80% de la concentración en plasma, se recomienda utilizar una concentración en torno a 30 μM para probar los efectos de la cafeína sobre la transmisión sináptica y actividad neuronal en rodajas de cerebro.

1.2.2. Acciones de la cafeína en el sistema nervioso

1.2.2.1. Efectos provocados por altas concentraciones de cafeína

El consumo normal de cafeína en los seres humanos, se extiende desde dosis bajas, pero efectivas, hasta dosis altas que podrían producir efectos tóxicos (*Fredholm y cols., 1999*).

A dosis extremadamente altas, concentraciones de milimolar, la cafeína puede activar directamente los receptores de rianodina del retículo endoplásmico provocando la liberación de calcio de los reservorios intracelulares (*McPherson y cols., 1991*). A estas concentraciones la cafeína también puede inhibir las fosfodiesterasas (*McPherson y cols., 1991*). Hay que tener en cuenta que

INTRODUCCIÓN

concentraciones tan altas de cafeína son raras que se alcancen en un consumo normal humano.

La única diana molecular que se afecta con el consumo normal de cafeína, son los receptores de adenosina, a los cuales se une antagonizándolos (*Fredholm, 1995*).

1.2.2.2. Efecto sobre los receptores de adenosina

La adenosina es un constituyente celular normal cuyas concentraciones basales se estiman en un rango muy amplio entre los 25-250 nM (*Ballarin y cols., 1991*). La adenosina en el hipocampo está presente, en condiciones normales, a unas concentraciones extracelulares de 10 a 30 nM. Bajo condiciones de hipoxia, isquemia o inflamación, las concentraciones de adenosina aumentan pudiendo llegar a alcanzar de 20 a 30 μ M (*Dux y cols., 1990; Latini y Pedata, 2001*).

Hay varias fuentes potenciales de las que puede provenir la adenosina extracelular. Por un lado, la degradación de ATP en el propio espacio extracelular a través de transportadores o por exocitosis (*Klyuch y cols., 2012; Wall y Dale, 2013*).

En estas condiciones también existe un incremento desproporcionado de adenosina (nanomolar) en el interior celular (*Cuhna, 2001*), resultado del alto consumo metabólico de ATP (que se encuentra a concentraciones de milimolar), y cuya ruta metabólica se mantiene en equilibrio gracias a la actividad de la adenosina kinasa y la adenosina deaminasa (*Fredholm y Lerner, 1982*).

La adenosina actúa sobre los receptores purinérgicos de tipo P1, los cuales se subdividen en A1, A2_A, A2_B y A3, según a que proteína G estén acoplados (*Fredholm y cols., 2011*).

Los efectos de la cafeína se dan sobre todo a través de los receptores A1, uno de los más abundantes en el tejido cerebral (*Dunwiddie y Masino, 2001*). Dichos receptores tienen una constante de afinidad muy baja para la adenosina (70 nM) y

INTRODUCCIÓN

están localizados principalmente en las sinapsis glutamatérgicas (*Rebola y cols., 2005*).

El receptor tipo A1 está acoplado a la proteína G sensible a toxina pertúsica tipo Gi-1, Gi-2, Gi-3, Go1, Go2 y su activación provoca, a través de estas proteínas, la inhibición de la adenilato ciclasa y reduce la producción de AMPc y la activación de la fosfolipasa C y fosfolipasa D (*Akbar cols., 1994; Freund y cols., 1994; Jockers y cols., 1994*). La activación de receptores A1 también inhibe la entrada de calcio actuando sobre los canales de calcio sensibles a voltaje, y a través de receptores de glutamato de tipo NMDA, o activando corrientes de potasio (*Dunwiddie y Masimo, 2001*).

Los receptores de adenosina tipo A1 están presentes en todas las áreas del cerebro; con niveles especialmente altos en hipocampo, cerebelo, cortex cerebral y tálamo (*Goodman y Synder; 1982; Dixon y cols., 1996*). Usando técnicas de autoradiografía cuantitativa, se han localizado receptores A1 pre- y postsinápticos en la región CA1 del hipocampo (*Deckert y Jorgensen, 1988*).

Los receptores de adenosina tipo A2 están asociados con proteínas Gs/Golf y causan la activación de la adenilato ciclasa e incrementan la síntesis de AMPc; lo que resulta en una activación de la PKA y la fosforilación de CREB (*Fredholm y cols., 2011*). Los receptores A2_A (K_a= 150 nM) están presentes en cantidades relevantes en unas pocas regiones del cerebro como estriado, bulbo olfatorio y nucleus accumbens (*Fredholm y cols., 1999*). Los receptores A2_A también están presentes con baja densidad en diferentes áreas del cerebro como áreas corticales, donde tienen una localización predominantemente presináptica (*Rebola y cols., 2005*). Los receptores A2_A también se expresan en el estriado en los axones y terminales nerviosas, tanto en las sinapsis simétricas como asimétricas, lo que

INTRODUCCIÓN

implica que los A_{2A} modulan la neurotransmisión (*Svenningsson y cols., 1998; Hettinger y cols., 2001*). En las sinapsis glutamatérgicas del hipocampo hay expresión de receptores A₁ y A_{2A} en la terminal presináptica (*Rebola y cols., 2005*), donde modulan la liberación de neurotransmisores tales como el glutamato, acetilcolina, GABA y noradrenalina.

El receptor de adenosina tipo A_{2B} también activa la adenilato ciclasa y está ampliamente distribuido en el cerebro (*Dixon y cols., 1996*). Su afinidad por la adenosina es muy baja (~5100 nM) por lo que requiere altas concentraciones de adenosina para activarse (*Dunwiddie y Masino, 2001*). Bajo condiciones patológicas estos receptores parecen ser activados por la adenosina endógena.

Los receptores A₃, al igual que los A₁, están acoplados a proteínas Gi/Go. Su activación disminuye la producción de AMPc y por tanto la actividad de la PKA (*Fredholm y cols., 2011*). Son los receptores peor caracterizados, pero se ha demostrado que en condiciones en las que las concentraciones de adenosina en el cerebro aumenta (hipoxia, isquemia, convulsiones...), la activación de los receptores de tipo A₃ podrían dar lugar a una desensibilización heteróloga de la respuesta de los A₁, que estarían tónicamente activados por la adenosina presente en el medio, por una vía dependiente de la proteína kinasa C (*Dunwiddie y cols., 1997*). Por otro lado, los A₃, pueden regular la actividad de la PLC vía proteína G sensible a toxina pertúsica o acoplándose directamente a proteína Gq (*Fredholm y cols., 2011*). Tienen también una constante de afinidad muy baja (6500 nM) y al igual que los receptores de tipo A_{2B} no han podido ser bien caracterizados debido a que están presentes en muy baja densidad en el tejido cerebral (*Fredholm y cols., 2005*). Sorprendentemente, aunque la cafeína tiene muy baja afinidad por los

INTRODUCCIÓN

receptores A3, se ha observado que la actividad psicomotora inducida por la cafeína está reducida en los ratones KO para receptores A3 (*Chen y cols., 2010*).

1.2.3. Efectos de la cafeína sobre la neurotransmisión

Los niveles basales de adenosina en el espacio intersticial en la mayoría de las zonas cerebrales son suficientes para activar sus receptores de tipo A1, pero no los de tipo A2, que tienen menos afinidad. Por ello, la cafeína, que tiene una afinidad similar por ambos receptores, provoca un efecto neto sobre la transmisión sináptica parecido al producido por antagonistas específicos de los receptores A1 presinápticos: aumento de la liberación de neurotransmisores como el glutamato y la dopamina (*Solinas y cols., 2002*) y también de manera indirecta, de neuromoduladores como el ATP incluido en las vesículas sinápticas junto al glutamato (*Fields y Burnstock, 2006*).

Green y cols (1986) demostraron que la aplicación de cafeína provoca un aumento de la excitación neuronal en la región CA1 del hipocampo, tanto en registros extracelulares del fEPSP y de la espiga poblacional como en registros intracelulares.

Los efectos psicoestimulantes de la cafeína pueden ser explicados casi en su totalidad por su acción inhibitoria sobre los receptores A1.

El ATP actúa como neurotransmisor excitador y parece estar implicado en procesos de plasticidad sináptica en el SNC (*Abbracchio y cols., 2009*). Existen cada vez más evidencias de que el ATP puede jugar un papel importante en la comunicación entre las neuronas y la glia (*Fields y Burnstock, 2006*). La acción del ATP es mediada por sus receptores ionotrópicos (P2X) permeables a Ca^{2+} y metabotrópicos (P2Y) que regulan el Ca^{2+} y el AMPc vía señalización a través de

INTRODUCCIÓN

proteínas G (Fields y Burnstock, 2006), y que se expresan abundantemente en muchos tipos de neuronas y células gliales.

El ATP liberado por la sinapsis, tras su degradación a adenosina por la acción de las ectonucleotidasas (*Pascual y cols., 2005; Abbracchio y cols., 2009*), puede activar indirectamente los receptores A1, así como los receptores A_{2A} (*Cunha y cols., 1996; Rebola y cols., 2008*). Por otra parte los receptores A₂ son capaces de inhibir el funcionamiento de los receptores A1 a través de un mecanismo que involucra una proteína quinasa C (*Lopes y cols., 2002*).

1.2.4. Efectos de la cafeína sobre la plasticidad sináptica

Existen cada vez más evidencias experimentales de que los procesos de plasticidad sináptica se inducen en las sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria, lo que es necesario y suficiente para el almacenamiento de la información subyacente al tipo de memoria mediada por la zona del cerebro en la que se observa (*Morris y cols., 2003*).

La cafeína podría afectar a la facilitación de la LTP y a los fenómenos relacionados con la plasticidad sináptica en áreas cerebrales importantes involucradas en el aprendizaje y la memoria. Los efectos de la cafeína sobre la plasticidad sináptica se han estudiado normalmente utilizando concentraciones de cafeína del rango milimolar, mucho más altas que las concentraciones de cafeína (5 a 70 μM) medidas en plasma de humanos tras ingerir cantidades moderadas de café (*Costenla y cols., 2010*). A esas altas concentraciones, en rodajas de hipocampo, la aplicación de cafeína provoca una potenciación sináptica duradera de origen presináptico, en la que intervienen receptores de adenosina y ATP, y liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares *dependientes de rianodina* (*Martin y Buño, 2003*).

INTRODUCCIÓN

En un estudio realizado con concentraciones de cafeína del orden de micromolar, en la región CA1 y CA2 en hipocampo de rata (*Simons y cols., 2011*) se ha puesto de manifiesto que la perfusión de cafeína induce una potenciación duradera de la respuesta sináptica en la región CA2 pero no en la CA1; sugiriendo que el aumento de la neurotransmisión en la región CA2 es el resultado de modificaciones en las sinapsis. Dicho aumento es atribuido a la acción antagónica de la cafeína sobre los receptores de adenosina de tipo A1.

1.2.5. Relevancia clínica de la cafeína

La cafeína puede tener efectos sobre la atención, motivación, estado de alerta y vigilia (*Hewlett y Smith; 2007*).

1.2.5.1. En la enfermedad de Alzheimer

La administración de cafeína a través del agua de bebida a una concentración de 1 g/L es neuroprotectora y previene los déficits en la memoria en roedores con diabetes, estrés, convulsiones en edad temprana y Alzheimer (*Cunha, 2008; Duarte y cols., 2009; Cognato y cols., 2010*). Hay evidencias científicas de que los antagonistas de los receptores de adenosina, como la cafeína, podrían ser usados para prevenir los déficits cognitivos observados en la demencia senil. La cafeína también protege del daño producido en humanos por la administración de escopolamina, un antagonista para los receptores muscarínicos de acetil colina que induce pérdida de memoria (*Riedel y cols., 1995*).

Con la edad hay un incremento en la densidad y un mayor rendimiento en el funcionamiento de los receptores A_{2A} (*Lopes y cols., 1999; Cunha y cols., 2001*), así como un mejor acoplamiento a las proteínas G y su eficiencia para producir AMPc en diferentes áreas del cerebro (*Cunha y cols., 1996; Lopes y cols., 1999*). Sin embargo, los receptores A1 decrecen con la edad en el hipocampo y cortex

INTRODUCCIÓN

(*Cunha y cols., 1996; Sebastiao y cols., 2000; Costenla y cols., 2010*). Por este motivo se ha propuesto a la cafeína y sus efectos sobre los receptores A_{2A} como una diana terapéutica para tratar los procesos de neurodegeneración (*Canas y cols., 2009*).

La cafeína, a través de su acción sobre receptores A_{2A}, protege a las neuronas del cerebelo en cultivo de la toxicidad del péptido beta amiloide $\alpha\beta_{25-35}$ (*Dall'Igna y cols., 2003*). Por otro lado, el tratamiento agudo de ratones con altas dosis de cafeína (80 mg/kg) o el tratamiento crónico con una dosis intermedia (30 mg/kg) previenen los déficits de memoria inducidos por la administración del péptido $\alpha\beta_{25-35}$ (*Chen y cols., 2010*). Curiosamente estos resultados pueden ser mimetizados con un antagonista para los receptores de tipo A_{2A}, aplicado antes del tratamiento con el péptido $\alpha\beta_{25-35}$. La cafeína también tiene un efecto neuroprotector sobre los ratones que sobreexpresan APP (del inglés “ β -amyloid precursor protein”) y desarrollan un déficit cognitivo progresivo, lo que les ha convertido en uno de los mejores modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (*Dewachter y cols., 2000*). La cafeína también reduce la producción de péptido $\alpha\beta_{1-40}$ y de $\alpha\beta_{1-42}$ en neuronas en cultivo de ratones transgénicos APP (*Arendash y cols., 2006*). El tratamiento diario con cafeína (vía oral) durante 6 meses impidió los déficits de memoria espacial que presentaban ratones de 10 meses de edad y redujo los niveles de péptido β -amiloide soluble e insoluble en el hipocampo. En humanos, se ha observado que el consumo de cafeína puede prevenir el deterioro cognitivo relacionado el envejecimiento (*Ritchie y cols., 2007*) y podría estar asociado con una incidencia menor de Alzheimer (*Maia y Mendonça, 2002; Eskelinen y cols., 2009*).

1.2.5.2. En la enfermedad de Parkinson

En la enfermedad de Parkinson, además de los síntomas en el sistema motor, hay déficits en los procesos de aprendizaje y memoria que consisten en una disfunción ejecutiva junto con trastornos visuales, espaciales y memorísticos, que pueden ser observados en los estadios tempranos de la enfermedad (*Dubois y Pillon, 1997; Bosboom y cols., 2004*). Estos síntomas pueden derivar en demencia en el 20-40% de los pacientes con Parkinson. La enfermedad de Parkinson raramente aparece en animales, pero puede ser imitada mediante la inyección de sustancias neurotóxicas, como MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridina), que afecta negativamente a la neurotransmisión dopaminérgica (*Beal, 2001*).

Los receptores de adenosina están densamente expresados en el estriado y ejercen una influencia moduladora sobre la neurotransmisión dopaminérgica (*Svenningsson y cols., 1999*). Tanto la cafeína como los antagonistas específicos para los receptores A_{2A} ejercen acciones neuroprotectoras sobre las neuronas dopaminérgicas del SNC (*Chen y cols., 2010*). La cafeína incrementa la liberación de dopamina desde las terminales nerviosas estriatales (*Okada y cols., 1997*), un efecto que también es mimetizado por un antagonista selectivo para los receptores A_{2A} en sinaptosomas estriatales (*Da Cunha y cols., 2002*).

Muchos de los fármacos utilizados de manera habitual para el tratamiento del Parkinson, como la L-dopa, son más eficientes aliviando los síntomas motores que los daños cognitivos. Esto ha llevado a pensar a los investigadores que hay mecanismos no dopaminérgicos implicados en los síntomas cognitivos de esta enfermedad (*Cools y cols., 2001*).

La administración aguda de cafeína o de un antagonista selectivo para los receptores de adenosina de tipo A_{2A}, revierte los efectos de la reserpina en

INTRODUCCIÓN

modelos animales, no siendo así cuando se aplica un antagonista selectivo para los receptores de tipo A1. Estos resultados indican que la cafeína, así como los antagonistas selectivos para los receptores de adenosina de tipo A1 y A2_A, pueden prevenir las alteraciones en el aprendizaje y la memoria observadas en la enfermedad de Parkinson (*Hauber y Bareiss, 2001; Pereira y cols., 2002*).

Estos datos podrían explicar porqué, la población que consume habitualmente bebidas con cafeína, tiene menos riesgo de desarrollar Parkinson (*Hellenbrand y cols., 1996; Ross y cols., 2000; Tan y cols., 2003*).

1.3. Las bebidas energéticas

Las llamadas bebidas energéticas están compuestas principalmente por cafeína y otros ingredientes provenientes de vegetales (guaraná, yerba mate, Ginkgo biloba, ginseng...), azúcares simples (como la glucosa o fructosa), glucoronolactona (un metabolito de la glucosa), aminoácidos (taurina, carnitina o creatina), y vitaminas. Los efectos de estos ingredientes ingeridos conjuntamente se desconocen.

La cantidad de cafeína contenida en las bebidas energéticas varía considerablemente, llegando a contener alguna de ellas más de 300 mg por lata (*Energy Fiend. The Caffeine Database, 2007*).

Recientes publicaciones han relacionado el consumo de bebidas energéticas con vasculopatías cerebrales (*Worrall y cols., 2005*), manía (*Machado-Vieira y cols., 2001*), y posiblemente con la muerte en abusos severos (*Gunja y Brown, 2012; Wolk y cols., 2012*).

1.3.1. Bebidas energéticas y alcohol

El consumo de alcohol mezclado con bebidas energéticas es muy común entre la población de estudiantes jóvenes y en los campus universitarios (*Cobb y cols., 2013*).

INTRODUCCIÓN

Estudios llevado a cabo en personas consumidoras habituales de bebidas energéticas, indican que las bebidas energéticas podrían reducir la percepción subjetiva de intensidad de los efectos depresores del etanol y la percepción de la intensidad de la intoxicación por alcohol (*Ferreira y cols., 2006; O' Brien y cols., 2008*). Sin embargo, estos estudios realizados con el sistema de doble ciego no encontraron diferencias significativas en los parámetros fisiológicos ni bioquímicos en voluntarios que bebieron alcohol solo o en combinación con bebidas energéticas (*Ferreira y cols., 2006; Ferreira y cols., 2004*).

Basándonos en las acciones de la cafeína y la taurina (los componentes mayoritarios en estas bebidas) en el sistema nervioso, estas bebidas podrían alterar los efectos del alcohol, simplemente por los efectos estimulantes de la cafeína (*Liguori y Robinson, 2001*) y la influencia de la taurina en la neurotransmisión mediada por GABA (*Kuriyama y Hashimoto, 1998*). La cafeína promueve por si sola el consumo voluntario de etanol en ratas (*Kunin y cols., 2000*). La cafeína podría aumentar y reforzar el efecto del etanol sobre la estimulación locomotora de manera dosis dependiente en roedores (*Kuribara y cols., 1992*).

Los estudios con animales de laboratorio han concluido que la administración previa o concomitante de taurina afecta a los efectos del alcohol (*Ferko y Bobyock, 1988; Aragon y cols., 1992; Kuriyama y Hashimoto, 1998*), reduciendo los efectos estimulantes del etanol en la actividad locomotora en ratones y los efectos depresores sobre el SNC, así como una reducción del tiempo de somnolencia inducida por etanol en ratones.

1.3.2. Bebidas energéticas y enfermedades psiquiátricas

Se ha relacionado el consumo de bebidas que contienen cafeína, taurina e inositol con la aparición de episodios de manía (*Machado-Vieira y cols., 2001*).

INTRODUCCIÓN

El uso de este tipo de bebida está ampliamente extendido, incluso entre individuos con enfermedades psiquiátricas. El uso de sustancias psicoactivas, entre las que se encuentra la cafeína, debido a una serie de factores, es muy común entre los que sufren una enfermedad psiquiátrica y puede comenzar de manera social o como intento de automedicarse, con la intención de obtener alivio de la sintomatología. Se ha comprobado que su consumo complica el tratamiento, dificultando a menudo el diagnóstico y seguimiento (*Chelben y cols., 2008*). Individuos con una predisposición a la manía o a la psicosis, podrían tener una mayor predisposición a responder adversamente o mostrar un umbral más bajo para desarrollar problemas al ingerir bebidas energéticas (*Chelben y cols., 2008*).

En individuos hospitalizados por enfermedades mentales se han detectado cambios agudos (un incremento en el deterioro del estado mental e intensificación de las respuestas afectivas) que parecen estar asociados al consumo de bebidas que contienen una combinación de aminoácidos y cafeína (*Chelben y cols., 2008*). Aunque no se puede establecer una relación causal definitiva entre el uso de estas bebidas y la hospitalización, se puede llegar a la conclusión de que el abuso de bebidas energéticas podría dar lugar a una hipervigilancia y un malestar psicomotor, que agravase el estado mental de dichos individuos (*Chelben y cols., 2008*).

1.3.3. Efectos sobre la función cognitiva y el estado de ánimo

Se han descrito efectos positivos de las bebidas que contienen taurina y cafeína en las funciones cognitivas y en el estado de ánimo, aunque las dosis óptimas que dan efectos positivos y las cantidades excesivas que provocan los adversos no están del todo claras (*Alford y cols., 2001*). En un meta-análisis detallado de este tipo de bebidas se describe una mejora en el procesamiento de la información,

acompañado de una sensación intensificada de alerta, atención y lucidez (*Warburton y cols., 2001*).

1.3.4. Bebidas energéticas y epilepsia

La cafeína puede inducir convulsiones en individuos susceptibles, especialmente en estados de privación de sueño (*Kaufman y Sachdeo, 2003*). En humanos, han sido documentadas convulsiones tras una sobredosis de cafeína (*Cohen y cols., 1992*) y después de ingerir pastillas con grandes cantidades de cafeína (*Mueller y Solow, 1982*). De hecho es sabido que pacientes con epilepsia son sensibles a dosis más bajas de cafeína (*Kaufman y Sachdeo, 2003*). En algunos casos (cuatro pacientes en urgencias) se ha asociado el consumo de grandes cantidades de bebidas energéticas con episodios agudos de convulsiones (*Iyadurai y Chung, 2007; Schmidt, 2014*).

Por otra parte, la taurina puede tener propiedades tanto anticonvulsionantes como epileptogénicas (*El Idrissi y cols., 2003; Kirchner y cols., 2003; Sulaiman y cols., 2003; Ricci y cols., 2006*).

1.3.5. Consumo durante el ejercicio

La cafeína ha sido usada para reducir la fatiga e incrementar el estado de vigilia y la alerta (*Hewlett y Smith, 2007*). Debido a esas propiedades la cafeína es usada frecuentemente como una ayuda ergogénica para individuos activos así como para los atletas (*Burke, 2008*). La mayoría de los estudios indican que la cafeína mejora el rendimiento en los ejercicios de resistencia (*Burke, 2008*). Sin embargo, es menos eficaz mejorando sus propiedades ergogénicas cuando el rendimiento en el ejercicio es en condiciones metabólicas anaeróbicas (*Davis y Green, 2009*). Se ha propuesto que el contenido de taurina y cafeína de las bebidas energéticas aumenta el rendimiento del ejercicio y mejora el estado de ánimo (*Zhang y cols.,*

INTRODUCCIÓN

2004). De hecho, aproximadamente un 40% de los jóvenes atletas de élite británicos utilizan las bebidas energéticas siendo el suplemento mas ampliamente utilizado (*Petroczi y cols., 2008*)

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El consumo de bebidas que contienen taurina y cafeína se ha popularizado internacionalmente. Ambas sustancias son potencialmente neuroactivas y se desconoce si sus acciones pueden interaccionar. Por esta razón los objetivos principales de esta tesis han sido:

1. Determinar si la taurina y la cafeína tienen efectos sinérgicos sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal.
2. Si encontrásemos algún efecto sinérgico, investigaríamos los receptores para los neurotransmisores involucrados.
3. Finalmente, estudiaríamos los mecanismos de señalización requeridos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de unos 180-240 gr de peso (6-8 semanas de vida) de la cepa Sprage-Dawley criadas en el animalario del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal. El manejo de los animales se ajustó a las directrices de la Comunidad Europea (86/609/ECC).

Los experimentos se realizaron en rodajas transversales de hipocampo dorsal incubadas *in vitro*. Este preparado experimental conserva en gran parte las conexiones sinápticas entre las neuronas. La morfología del hipocampo está altamente estructurada, permitiendo de manera simple, que se aprecien las diferentes capas en las que se organiza. La colocación de los electrodos de estimulación y registro se puede hacer de manera fácil y reproducible.

Las rodajas presentan su máxima estabilidad entre las 3-7 horas después de su preparación y las respuestas sinápticas pueden durar hasta 10-12 horas tras su extracción.

3.1. Obtención de las rodajas de hipocampo

Tras anestesiar al animal por inhalación de Isoflurano, se sacrificó por decapitación. Se realizó un corte sagital para separar la piel y la calota craneal. Se separaron los huesos parietales y frontales y se extrajo rápidamente el cerebro después de retirar las meninges y cortar los pedúnculos cerebrales.

El cerebro se introdujo en una disolución de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) con glucosa mantenida a una temperatura aproximada de 1 °C y fue burbujeadada constantemente con gas carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Transcurridos unos 30 segundos en esta situación se aislaron cuidadosamente los dos hipocampos correspondientes a sendos hemisferios. Una vez que ambos hipocampos fueron aislados, se colocaron en un cortador manual y se seccionaron transversalmente a

MATERIALES Y MÉTODOS

su eje longitudinal, obteniéndose rodajas de 400 μm de espesor. Las rodajas se obtuvieron sólo del hipocampo dorsal.

Una vez cortadas se retiraron de la cuchilla del cortador con un pincel y se colocaron en una placa de Petri con KRB frío y oxigenado. Desde esta placa se transfirieron a la cámara de mantenimiento mediante una pipeta de vidrio y permanecieron allí al menos tres horas antes de ser utilizadas experimentalmente. El tiempo que transcurrió en todo el proceso, desde el sacrificio de la rata hasta que las rodajas se depositaron en la cámara de mantenimiento, fue inferior a cinco minutos. Es importante que este tiempo no sea muy elevado y que el proceso se desarrolle el mayor tiempo posible a temperaturas bajas, para minimizar el daño celular y evitar cambios celulares irreversibles. La exposición de las rodajas a tiempos de isquemia superiores a 3 minutos o la liberación de glutamato durante el proceso de cortar las rodajas, puede impedir de manera irreversible la síntesis proteica (*Djuricic y cols., 1994*).

3.2. Cámara de mantenimiento

Después de haber preparado las rodajas, existe un período de tiempo en el que no se detecta ninguna actividad neuronal a consecuencia del trauma ocasionado en la preparación de las mismas. Son necesarias entre 3 y 4 horas tras la preparación de la rodajas para que su metabolismo se estabilice (*Sajikumar y col., 2005*). Por esto, durante este período y hasta que las rodajas se utilizaron para el registro, permanecieron en una cámara de mantenimiento.

La cámara de mantenimiento utilizada en nuestros experimentos fue similar a la descrita por *Nicoll y Alger (1981)* y se construyó formando un cubo de metacrilato de 1 litro de volumen, que se tapó con una placa del mismo material y del tamaño adecuado preparada para permitir el acceso del tubo de oxigenación (figura 3.1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este recipiente se llenó de agua destilada hasta alcanzar una altura de unos 2 cm y se burbujeó constantemente con gas carbógeno para conseguir una atmósfera oxigenada y saturada de vapor de agua. En el centro de la cámara se situó una columna en cuyo extremo superior se colocó una placa de Petri de 3 cm de diámetro repleta de KRB sobre la que se colocó un papel Whatman (grado 1). Las rodajas se depositaron sobre este papel con el fin de permitir el paso de los componentes del KRB al tejido. En estas condiciones, las rodajas se mantuvieron a temperatura ambiente (22-25°C) hasta diez horas. Con la ayuda de una pipeta de vidrio las rodajas se transfirieron de una en una a la cámara de registro después de que hubieran transcurrido al menos 3 horas desde que se depositaron en la cámara de mantenimiento.

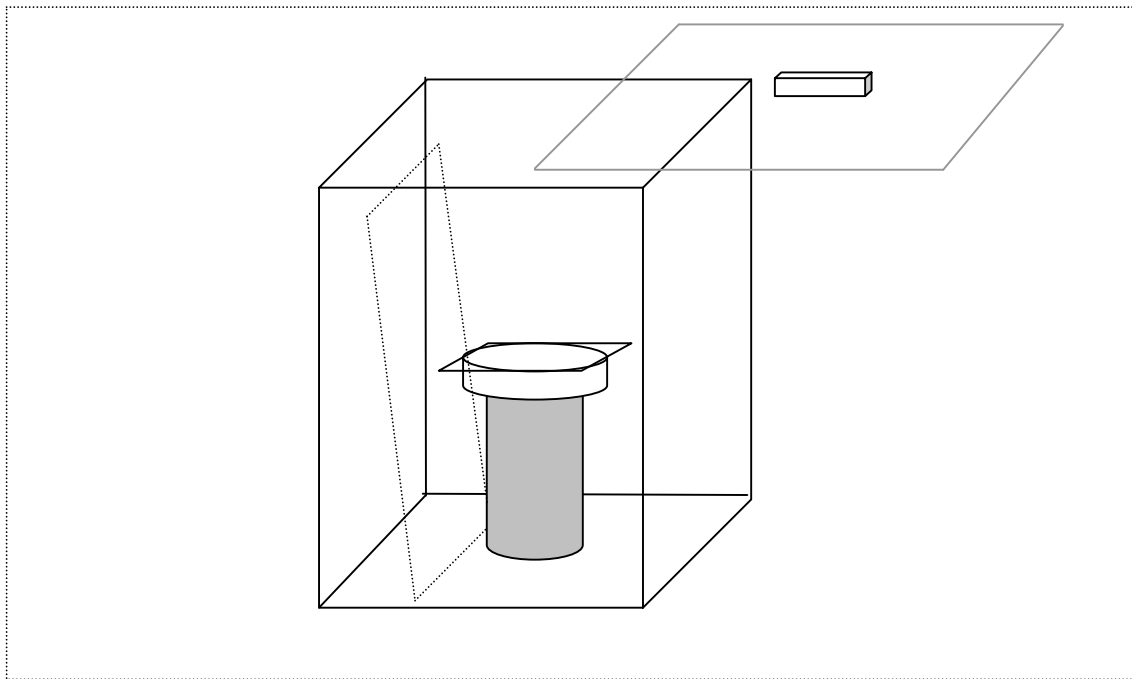


Figura 3.1 Cámara de Mantenimiento

3.3. Cámara de registro

La cámara de registro que utilizamos en nuestros experimentos fue del tipo de la descrita por Nicoll y Alger (1981). En esta cámara, el tejido está completamente sumergido en la solución KRB que es constantemente renovada gracias a una bomba peristáltica modelo "Minipuls 3" (*Gilson*) que perfunde la solución con un flujo de 2 ml por minuto.

La cámara de registro consiste en una base de metacrilato con dos pocillos comunicados entre sí y con un volumen total de 1,5 ml. En uno de los pocillos se realizaron los registros y el otro se utilizó para drenar el líquido de perfusión.

En el pocillo de registro, el tejido se colocó entre dos mallas de nylon que se construyeron tensando la malla entre dos arandelas de plástico.

El diámetro de red de la malla permite el acceso a una superficie de la rodaja suficiente como para colocar los electrodos de registro y de estimulación.

En el pocillo de drenaje se colocaron la aguja de succión conectada al sistema de vacío del edificio, el electrodo indiferente del preamplificador y la sonda de temperatura acoplada a un termorregulador RTC1p (*Cibertec*) que mantuvo la temperatura en el valor predeterminado de 31-32 °C. Para mantener el líquido de perfusión a una temperatura constante, la base en la que están incluidos los pocillos se apoya en otra base metálica que fue calentada por un sistema formado por bombas de calor de efecto Peltier conectadas al termorregulador. El líquido de perfusión se precalentó haciéndolo pasar entre la placa metálica antes de entrar en la cámara de registro.

La cámara de registro se fijó a una mesa antivibratoria *Newport* y se iluminó con una fuente de luz fría, desde la parte inferior del pocillo de registro.

3.4. Disoluciones de perfusión

La composición del KRB que se utilizó tanto para la obtención de las rodajas como para la perfusión de las mismas fue la siguiente (en mM):

NaCl 119; KCl 2,5; KH₂PO₄ 1,0; NaHCO₃ 26,2; MgSO₄ 1,3; CaCl₂ 2,5; Glucosa 11.

En los experimentos hechos en ausencia de calcio se realizaron pequeñas modificaciones de esta disolución estándar, eliminando el cloruro de calcio y aumentando la concentración de magnesio en forma de sulfato de magnesio hasta 6 mM y con 100 μM de EGTA, un quelante de calcio.

Todas ellas se prepararon diariamente a partir de disoluciones madre que tenían una concentración diez veces mayor que la final y se almacenaron a 4 °C. Todos los componentes del KRB se obtuvieron de Sigma o Merck.

La osmolaridad de las diferentes disoluciones se midió diariamente con un micro-osmómetro Mod.3Moplus (*Advanced Instruments, Massachussets, EE.UU.*).

Todas las disoluciones fueron burbujeadas constantemente con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) para mantener la oxigenación y el pH de la disolución (~ 7,4). Dado que el burbujeo aumenta la evaporación se midió la osmolaridad del medio de forma periódica durante los experimentos de duración prolongada y de perfusión reciclada, comprobando que las variaciones en la osmolaridad de la solución que no fueran superiores a 5 mOsm. Además, se añadió frecuentemente más KRB a la disolución de perfusión para mantener constante el volumen de la misma, de forma que las variaciones en la osmolaridad fueran las mínimas posibles.

En algunos experimentos realizados en esta tesis se han utilizado una serie de compuestos químicos con unas propiedades farmacológicas definidas que están descritas a continuación en la tabla 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

En algunos casos, los compuestos fueron disueltos directamente en la disolución de perfusión y en otras ocasiones se prepararon las disoluciones concentradas, que se almacenaron a -20 °C en oscuridad, y se diluyeron a su concentración final en la disolución de perfusión, antes de ser utilizadas en cada experimento (ver tabla 1).

TABLA1

NOMBRE	ACCIÓN	MADRE	CASA COMERCIAL
3-APPA (Acido 3 aminopropilfosfónico)	Agonista de los receptores GABAB.	10 mM en H ₂ O	SIGMA
7- CK (Acido 7- Cloroquinurénico)	Antagonista del lugar de glicina en la subunidad NR1 del receptor NMDA.	10 mM en H ₂ O	SIGMA
Acido Ciclopiazonico (CPA)	Inhibidor reversible y permeable de la Ca ²⁺ -ATPasa presente en el retículo endoplasmático	10 mM en DMSO	SIGMA
AP-5 (Ácido D,L-2-amino-5-fosfopentanoico)	Potente antagonista de los receptores de glutamato tipo NMDA.	25 mM en H ₂ O	TOCRIS
ARL 67156	Inhibidor selectivo de la ecto-ATPasa.	20 mM en H ₂ O	TOCRIS
ATP	Agonista de los receptores purinérgicos de tipo P2	10 mM en H ₂ O	TOCRIS
BACLOFENO	Agonista selectivo para receptores de GABAB	5 mM en DMSO	SIGMA
CAFEÍNA	Antagonista de receptores de adenosina de tipo A ₁ y A _{2A} .	70 mM en H ₂ O	SIGMA

MATERIALES Y MÉTODOS

CGP 55845	Antagonista potente y selectivo de los receptores de GABA _B	20 mM en DMSO	TOCRIS
CGP52432	Antagonista potente y selectivo de los receptores de GABA _B	20 mM en DMSO	TOCRIS
CGP54626	Antagonista potente y selectivo de receptores de GABA _B	20 mM en DMSO	TOCRIS
CGS 21680	Agonista de los receptores de adenosina de tipo A _{2A}	5 mM en DMSO	SIGMA
DPCPX (8-Cyclopentil.1,3-dipropilxantina)	Antagonista selectivo para los receptores de adenosina de tipo A ₁	10 mM en DMSO	TOCRIS
EGTA (Acido N,N,N',N' tetracético)	Quelante de Calcio	Disuelto en la disolución de la perfusión	SIGMA
Estaurosporina	Inhibidor de amplio espectro de las proteina quinasa, incluyendo PKC, proteina quinasa A, tirosina quinasa, p ^{60v-src} y CaMKII	1 mM en DMSO	TOCRIS
GF109203X Bisindolmaleimide I	Inhibidor muy potente y selectivo de la PKC, incluyendo las isoformas α y β 1	5 mM en DMSO	CALBIOCHEM
		10 mM en DMSO	TOCRIS
H-89	Inhibidor de la actividad de la PKA	10 mM en H ₂ O	SIGMA
Picrotoxina	Antagonista de los receptores GABA _A	5 mM en H ₂ O	SIGMA

MATERIALES Y MÉTODOS

PPADS	Antagonista no selectivo de receptores purinérgicos de tipo P2.	50 mM en H ₂ O	TOCRIS
Rianodina	Dependiendo de la concentración Inhibidor o activador de los canales de Ca ⁺² del retículo endoplasmático, que liberan calcio al citoplasma	2 mM en H ₂ O	CALBIOCHEM
Suramina	Antagonista no selectivo para receptores purinérgicos del tipo P2.	25 mM en H ₂ O	TOCRIS
Taurina (Ácido 2-amino-etanosulfónico)	Agonista parcial de receptores de glicina y de GABA _A .	Directamente peso/volumen en la disolución de perfusión	SIGMA
U73122	Inhibidor de la PLC	4 mM en DMSO	TOCRIS
ZM241381	Antagonista altamente selectivo de los receptores de adenosina de tipo A _{2A}	5 mM en DMSO	TOCRIS
α,β Metiladenosina (sal trisódica de α,β-Metilen-adenosina 5'-trifosfato)	Agonista de los receptores purinérgicos de tipo P2	20 mM en H ₂ O	SIGMA

Figura 3.2. Tabla con los compuestos utilizados

En aquellos casos en los que las sustancias se disolvieron en DMSO nos aseguramos de que la concentración final del mismo fuese siempre menor que 0,025% en la disolución de perfusión. Cuando se utilizaron sustancias fotosensibles, los experimentos se realizaron apagando la luz fría y atenuando la luz ambiental.

En los experimentos en los que se aplicó picrotoxina se cortó la conexión CA1-CA3 para evitar descargas epilépticas espontáneas.

3.5. Registros electrofisiológicos

Los experimentos realizados en esta tesis se han limitado a la transmisión sináptica en la región CA1, que recibe la aferencia excitadora (glutamatérgica) de los axones de las neuronas piramidales de la CA3 desde las regiones ipsilateral y contralateral, y que son llamadas fibras colaterales de Schaffer y fibras comisurales respectivamente (figura 3.3, Ramón y Cajal, 1893).

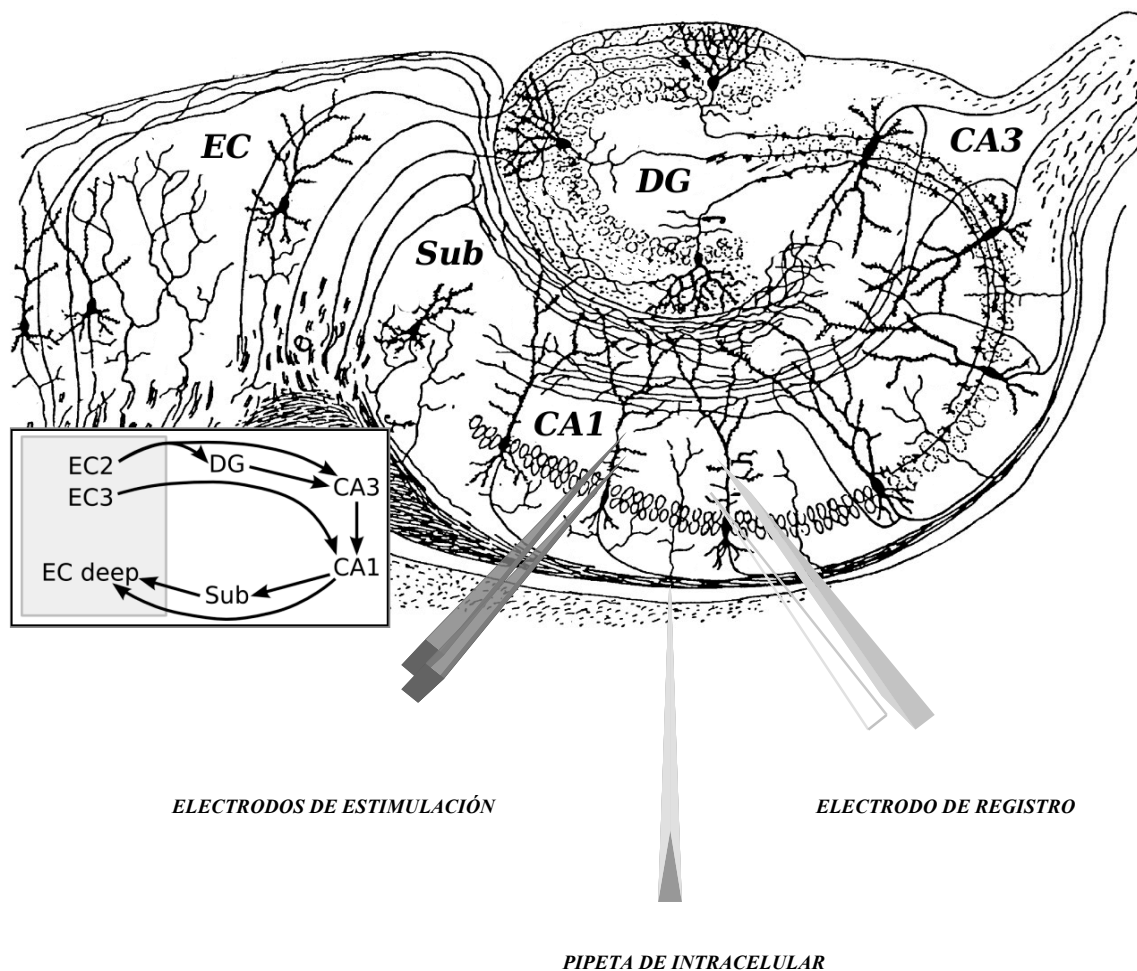


Figura 3.3. Esquema de la configuración de la estimulación eléctrica llevada a cabo en el hipocampo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al estimular eléctricamente las fibras colaterales de Schaffer, en el *stratum radiatum* de la CA1, se activan las sinapsis excitadoras. De esta forma, se generan corrientes, debidas a la activación de los receptores de glutamato localizados en las espinas dendríticas de las células piramidales. Estas corrientes pueden registrarse extracelularmente como cambios en el potencial de campo e intracelularmente como cambios rápidos en el potencial de membrana de la célula. En los experimentos llevados a cabo para esta tesis se han utilizado tanto registros extracelulares de campo como registros intracelulares.

Todos los potenciales registrados en los experimentos realizados en esta tesis se realizaron estimulando el *stratum radiatum* de la CA1. Para posicionar los electrodos en esta zona se utilizaron micromanipuladores M33 (*Märzhäuser*), que se fijaron a la mesa antivibratoria por medio de bases magnéticas. Se utilizó una lupa para visualizar la rodaja y colocar los electrodos en la misma.

3.5.1 Estimulación eléctrica

Los electrodos de estimulación se construyeron en el laboratorio a partir de dos microelectrodos de tungsteno o acero inoxidable (0,1-0,5 m Ω) (*W.P.I, Florida EE.UU*) dejando una separación entre sus puntas de alrededor de 100 μ m.

Las colaterales de Schaffer se estimularon con pulsos eléctricos bifásicos de 100 μ s de duración por fase, inducidos mediante un generador de pulsos A.M.P.I. Master-8 (*Jerusalén, Israel*) conectado a una unidad aisladora de estímulos en configuración de corriente constante (ISO 200 BIP de Cibertec), que genera pulsos de corriente independientes a los cambios de resistencia de los electrodos.

La intensidad de la estimulación que se aplicó fue de 10 a 50 μ A. La intensidad se estableció para cada registro ajustando el valor del fEPSP ó del EPSP aproximadamente a un 40% de su valor máximo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una frecuencia de estimulación de 0,066 Hz (1/15s), ya que se he visto que esta frecuencia no induce cambios de la plasticidad sináptica (Sajikumar y cols., 2005). Cuando se aplicaron pares de pulsos homosinápticos, la frecuencia de estimulación basal fue de 0,033 Hz (1/30s).

3.5.2 Registro de potenciales extracelulares

La activación de las fibras colaterales de Schaffer genera despolarizaciones intracelulares, y los registramos extracelularmente en la región dendrítica de la CA1, como una onda negativa con relación a tierra. Dicha onda negativa es el potencial excitador postsináptico poblacional (fEPSP) y corresponde a la suma de las corrientes sinápticas excitadoras generadas en las sinapsis situadas en la zona cercana al electrodo de registro, siendo un buen indicador de la transmisión sináptica excitadora (Andersen y cols., 1978). En este tipo de registro se detecta una pequeña onda negativa rápida que precede al fEPSP y que corresponde al potencial de fibra presináptico (FV). El FV es un potencial de acción compuesto, que refleja el número y sincronización de los axones que son activados (Andersen y cols., 1978). La relación entre el tamaño del FV y el fEPSP es un parámetro indicativo del estado de la rodaja ya que el fEPSP es más sensible que el potencial de fibra a los posibles daños tanto metabólicos como mecánicos. Se considera que la rodaja presenta una buena transmisión sináptica cuando el FV es aproximadamente un cuarto del fEPSP, en condiciones experimentales normales.

Tanto el fEPSP como el FV se registraron con un microelectrodo (W.P.I.) de tungsteno o de acero inoxidable ($1\text{ M}\Omega$) que al igual que los electrodos de estimulación ($0,5\text{ M}\Omega$), se posicionó en el *stratum radiatum* de CA1 gracias a un micromanipulador M33 (Märzhäuser). El electrodo de registro se conectó a un preamplificador A1 401 (Axon Instruments), acoplado a su vez a un acondicionador

MATERIALES Y MÉTODOS

de señales *CyberAmp 320 (Axon Instruments)*, que filtró y amplificó las señales para adecuarlas para su adquisición por una tarjeta analógica/digital *Digidata 1200 (Axon Instruments)*.

En todos los experimentos se utilizó como electrodo de referencia una bola de plata que fue clorurada mediante su inmersión en lejía durante 15 minutos. El electrodo de referencia se colocó en el pocillo adyacente a la cámara de registro.

Aquellas rodajas con un fEPSP cuya amplitud máxima fue inferior a 2 mV o que no fueron estables durante el periodo basal (20 minutos) fueron desechadas.

3.5.3 Potenciales intracelulares

Los registros intracelulares se realizaron con micropipetas rellanas con acetato potásico (3 M), de 70 a 90 M Ω usando capilares de borosilicato ref. (603000; 1,5 mm x 86 mm, 4" de M-M Sistem INC) que fueron estiradas con un estirador de pipetas P-87 (*Sutter Instrument Company, California, EE.UU.*).

Los registros intracelulares se hicieron con la ayuda de un micromanipulador *Newport* con un eje motorizado, en el estrato piramidal de la CA1 a una distancia de unas 500 μ m del electrodo de estimulación.

Los electrodos intracelulares se conectaron a un preamplificador *Headstage 2Ax0,1 L (Axon Instruments)* conectado a un amplificador *Axoclamp-2B (Axon Instruments)* que se usó en modo de fijación de corriente. Este sistema permitió la inyección de corriente a través del electrodo simultáneamente al registro de los potenciales intracelulares.

Solamente las células con un potencial de membrana (V_m) estable más negativo que -60 mV y con un resistencia de entrada (R_{in}) mayor de 30 M Ω fueron consideradas para este estudio.

3.5.4 Procesamiento de los registros electrofisiológicos

Los potenciales provocados se filtraron entre 0,1 y 3 kHz y se digitalizaron a 25 kHz con una tarjeta analógica digital *Digidata 1200 (Axon Instruments)*. Estas señales fueron visualizadas y almacenadas en un ordenador Pentium IV con la ayuda del paquete informático pClamp 8.0.2. (*Axon Instruments*).

3.5.4.1 Registros extracelulares

La amplitud del FV se midió desde el primer hombro hasta el pico máximo negativo mientras que la pendiente del fEPSP se halló ajustando la misma a una línea recta por el método de los mínimos cuadrados en una ventana de tiempo de alrededor 0,7 ms para el fEPSP provocado por la activación AMPA. Se midió la pendiente inicial con el fin de evitar posibles contaminaciones con el potencial de acción poblacional propagado desde la capa piramidal.

3.5.4.2 Registros intracelulares

La pendiente del EPSP se midió de la misma forma que la utilizada para el potencial extracelular.

El valor del potencial de membrana en reposo (V_m) se obtuvo durante los primeros 10 ms de la adquisición de la señal, antes de inyectar corriente o estimular sinápticamente. La resistencia interna (R_{in}) se calculó a partir de la deflexión de voltaje producida por una corriente hiperpolarizante de 0,1-0,3 nA de 100 ms de duración.

MATERIALES Y MÉTODOS

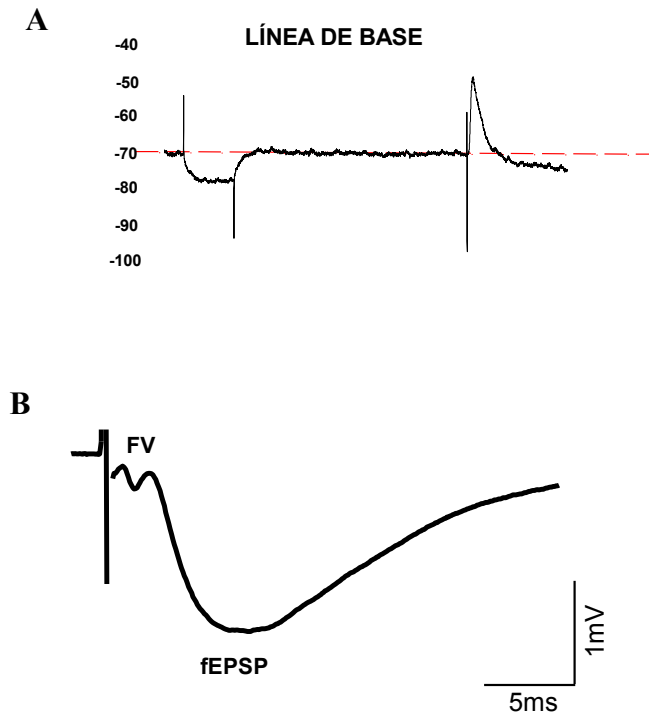


Figura 3.4. Ejemplos de potenciales sinápticos intracelulares (A) y extracelulares (B)

3.5.5 Diseño experimental

Para valorar los efectos sobre la transmisión sináptica de una determinada condición experimental, los potenciales sinápticos provocados cada 15 segundos, durante un período basal de al menos 20 minutos en los experimentos de registro extracelular y de al menos 10 minutos para los registros intracelulares, se promediaron para obtener un valor medio (cada minuto) considerado como 100%. Este valor nos sirvió para normalizar los resultados del resto del experimento y representamos las variaciones en los potenciales respecto a su control frente al tiempo que duró cada experimento. Esto se hizo de manera habitual en todos los casos.

3.6. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Se promediaron los resultados de los experimentos individuales de cada condición experimental para obtener la media y el error estándar de la media para cada minuto

MATERIALES Y MÉTODOS

de experimento. Los datos se expresaron como el valor medio de un número n de experimentos \pm error estándar de la media (EEM).

Para obtener las gráficas en las que se representaron los experimentos realizados, se utilizó el programa Sigmaplot 10.0 (*Systat Software, Illinois, EE.UU.*). Los trazados que se muestran en la parte superior de las gráficas corresponden a los promedios de 8 potenciales (2 minutos) consecutivos promediados con el programa pClamp 8.0.2 (*Axon Instruments*).

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para estimar si el factor tiempo y el factor condición experimental influían significativamente en la varianza de la población. Estas comparaciones estadísticas se hicieron con el programa GB-STAT 5.0 para Windows (*Dynamic Microsystems, Maryland, EE.UU.*). Tras comprobar la normalidad de las muestras, las diferencias entre el control y las diferentes condiciones experimentales en un tiempo determinado, se analizaron mediante una t de Student si las muestras son independientes o un t test apareado si son dependientes. Para estas comparaciones se usó el programa SigmaPlot 10.0. Las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 Efecto de la aplicación conjunta de taurina y cafeína sobre la transmisión sináptica

Antes de determinar la acción conjunta de la taurina y cafeína, realizamos una serie de experimentos en los que estudiamos el efecto de taurina y cafeína por separado.

La aplicación de cafeína (Fig.4.1), en un rango de concentraciones entre 20 μM y 1 mM en la disolución de perfusión durante 30 minutos, provocó un aumento del fEPSP que se mantuvo potenciado durante todo el periodo de aplicación de la cafeína (concentración de la cafeína: 20 μM , $112\pm 2\%$, $n=5$; 50 μM , $117\pm 2\%$, $n=11$; 100 μM , $117\pm 4\%$, $n=5$; 500 μM , $120\pm 4\%$, $n=5$; 1 mM, $111\pm 2\%$, $n=7$).

Tras el lavado de cafeína, los fESPS volvieron a sus valores basales. Las diferentes concentraciones de cafeína usadas en este estudio no mostraron diferencias significativas respecto a su efecto potenciador sobre el fEPSP ($p < 0,05$).

RESULTADOS

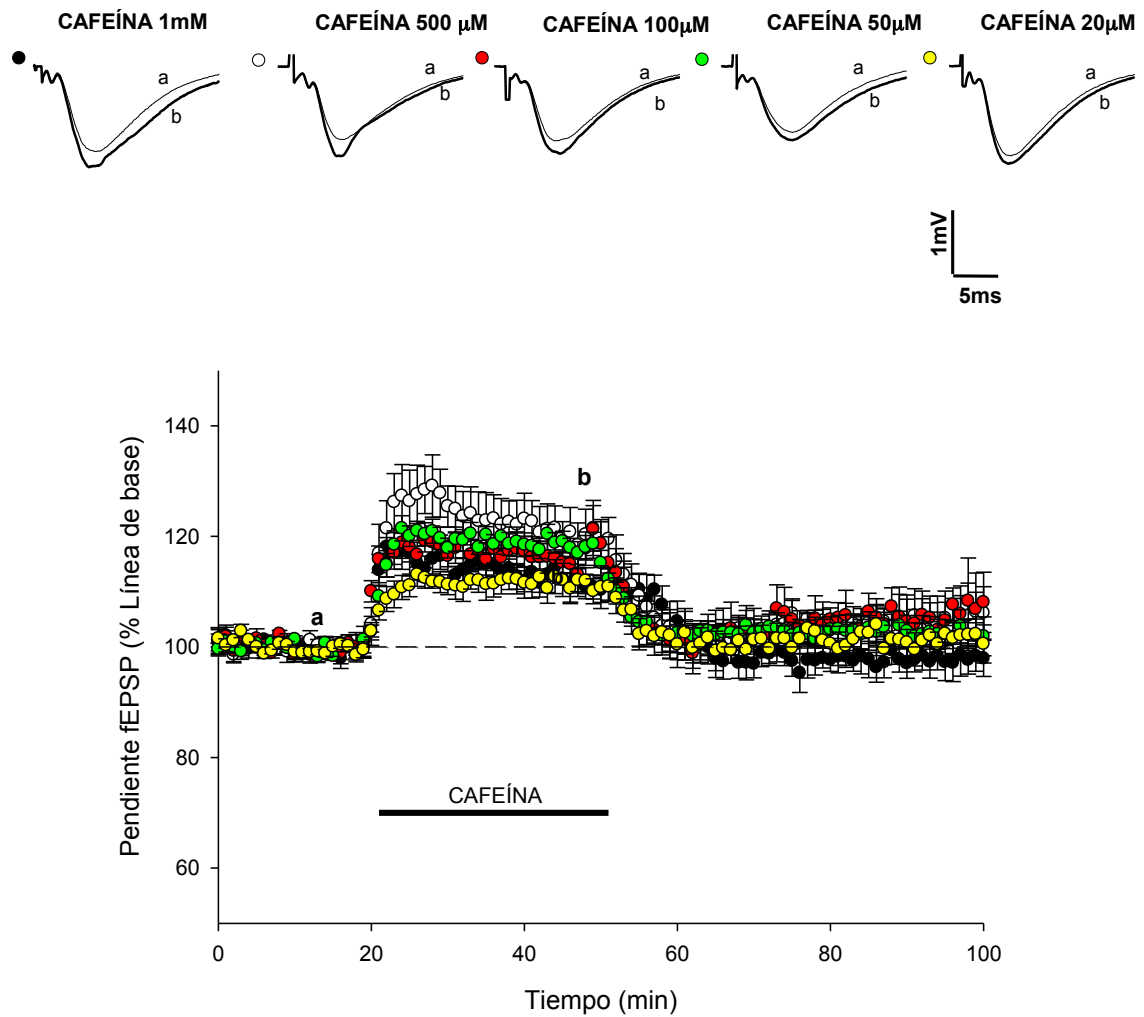


Figura 4.1. La cafeína induce un aumento del fEPSP que es similar en el rango de concentración de 0,02 a 1 mM. Los trazados superiores aquí y en las figuras siguientes corresponden a los fEPSP representativos (8 trazados consecutivos) registrados a los tiempos indicados con las letras en las figuras. Las barras horizontales negras muestran los tiempos de aplicación de las sustancias indicadas sobre ellas. Las diferentes concentraciones de cafeína utilizadas vienen indicadas por los símbolos: ● (n=7); ○ (n=5); ● (n=5); ● (n= 11); ● (n=5).

RESULTADOS

En otro grupo de rodajas de hipocampo ($n=9$) comprobamos el efecto de la aplicación de taurina a una concentración de 1 mM durante 30 minutos. Como se muestra en la figura 4.2, en presencia de taurina el fEPSP aumentó un $112\pm 2\%$ respecto a los valores basales ($p < 0,05$). Esta potenciación no se mantuvo durante el periodo de lavado ($103\pm 3\%$ a la hora de retirar la taurina; $p > 0,05$). Estos datos son similares a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (*Galarreta y cols., 1996*).

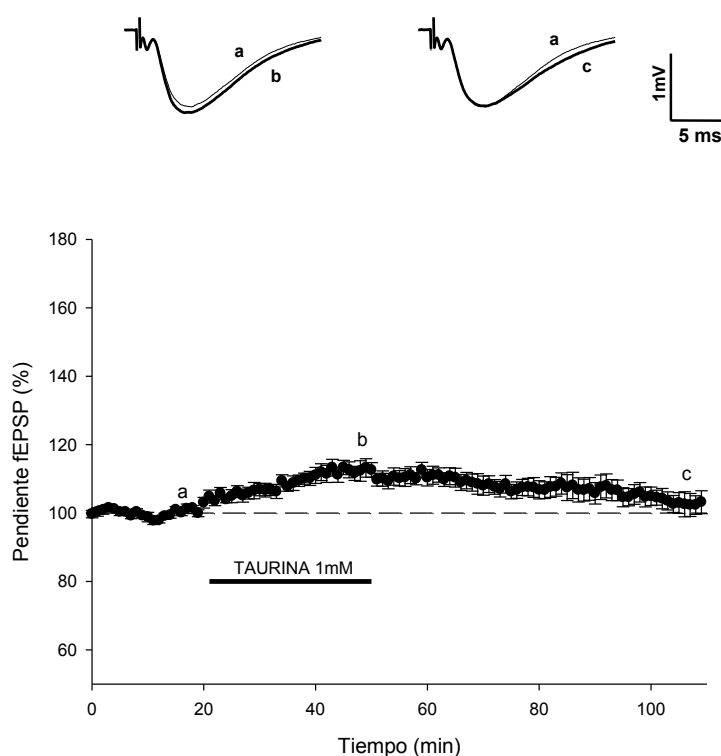


Figura 4.2. La aplicación de taurina 1 mM produce cambios en el fEPSP que no perduran durante el lavado.

La aplicación de taurina 1 mM (barra negra) produce un pequeño aumento en la transmisión sináptica (b) que vuelve a valores basales durante la hora de lavado (c).

Para determinar si la acción conjunta de la taurina y la cafeína modifica el efecto sobre el fEPSP, aplicamos taurina 1 mM durante 30 minutos, junto con las mismas concentraciones de cafeína usadas anteriormente (Fig. 4.3).

RESULTADOS

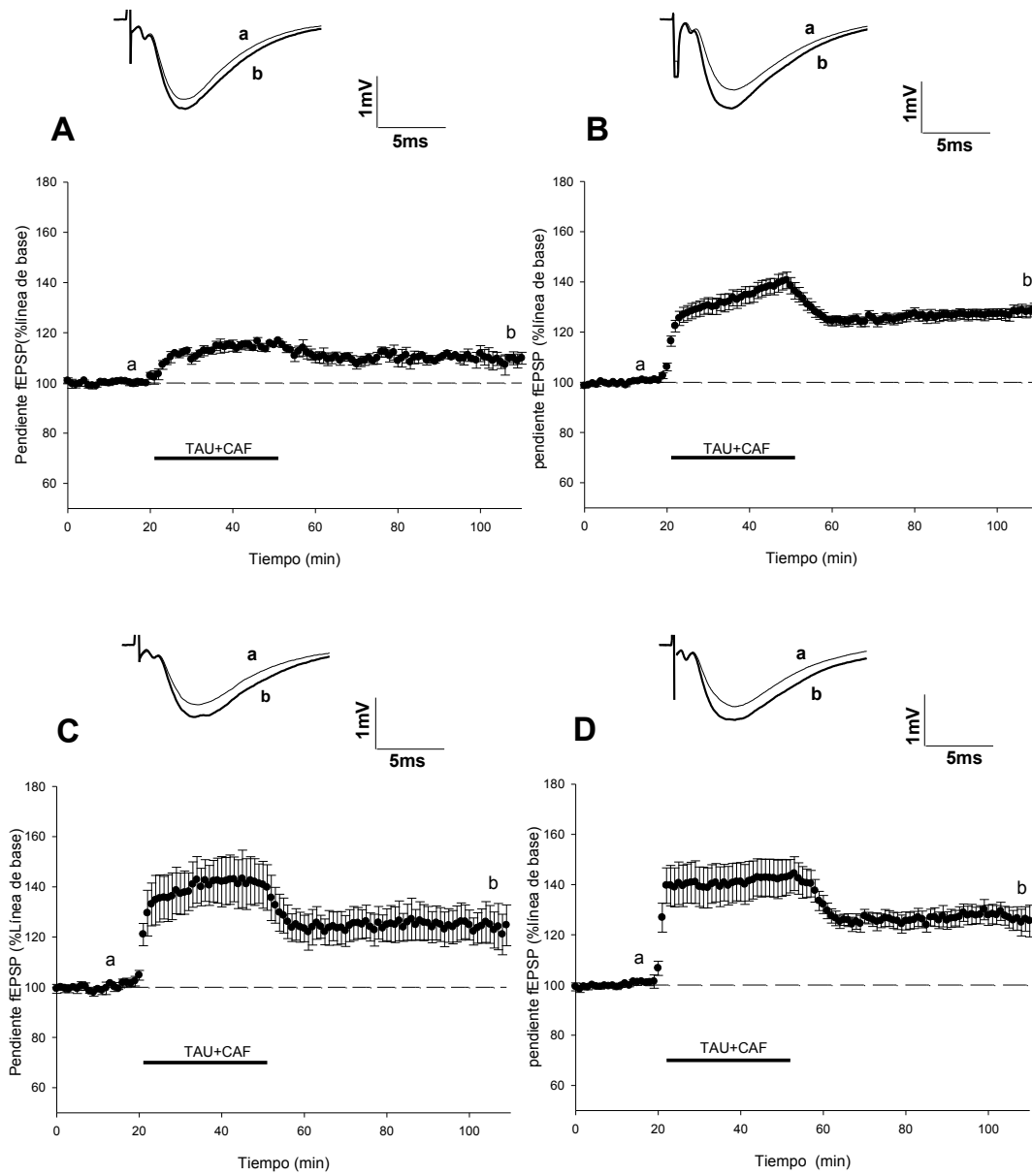


Figura 4.3. Efecto sinérgico sobre el fEPSP provocado por la coaplicación de taurina y cafeína. Curso temporal de los experimentos en los que aplicamos taurina (1 mM) en presencia de cafeína a una concentración de 20 μM (A; n=4); 50 μM (B; n=24); 100 μM (C; n=4) ó 1 mM (D; n=8). Las barras horizontales negras indican el tiempo de aplicación de ambas sustancias.

RESULTADOS

La coaplicación de taurina y cafeína provocó dos efectos en el fEPSP que se diferenciaron de la aplicación de cafeína sola. Primero, aumentó la potenciación del fEPSP durante la perfusión de ambas sustancias (taurina 1 mM y diferentes concentraciones de cafeína): Fig. 4.3A, 20 μ M, $115\pm 1\%$, $n=4$; Fig. 4.3B, 50 μ M, $139\pm 3\%$, $n=24$; Fig. 4.3C, 100 μ M, $142\pm 9\%$, $n=4$; Fig. 4.3D, 1 mM, $143\pm 7\%$, $n=8$. Y segundo, provocó el mantenimiento de esta potenciación durante el periodo de lavado: Fig. 4.3A, 20 μ M, $110\pm 3\%$; Fig. 4.3B, 50 μ M, $128\pm 2\%$; Fig. 4.3C, 100 μ M, $124\pm 8\%$; Fig. 4.3D; 1 mM, $128\pm 4\%$. Ambos efectos ponen de manifiesto la existencia de una acción sinérgica desencadenada por la aplicación concomitante de taurina y cafeína.

En la figura 4.4 se muestra que la sinergia se produce en ambos efectos a partir de una concentración de cafeína de 50 μ M durante su aplicación (Fig. 4.4A, 20 μ M, $p>0,05$; 50 μ M, $p<0,001$; 100 μ M, $p<0,05$; 1 mM, $p<0,001$); y a los 60 minutos de lavado (Fig. 4.4B, 20 μ M, $p>0,05$; 50 μ M, $p<0,0001$; 100 μ M, $p<0,05$; 1 mM, $p<0,001$). Además se observa que con concentraciones de cafeína más elevadas no se obtiene una potenciación sináptica adicional.

En el presente trabajo nos proponemos desentrañar los mecanismos implicados en estos efectos sinérgicos causados por la coaplicación de taurina y cafeína.

RESULTADOS

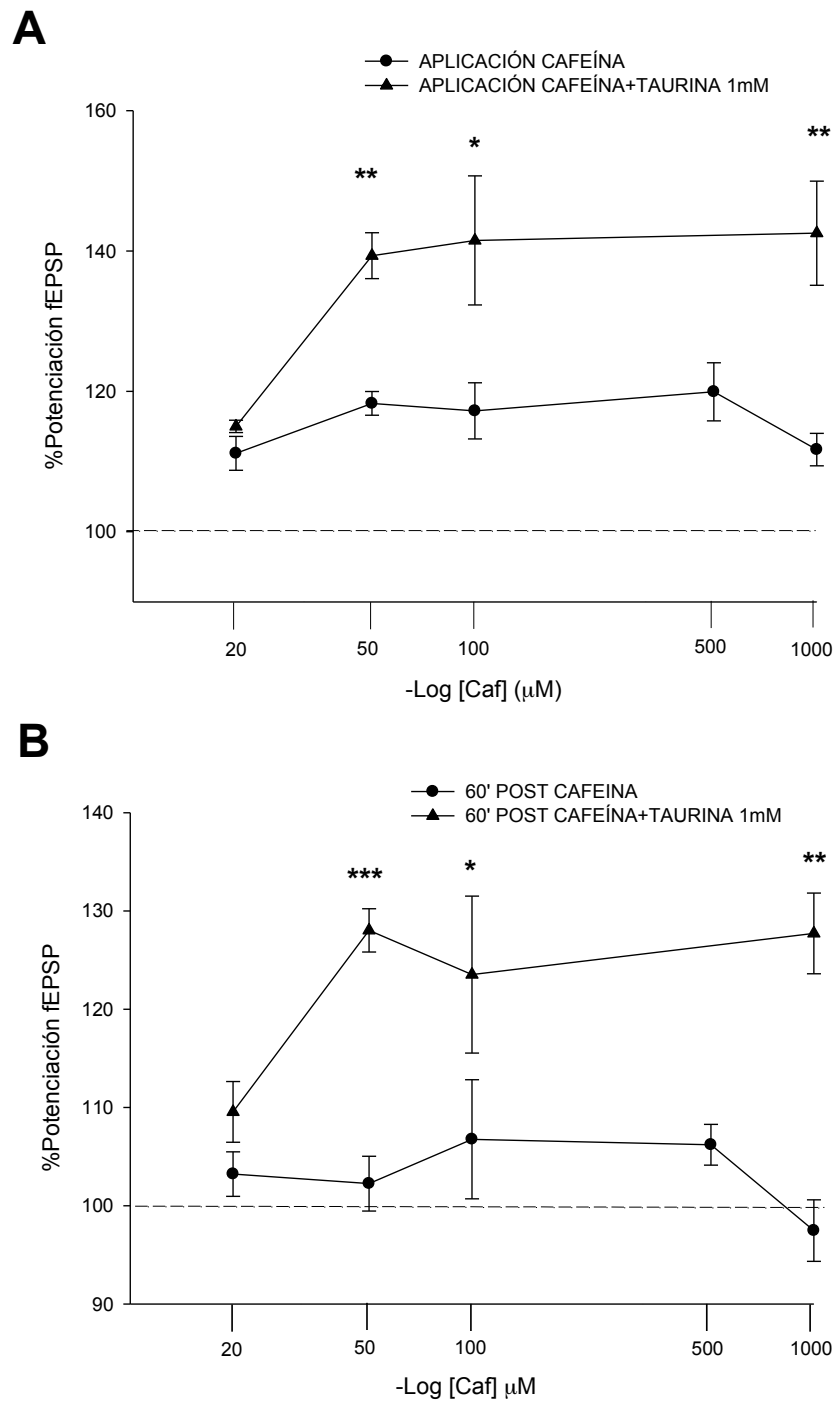


Figura 4.4. Curvas dosis-respuesta del efecto provocado en el fEPSP por la aplicación de cafeína sola o en presencia de taurina.

Curvas dosis-respuesta comparando la potenciación producida frente a la aplicación de concentraciones crecientes de cafeína (●) o frente a la aplicación de cafeína más taurina (▲). (A) Promedio del valor de la pendiente del fEPSP en los cinco últimos minutos de la aplicación con distintas concentraciones de taurina y cafeína 1 mM, y (B) durante los cinco últimos minutos de lavado, donde podemos observar que las diferencias son significativas siendo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$.

RESULTADOS

4.1.1 Análisis de los cambios presinápticos inducidos por la perfusión de taurina y cafeína

La potenciación del fEPSP obtenida en los experimentos anteriores puede representar un aumento de la eficacia sináptica o ser debida a una facilitación en el reclutamiento de las fibras presinápticas, por ello analizamos si la amplitud del FV cambiaba en los experimentos de aplicación de cafeína, taurina o de taurina y cafeína juntas.

El FV es un potencial extracelular que corresponde al disparo sincrónico de potenciales de acción en los axones de las colaterales de Schaffer y cuya amplitud refleja el número de fibras que se activan a la vez.

Cuando perfundimos taurina 1 mM (Fig. 4.5B, n=6), no se produjeron cambios en la amplitud del FV, ni durante su aplicación ni durante la hora de lavado como en publicaciones anteriores (*Galarreta y cols., 1996*). Tampoco se observaron cambios en la amplitud del FV en los experimentos en los que se perfundió cafeína 50 mM (Fig. 4.5A, n=7), ni en los que se co-aplicó taurina 1 mM y cafeína 50 mM (Fig.4.5C n=8; $102 \pm 2\%$ durante su aplicación y $106 \pm 2\%$ tras 60 minutos de lavado).

Por otro lado, el incremento de la eficacia sináptica puede ser debido a un aumento de la cantidad de glutamato liberado presinápticamente, a un aumento en el número o sensibilidad de los receptores postsinápticos de glutamato, o a ambos mecanismos. Para comprobar si los cambios en la amplitud del fEPSP son debidos a un aumento de la eficacia presináptica, aplicamos un protocolo de facilitación por pares de pulsos (PPF) en presencia de cafeína sola o de taurina con cafeína (Fig.4.6). Está ampliamente aceptado (*Isaacson y cols.; 1993; Manabe y cols., 1993*) que la PPF es un paradigma experimental que permite detectar cambios en la liberación de neurotransmisor. En presencia de cafeína 50 mM (Fig. 4.6) el cociente

RESULTADOS

del segundo pulso respecto al primero disminuyó significativamente ($n=5$, $p<0.05$) y lo mismo ocurrió cuando aplicamos taurina 1 mM más cafeína 50 mM ($n=6$; $p<0.01$).

Durante el lavado el cociente recuperó sus valores basales.

Con estos experimentos demostramos que la reducción en el cociente producida en presencia de taurina y/o cafeína es igual en ambos casos, llegando a la conclusión que es debido a la acción de la cafeína sobre los receptores presinápticos de adenosina, lo que ha sido descrito previamente por numerosos autores (*Thompson y cols., 1992*).

RESULTADOS

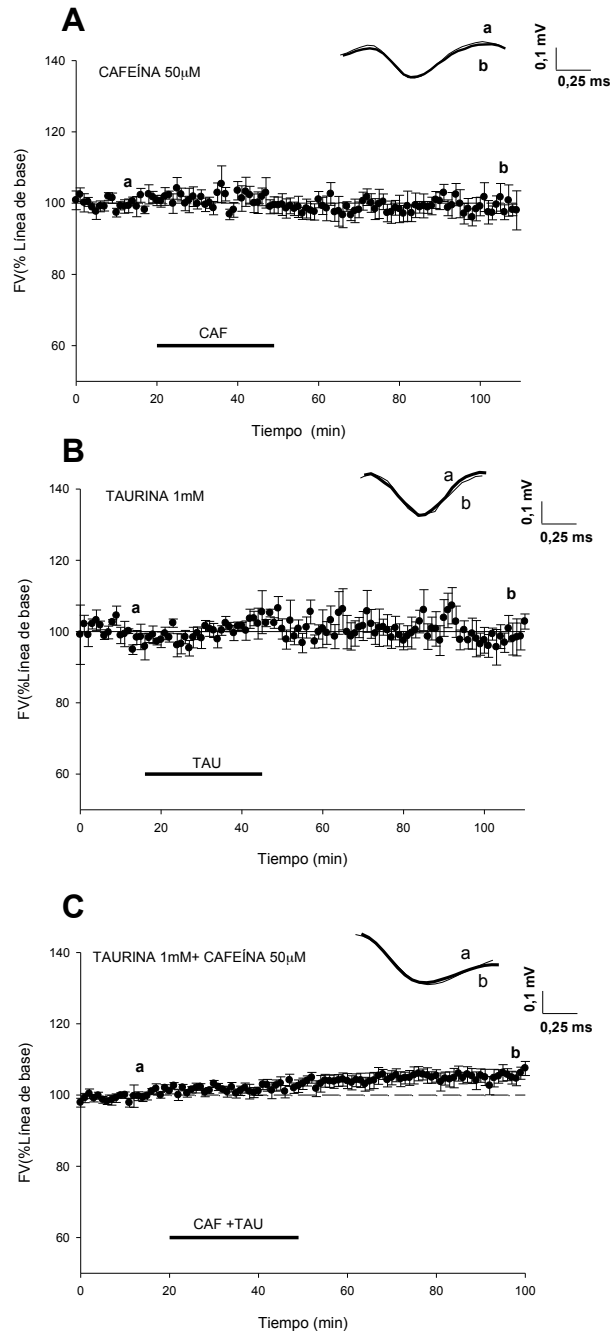


Figura 4.5. La coaplicación de taurina y cafeína no tiene efecto sobre el FV.

Los trazados superiores aquí y en las figuras siguientes corresponden a los FV representativos (8 trazados consecutivos) registrados a los tiempos indicados con las letras en las figuras.

Curso temporal de los experimentos en los cuales se indica, con barras horizontales negras, el tiempo de la aplicación de las sustancias señaladas sobre ellas.

(A) La aplicación de cafeína 50 μ M no tiene efectos sobre el FV (n=7; p>0,05).

(B) La aplicación de taurina 1 mM tampoco tiene efectos sobre el FV (n=6; p>0,05).

(C) Cuando coaplicamos taurina 1 mM y cafeína 50 μ M tampoco observamos cambios significativos en el FV (n=8; p>0,05).

RESULTADOS

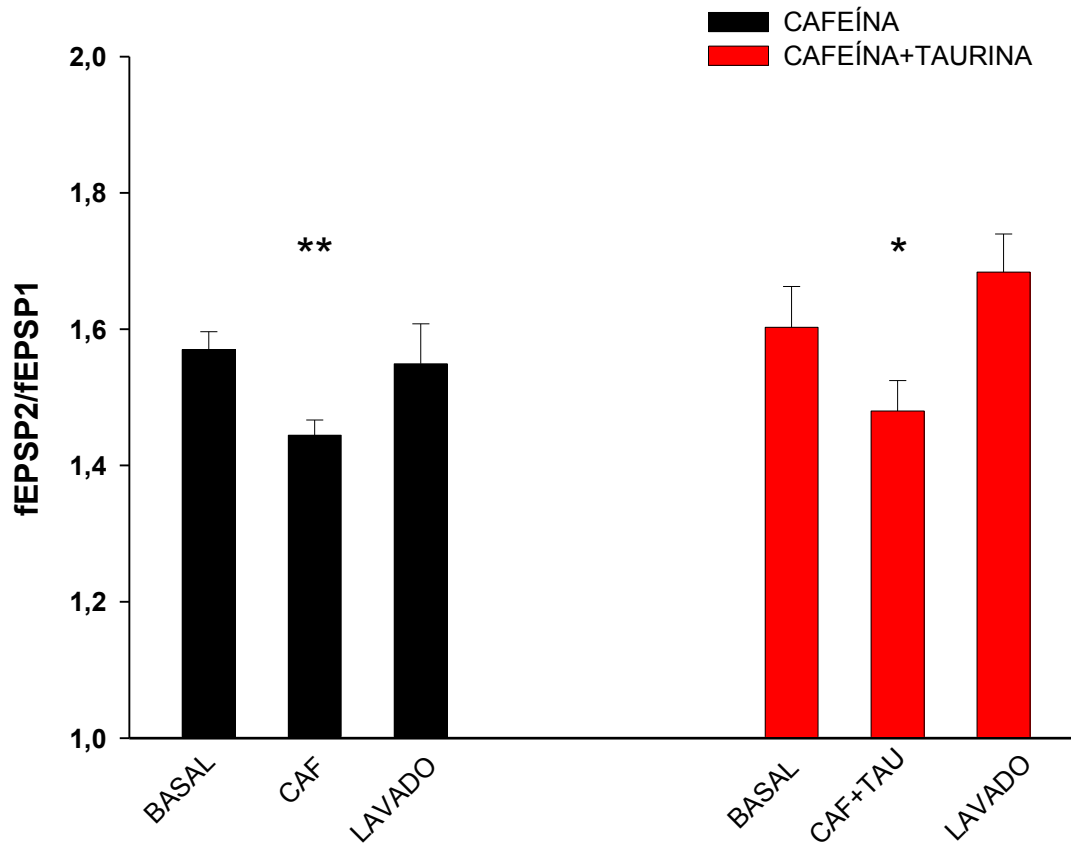


Figura 4.6. Efecto de la perfusión de cafeína sola o en presencia de taurina sobre la facilitación de pares de pulsos.

Media de los cocientes obtenidos en los pares de pulsos aplicados durante cinco minutos en los siguientes periodos: al final de la línea de base, al final de la aplicación (CAF / CAF+TAU) y al final del lavado. En presencia de cafeína 50 μ M (barras negras) la PPF disminuyó (** $p < 0,001$), volviendo a los valores basales en el periodo de lavado. Un efecto similar se observó cuando se perfundió cafeína 50 μ M y taurina 1 mM (barras rojas; * $p < 0,05$).

RESULTADOS

4.1.2 La aplicación de taurina y cafeína también produce un aumento duradero del EPSP registrado intracelularmente

Para descartar que los cambios observados no eran debidos a una acción inespecífica de la coaplicación de taurina y cafeína, como por ejemplo cambios en la resistividad del medio extracelular, realizamos una serie de experimentos (n=6) registrando intracelularmente los potenciales sinápticos con micropipetas de alta resistencia.

Como se puede observar en la Figura 4.7, la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M durante 30 minutos aumentó la pendiente del EPSP ($140\pm 3\%$) manteniéndose dicha potenciación durante al menos 20 minutos de lavado ($141\pm 18\%$; $p < 0,05$).

La perfusión de taurina y cafeína no produjo cambios en el potencial de membrana ni en la resistencia de entrada de las neuronas registradas ($p > 0,05$).

Estos resultados demuestran que la potenciación provocada por la coaplicación de taurina y cafeína también se puede observar en el potencial sináptico intracelular, y que dicha potenciación no está acompañada por cambios en el potencial de membrana ni en la resistencia de entrada.

RESULTADOS

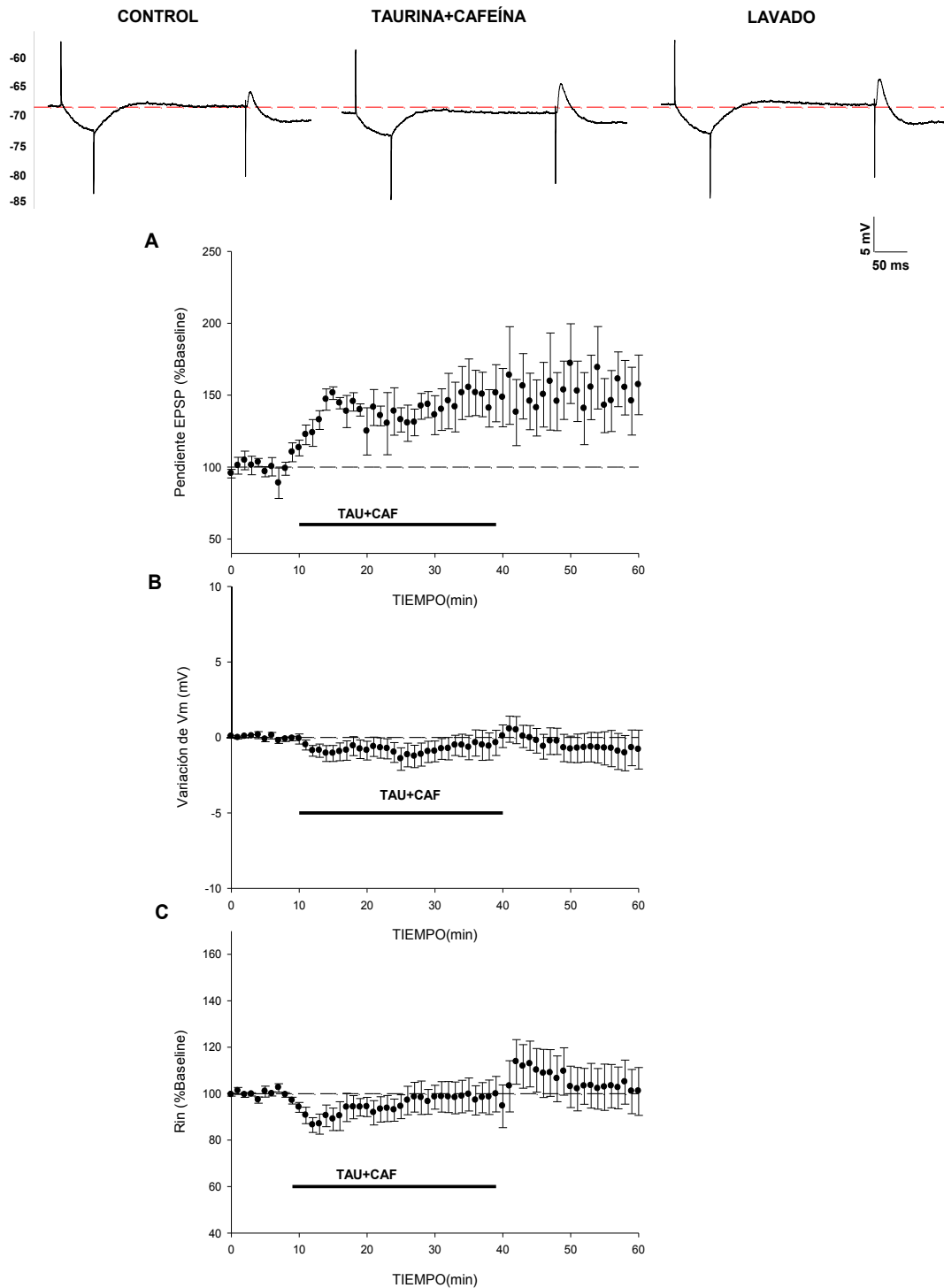


Figura 4.7. Registro intracelular. La aplicación de taurina y cafeína provoca una potenciación duradera sobre el EPSP.

En la línea superior se muestran los trazados obtenidos en un experimento representativo.

Las Figuras A, B y C muestran los resultados promedio obtenidos en los registros intracelulares hechos en el soma de las células piramidales en la región CA1 (n=6).

(A) El EPSP aumentó en presencia de taurina y cafeína de manera significativa ($p < 0,05$) y permaneció potenciado durante el lavado. (B) El potencial de membrana disminuyó ligeramente durante la perfusión de taurina y cafeína aunque los cambios no fueron significativos ($p > 0,05$) y (C) la resistencia de entrada tampoco cambió durante la perfusión de ambas sustancias ($p > 0,05$).

4.2 La potenciación inducida por la aplicación de taurina y cafeína es imitada y ocluida por los inhibidores de los receptores de adenosina A1 y A2_A

Es bien conocido que una de las principales dianas de la cafeína y sus derivados en el sistema nervioso central son los receptores de adenosina donde estas sustancias actúan como antagonistas (*Fredholm y cols., 1999*). Para comprobar si la inhibición de estos receptores está implicada en la potenciación inducida por taurina y cafeína, realizamos una serie de experimentos en los que aplicamos dos inhibidores de los receptores de adenosina A1 y A2_A, DPCPX (50 nM) y ZM241385 (100 μM), respectivamente.

La perfusión de los inhibidores de los receptores de adenosina A1 y A2_A durante todo el experimento (Fig. 4.8A), tanto de manera individual como conjunta, provocó un aumento duradero del fEPSP (120±5% y 117±3% para DPCPX y ZM241385 respectivamente; p<0,01). Una vez comprobado el efecto de los inhibidores de adenosina sobre el fEPSP, pasamos a determinar si los receptores de adenosina participan en los mecanismos de potenciación sináptica provocados por taurina y cafeína.

En presencia de las mismas concentraciones de ZM241385 y DPCPX perfundimos cafeína 50 μM (Fig. 4.8B, n=4). En esas condiciones la aplicación de cafeína no provocó potenciación alguna del fEPSP (99±3%) permaneciendo también en valores basales durante la hora de lavado (97±4%). Esto indica que el efecto producido por la cafeína sobre el fEPSP es debido a su acción inhibitoria sobre los receptores adenosina de tipo A1 y A2_A, siendo ocluido dicho efecto en presencia de ambos antagonistas.

RESULTADOS

Por otra parte, realizamos una serie de experimentos en los que ensayamos si los antagonistas de los receptores de adenosina también ocluían el efecto producido por taurina y cafeína. Como se puede apreciar en la figura 4.9, la presencia de los antagonistas de los receptores de adenosina de tipo A1 (DPCPX, 50 nM; Fig. 4.9 A1; n=4), A_{2A} (ZM241385, 100 μM; Fig. 4.9 B1; n=3) y de ambos (DPCPX y ZM241385; Fig. 4.9 C1; n=7) producía un incremento duradero en el fEPSP (119±5%, 117±4% y 115 ±3%, respectivamente) que se estabilizó durante los 50 minutos de perfusión de los antagonistas.

RESULTADOS

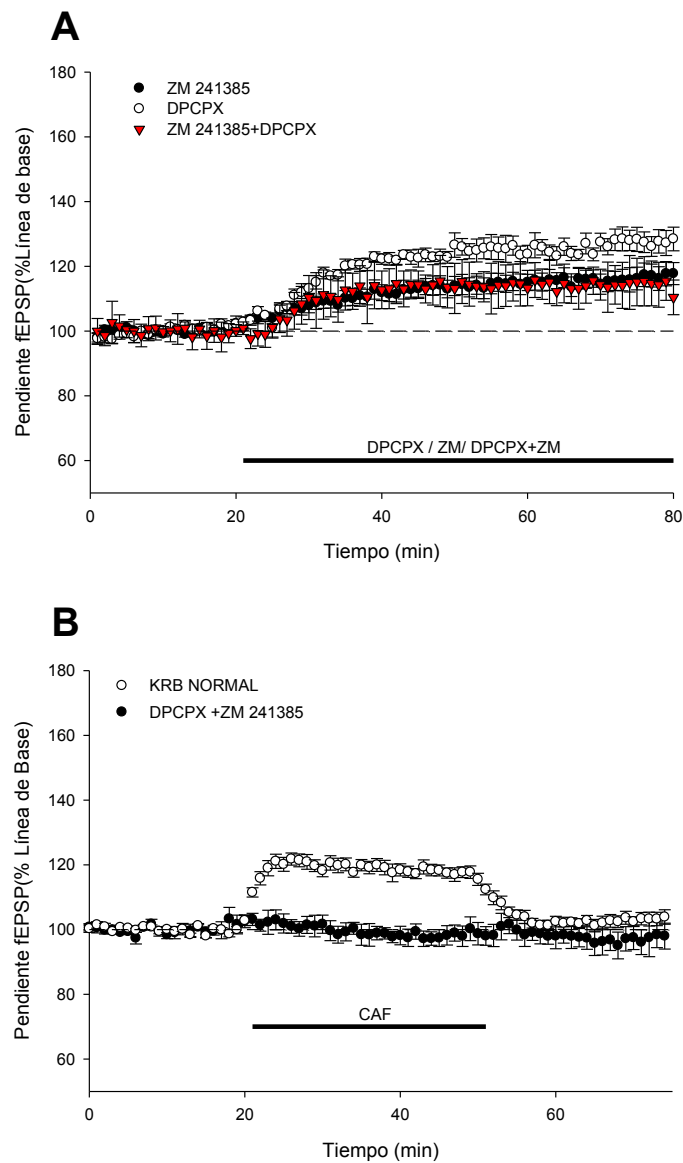


Figura 4.8. Efecto de los antagonistas de adenosina sobre la transmisión sináptica.

(A) Efecto de la aplicación de DPCPX y ZM 241385 sobre la transmisión sináptica. La aplicación de DPCPX 50 nM (○, n=6) durante 60 minutos ($120 \pm 5\%$, $p < 0,01$). ZM241385 100 μ M durante 60 minutos (●, n=16) produce una potenciación duradera ($117 \pm 3\%$) respecto a la línea de base ($p < 0,001$) similar a cuando coaplicamos ambos ($115 \pm 3\%$) durante el mismo tiempo (▲, n=6, $p < 0,01$).

(B) La aplicación de cafeína en presencia de DPCPX y ZM241385 no produce cambios en la transmisión sináptica. Curso temporal donde se muestra que el efecto de la perfusión de cafeína 50 μ M (●, n=4) sobre el fEPSP desaparece cuando la aplicamos en presencia de DPCPX y ZM241381 (a concentraciones de 50 nM y 100 μ M respectivamente) comparándolo con el efecto provocado en ausencia de dichos inhibidores (○, n=11). Para comparar ambas condiciones se reescaló a línea de base el aumento producido por ambos inhibidores.

RESULTADOS

Si consideramos el efecto potenciador producido por los antagonistas de los receptores de adenosina como 100% y comparamos la potenciación producida por taurina y cafeína con la inducida en presencia de los inhibidores de adenosina, observamos que se produce un aumento del fEPSP (Fig. 4.9 A2, B2 y C2) menor que el producido por la perfusión de taurina y cafeína en ausencia de antagonistas, tanto durante la aplicación ($109\pm 7\%$ para el DPCPX, $117\pm 4\%$ para ZM241385 y $114\pm 2\%$ para ambos) como durante el lavado ($106\pm 7\%$, $107\pm 4\%$ y $108\pm 3\%$, respectivamente; $p < 0,01$). En todos los casos tanto la aplicación de los antagonistas de receptores de adenosina tipo A1 (DPCPX) como los de tipo A_{2A} (ZM241385) imitan y producen un incremento de los potenciales sinápticos que ocluye la potenciación producida por la coaplicación de taurina y cafeína ($p < 0,5$).

Hicimos una serie de experimentos para determinar si al aplicar taurina (Fig. 4.10, $n=3$) en presencia de los antagonistas para los receptores de adenosina de tipo A1 y A_{2A} (DPCPX 50 nM y ZM241385 100 μ M, respectivamente) también obteníamos un aumento el fEPSP. La aplicación de taurina concomitantemente con estos dos antagonistas, aumentó el fEPSP ($133 \pm 7\%$) de manera similar a cuando aplicamos taurina y cafeína ($139\pm 3\%$, $p > 0,5$ cuando comparamos las dos condiciones) y se mantuvo potenciado durante al menos 60 minutos de lavado ($130\pm 4\%$).

Estos resultados indican que la potenciación duradera producida por la aplicación de taurina y cafeína son debidos a un efecto sinérgico desencadenado por la acción inhibitoria de la cafeína sobre receptores de la adenosina y a la acción de la taurina sobre una diana molecular desconocida.

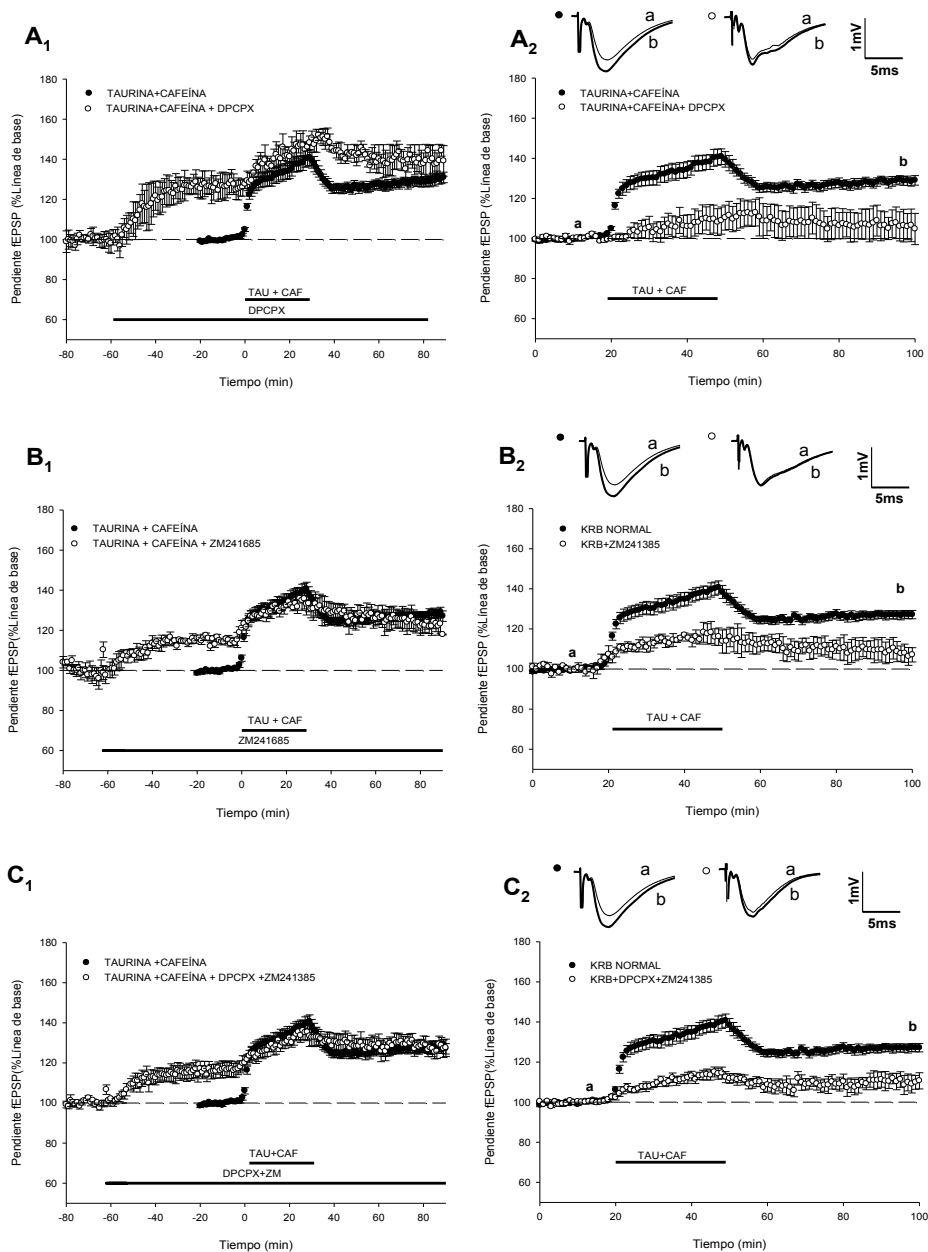


Figura 4.9. Los inhibidores de los receptores de adenosina de tipo A1 y A2A (DPCPX y ZM241385, respectivamente) imitan y ocluyen la potenciación sináptica inducida por la aplicación de taurina y cafeína.

Los datos representados por los círculos negros corresponden a los experimentos de perfusión de taurina y cafeína en una disolución estándar (●, n=24).

(A1) Curso temporal del efecto de la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M en presencia de DPCPX 50 nM (○) sobre la pendiente del fEPSP (n=4). (A2) El mismo experimento que A1 pero considerando la potenciación causada por el DPCPX como 100%.

(B1) Efecto de la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M en presencia del antagonista de receptores de adenosina de tipo A2A, ZM241385 100 μ M (○, n=3) sobre la pendiente del potencial sináptico. (B2) El mismo experimento pero tomando como 100% el efecto producido sobre el fEPSP al perfundir ZM241385.

(C1) Cursos temporales de la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (○, n=7) preincubando durante 60 minutos con los antagonistas para receptores de adenosina de tipo A1 y A2A (DPCPX y ZM241385). (C2) El mismo experimento pero tomando como línea de base el aumento producido sobre el fEPSP al perfundir ambos antagonistas.

RESULTADOS

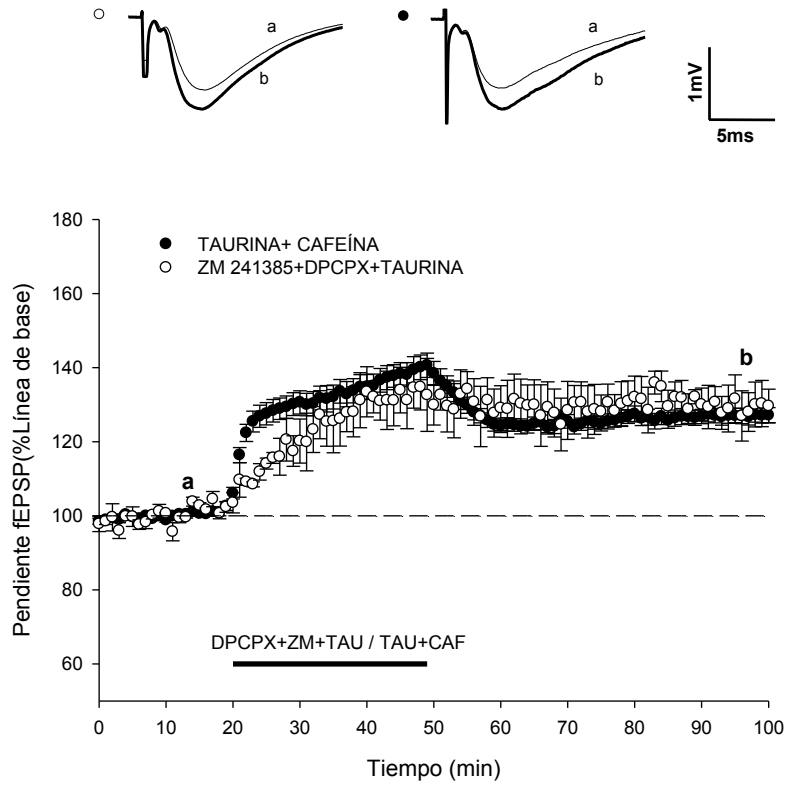


Figura 4.10. La aplicación de taurina en presencia de los antagonistas de los receptores de adenosina de tipo A1 y A2A produce una potenciación duradera de fEPSP.

Comparación de los cursos temporales de la aplicación de DPCPX 50 nM, ZM 241385 100 μ M y taurina 1 mM (\circ , n=3) frente a taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (\bullet , n=24).

RESULTADOS

4.2.1 La aplicación de un agonista para los receptores de adenosina tipo A_{2A} junto con taurina produce un aumento duradero del fEPSP

Diversos autores han descrito a la cafeína como un antagonista de los receptores de adenosina de tipo A_{2A} además de los receptores de adenosina de tipo A₁ (*Fredholm y cols., 1999*). Los receptores A_{2A} y A₁ actúan activando e inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa respectivamente.

Realizamos una serie de experimentos en los que activamos los receptores de adenosina de tipo A_{2A} aplicando un agonista selectivo (CGS21680). El objetivo era saber si la activación de dicho receptor, en presencia de taurina, producía cambios en el fEPSP. El agonista no provocó cambios en la transmisión sináptica basal cuando se aplicó durante 30 minutos (Figura 4.11 A, n=4).

Al perfundir juntos CGS21680 50 nM y taurina 1 mM durante 30 minutos aumentó el fEPSP (129±6%), permaneciendo potenciado durante al menos una hora tras retirar ambas sustancias (128±6%). Dicha potenciación fue estadísticamente indistinguible de la producida por la perfusión de taurina y cafeína (p>0,05).

Al aplicar CGS21680 50 nM junto con taurina 1 mM en presencia de un inhibidor para dichos receptores, ZM241385 200 nM (Fig. 4.11 B, n=6), el fEPSP aumentó ligeramente (116±3%) durante la aplicación de taurina y CGS21680, volviendo a los valores basales (106±4%) al lavar las sustancias del medio durante al menos una hora. Dicha potenciación transitoria es indistinguible de la provocada al aplicar solo taurina 1 mM (p>0,05).

Estos resultados nos llevan a proponer que la activación de la adenilato ciclasa, ya sea por una activación de receptores A_{2A} o por una inhibición de los A₁, provoca en presencia de taurina un aumento de la eficacia sináptica.

RESULTADOS

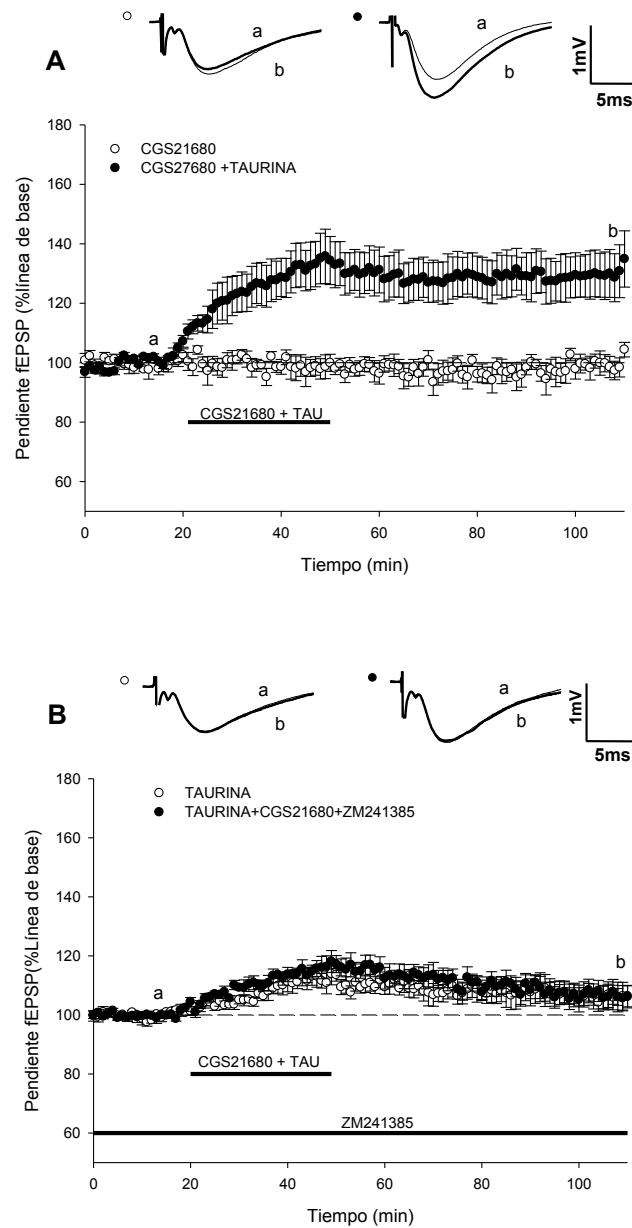


Figura 4.11. La aplicación de taurina en presencia de un agonista de los receptores de adenosina A_{2A} produce un aumento duradero del fEPSP.

(A) Cuando se aplicó CGS21680 a una concentración de 50 nM durante 30 minutos no se obtuvieron cambios en la actividad sináptica basal (○, n=4). Efecto de la coaplicación con taurina 1 mM (●, n=9).

(B) La potenciación inducida por CGS21680 y taurina es inhibida por el antagonista específico A_{2A}, ZM241385 200 nM (●, n=6) siendo indistinguible de la producida por taurina 1 mM sola (○, n=10).

4.3 La potenciación inducida por taurina y cafeína requiere actividad sináptica

El mecanismo por el cual los potenciales sinápticos aumentan cuando co-aplicamos taurina y cafeína, podría tener puntos en común con los demostrados para la LTP inducida por estimulación sináptica con trenes de estímulos eléctricos de alta frecuencia (*Kandel, 2001*).

El calcio es necesario para muchos de los fenómenos de potenciación duradera y de plasticidad sináptica, y ha sido estudiado en los fenómenos de la LTP provocados por trenes de estímulos eléctricos de alta frecuencia, demostrándose que está implicado en la inducción del proceso tanto en la célula presináptica como, en particular, en la célula postsináptica a través de receptores de glutamato permeables a calcio (*Bliss y Collingridge, 1993*).

Por ello estudiamos si la potenciación duradera producida por la aplicación de taurina y cafeína depende de la presencia de calcio en el medio extracelular. Para ello, lo eliminamos de la disolución de perfusión y añadimos 100 μM de EGTA, un quelante de calcio (Fig. 4.12, $n=6$). Cuando la señal se estabilizó en KRB normal, profundimos la disolución sin calcio durante 20 minutos, lo que hizo desaparecer la respuesta sináptica totalmente.

En estas condiciones co-aplicamos taurina y cafeína durante 30 minutos, tras los cuales se procedió a lavar en un medio normal con calcio. Durante el lavado la señal volvió a sus valores basales ($109\pm 6\%$) lo que indica que la ausencia de calcio extracelular impide la potenciación producida por la aplicación de taurina y cafeína.

RESULTADOS

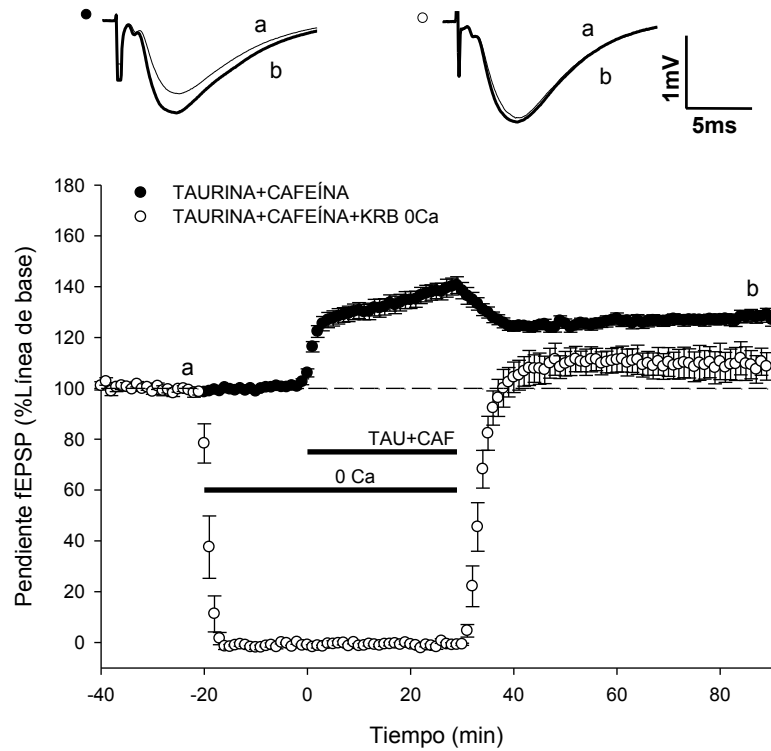


Figura 4.12. La ausencia de calcio en el medio impide la potenciación sináptica producida por la coaplicación de taurina y cafeína.

Efecto de la coaplicación de taurina 1mM y de cafeína 50 μ M en presencia (○, n=24) y en ausencia (●, n=6) de calcio; $p < 0,001$ cuando comparamos el periodo de lavado en presencia y en ausencia de calcio.

RESULTADOS

Además del calcio proveniente del espacio extracelular, el aumento de la concentración de calcio intracelular puede deberse, en parte, a su liberación desde el retículo endoplasmático a través de canales de calcio de rianodina o de receptores IP3 (Garaschuk y cols., 1997). Cabe preguntarse si la potenciación sináptica producida por taurina y cafeína depende de la liberación de calcio desde reservorios intracelulares.

Para determinarlo, aplicamos cafeína 50 mM y taurina 1 mM en presencia de ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa presente en el retículo, a una concentración de 10 mM (Figura 4.13, n=5). En estos experimentos la taurina y cafeína aumentaron el fEPSP en un $114\pm 1\%$, una cifra significativamente menor ($p < 0,01$) que en ausencia de CPA ($139\pm 3\%$). Además, la presencia de CPA hizo que durante el lavado la potenciación volviese a línea de base ($99\pm 3\%$).

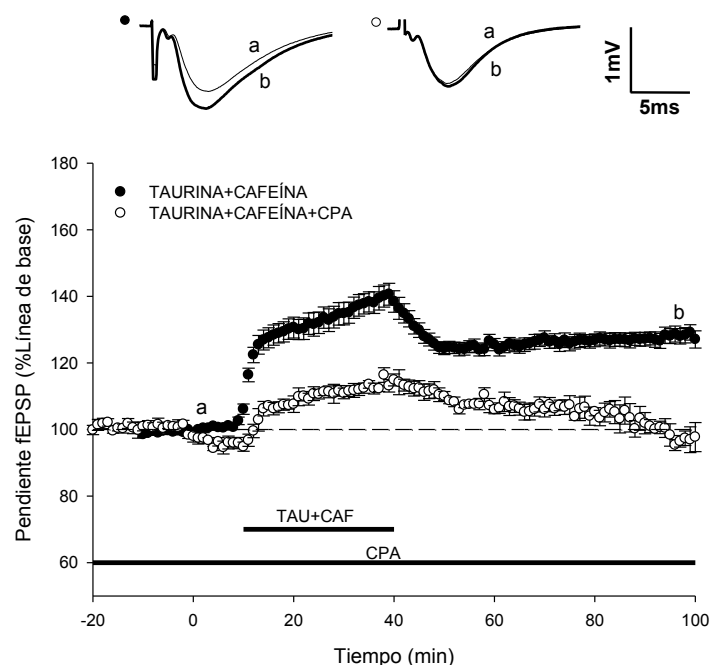


Figura 4.13. La potenciación duradera inducida por taurina y cafeína depende de la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares de calcio.

Curso temporal de la potenciación del fEPSP provocada por la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (●, n=24). La presencia de CPA 10 μ M impide dicha potenciación (○, n=5).

RESULTADOS

Dado que la falta de calcio extracelular interrumpe la transmisión sináptica, en otro grupo de experimentos nos planteamos si el aumento del fEPSP provocado por taurina y cafeína dependía de la actividad sináptica provocada.

En estos experimentos (Fig. 4.14; n=4) estimulamos durante 20 minutos de manera habitual (1 pulso cada 15 s) y dejamos de estimular durante los 30 minutos de perfusión de taurina y cafeína. Diez minutos después de retirar la taurina y la cafeína del medio se volvió a estimular hasta el final del lavado. Como se puede observar en la figura 4.14, el fEPSP cae a línea de base ($102\pm 3\%$) durante el lavado, lo que indica que se requiere estimulación sináptica durante la aplicación de taurina y cafeína para producir potenciación sináptica duradera.

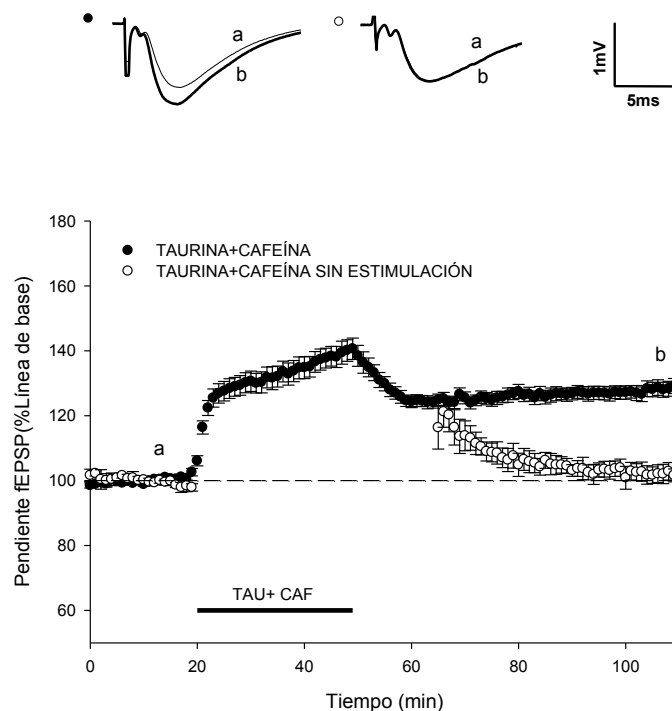


Figura 4.14. La falta de estimulación sináptica impide la potenciación del fEPSP.

Curso temporal que muestra la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M en ausencia de estimulación (○, n=4) frente a la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (●, n=24) en condiciones normales.

RESULTADOS

Esta dependencia de la actividad sináptica se ha observado también en los fenómenos de la LTP e indica que se necesita la presencia del neurotransmisor glutamato para la inducción del fenómeno de potenciación. En los fEPSP que registramos en nuestro sistema experimental, el componente debido a la activación de receptores AMPA representa más de un 90% de la respuesta sináptica. Este componente se potencia en la LTP tetánica gracias a la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA.

Por ello determinamos si los receptores de glutamato estaban implicados en la potenciación duradera del fEPSP provocada por la aplicación de taurina y cafeína (Fig. 4.15). Para ello perfundimos ácido kinurénico 2 mM, un antagonista inespecífico para los receptores de glutamato tanto AMPA como NMDA, (Fig. 4.15 A, n=5). En presencia de dicho antagonista, la respuesta sináptica desapareció ($14\pm 2\%$) recuperándose durante el periodo de lavado ($113\pm 10\%$), no provocando una potenciación duradera del fEPSP, siendo estadísticamente significativa la diferencia con el grupo control ($p < 0,05$). En otro grupo de experimentos estudiamos si estaba involucrado el receptor de glutamato tipo NMDA. Para ello utilizamos un antagonista específico para este tipo de receptores (DL-AP5, 100 μ M). Al aplicar taurina y cafeína en presencia de DL-AP5 (Fig. 4.15 B, n=5), el fEPSP aumentó de manera similar a la provocada por taurina y cafeína en ausencia del antagonista ($136\pm 3\%$ y $139\pm 3\%$ en ausencia y presencia de DL-AP5, respectivamente; $p > 0,05$). El aumento del fEPSP permaneció durante al menos una hora tras retirar las sustancias del medio ($121\pm 4\%$; $p > 0,05$).

En resumen, los datos presentados demuestran que el aumento de la respuesta sináptica producida por la aplicación conjunta de taurina y cafeína depende de la activación de receptores de glutamato del tipo AMPA, pero no del tipo NMDA.

RESULTADOS

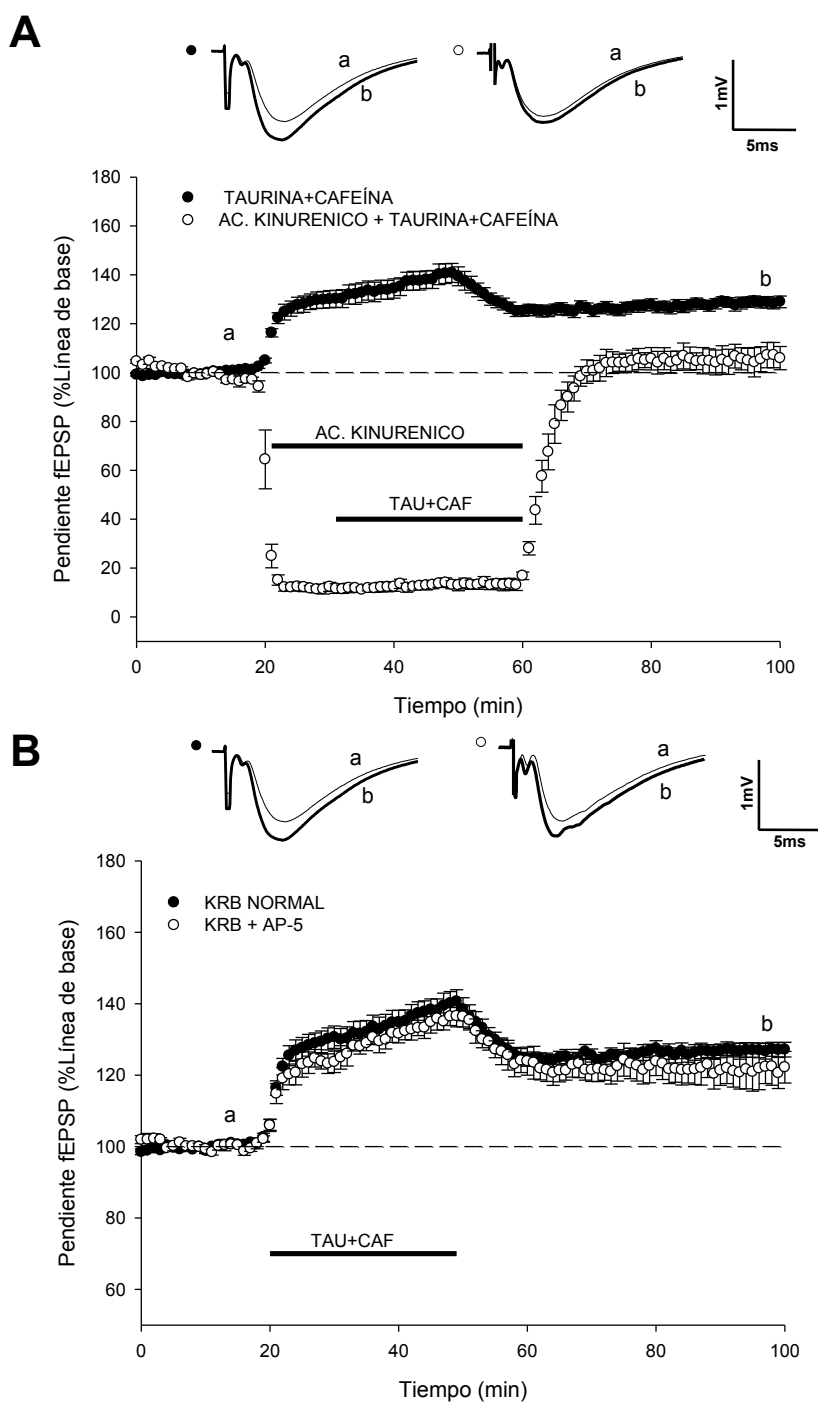


Figura 4.15. Efecto de la aplicación de antagonistas de receptores de glutamato sobre la potenciación inducida por la coaplicación de taurina y cafeína.

(A) Curso temporal que muestra el efecto de la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M en presencia de ácido kinurénico 2 mM (○, n=5) y la aplicación de taurina y cafeína solas (●, n=24).

(B) Efecto de un inhibidor específico de los receptores NMDA, DL- AP5 a una concentración de 100 μ M (○, n=5) sobre la potenciación provocada al aplicar taurina y cafeína.

4.4. La potenciación sináptica inducida por la aplicación de taurina y cafeína depende de la activación de receptores de ATP

En los experimentos anteriores hemos demostrado que la cafeína aumenta el fEPSP a través de la inhibición de los receptores de adenosina del tipo A1, que en varias estructuras cerebrales están activados tónicamente por la adenosina presente en el espacio extracelular. Dado que estos receptores se localizan en terminales glutamatérgicas, la cafeína al inhibirlos aumenta la probabilidad de liberación de glutamato.

Por otro lado, cuando la terminal nerviosa se despolariza, se libera ATP actuando como neurotransmisor y modulando la respuesta sináptica a través de receptores purinérgicos del tipo P2X y P2Y (*Zhang y cols., 2003; Burnstock y cols., 2011*). Por ello en otro grupo de experimentos estudiamos si la potenciación producida por la coaplicación de taurina y cafeína dependía de la activación de los receptores de ATP de tipo P2X.

Para ello aplicamos dos antagonistas de los receptores de ATP (Fig. 4.16), uno no selectivo para receptores purinérgicos de tipo P2 (suramina) y otro más específico para los receptores purinérgicos de tipo P2X (PPADS). En presencia de suramina 20 μ M, (Fig. 4.16 A, n=4), la taurina y la cafeína aplicadas durante 30 minutos aumentaron el fEPSP, aunque significativamente menos que cuando lo comparamos con los resultados obtenidos en ausencia del antagonista ($113\pm 4\%$ vs $139\pm 3\%$, en presencia y en ausencia de suramina; $p < 0,01$). Además, cuando retiramos estos compuestos del medio, el fEPSP volvió rápidamente a valores similares a los registrados durante el periodo basal ($104\pm 5\%$) manteniéndose así durante los 60 minutos de lavado.

RESULTADOS

En presencia de PPADS 20 μ M (Fig. 4.16 B, n=5), la aplicación de taurina y cafeína durante 30 minutos, provocó un aumento transitorio del fEPSP ($115\pm 7\%$) que volvió a los valores basales durante el lavado ($106\pm 4\%$).

Estos resultados indican que los receptores P2X participan en la potenciación sináptica inducida por taurina y cafeína.

En los experimentos mostrados en apartados anteriores demostramos que también se puede provocar potenciación sináptica aplicando un agonista para receptores A_{2A} y taurina. En otro grupo de rodajas estudiamos si esta potenciación también requería la activación de los receptores P2X (Fig. 4.17, n=4). Observamos que en presencia de PPADS 20 μ M, la potenciación producida por la aplicación conjunta de taurina 1 mM y CGS21680 50 nM fue significativamente menor ($108\pm 3\%$) que la conseguida con los experimentos control ($p < 0,05$). Al retirar ambos compuestos del medio, el fEPSP retornó a sus valores basales ($105\pm 4\%$).

Estos experimentos indican que la potenciación sináptica producida por la aplicación de taurina y un agonista A_{2A} requiere que se activen los receptores de ATP del tipo P2X.

RESULTADOS

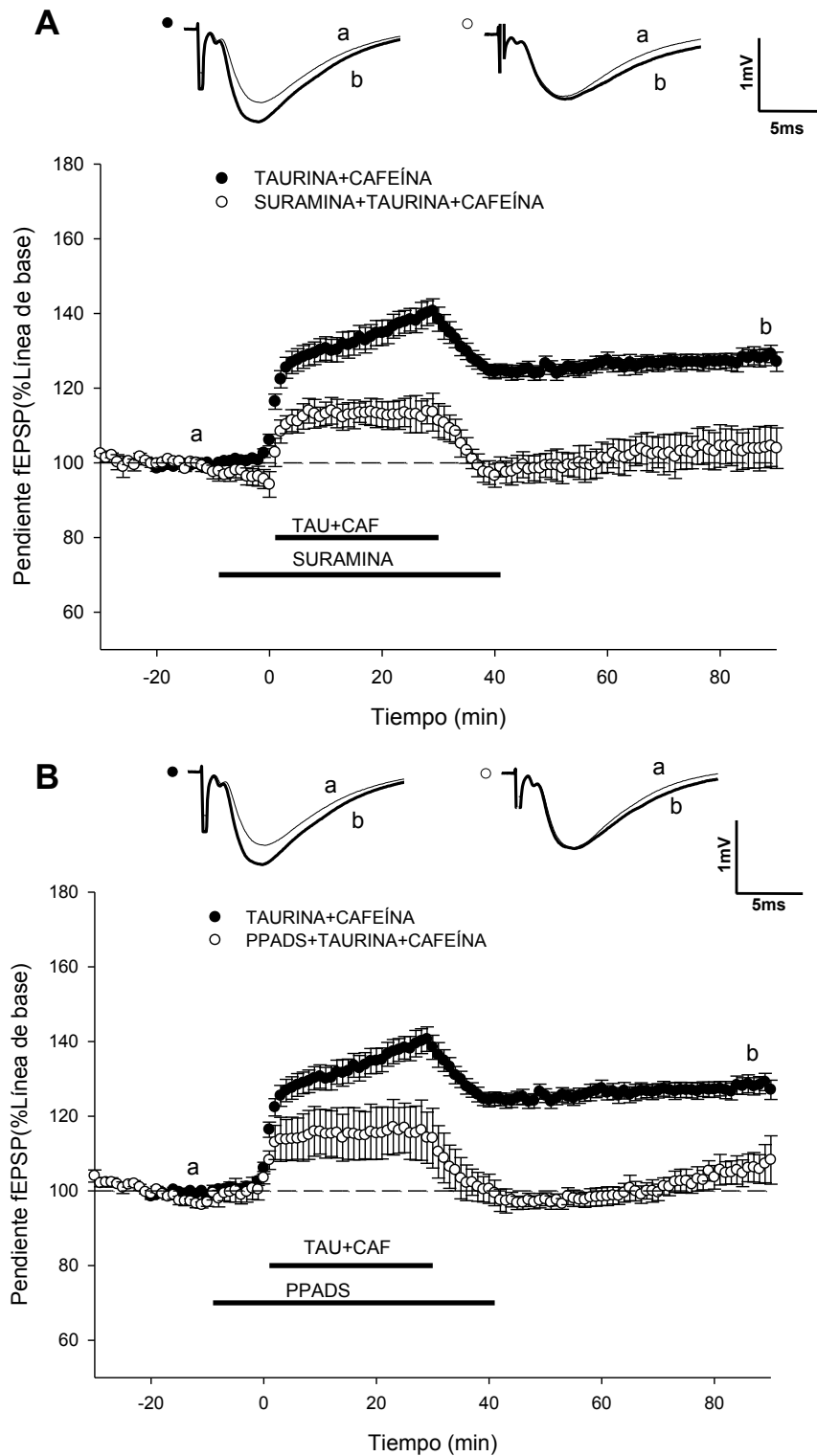


Figura 4.16. Efecto de la aplicación de antagonistas para receptores purinérgicos.

(A) La aplicación de un inhibidor inespecífico de los receptores purinérgicos del tipo P2, suramina 20 μM (○, n=4) impide la potenciación duradera inducida por la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μM (●, n=24).

(B) Cuando se perfunde un inhibidor específico para los receptores purinérgicos del tipo P2X, PPADS a una concentración de 20 μM (○, n=5), la potenciación inducida por la coaplicación de taurina y cafeína es transitoria.

RESULTADOS

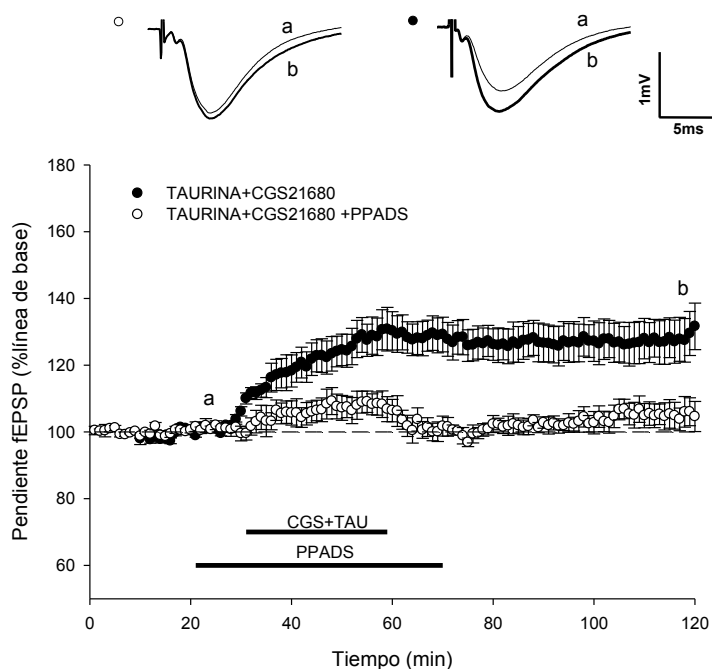


Figura 4.17. La potenciación duradera provocada al coaplicar CGS21680 y taurina depende de la activación de receptores purinérgicos del tipo P2X.

Efecto de la aplicación de un antagonista inespecífico de los receptores P2X (PPADS) a una concentración de 20 μ M sobre la potenciación inducida al coaplicar CGS21680 (50 nM) y taurina 1 mM (●, n=4). El antagonista inhibe la potenciación duradera producida por ambas sustancias (○, n=9).

Dado que la concentración de ATP en el espacio extracelular está modulada por las ectonucleotidasas presentes en el espacio extracelular, que degradan el ATP (Cunha y cols., 1998), estudiamos si el aumento de la actividad sináptica dependía de la concentración efectiva del ATP liberado en presencia de taurina y cafeína. Para ello aplicamos un antagonista de la ectonucleotidasa (ARL67156, 50 μ M) 10 minutos antes de la aplicación de taurina y cafeína (Fig. 4.18, n=4) y lo mantuvimos hasta 10 minutos después de la retirada de dichas sustancias del medio de perfusión. En presencia de taurina y cafeína, el fEPSP aumentó ($115 \pm 8\%$) aunque cuando lo comparamos con los experimentos control era significativamente menor ($p < 0,01$), siendo también significativamente menor respecto al periodo de lavado cuando se comparan ambas condiciones experimentales ($111 \pm 9\%$; $p < 0,05$).

RESULTADOS

Estos experimentos ponen de relieve que la potenciación provocada por taurina y cafeína se reduce cuando la actividad de la ectonucleotidasa está disminuida.

Lo que demuestra que tanto el ATP como su hidrólisis juegan un papel determinante para que se produzca la potenciación sináptica inducida por la taurina y la cafeína.

Se ha demostrado que el ATP puede ser liberado al medio extracelular por los astrocitos, siendo degradado rápidamente a adenosina por las ectonucleotidasas (Cunha y cols, 1998). La regulación de la transmisión sináptica por ATP se realiza a través de receptores purinérgicos de tipo P2X ionotrópicos o P2Y metabotrópicos, que pueden aumentar o disminuir la actividad sináptica respectivamente.

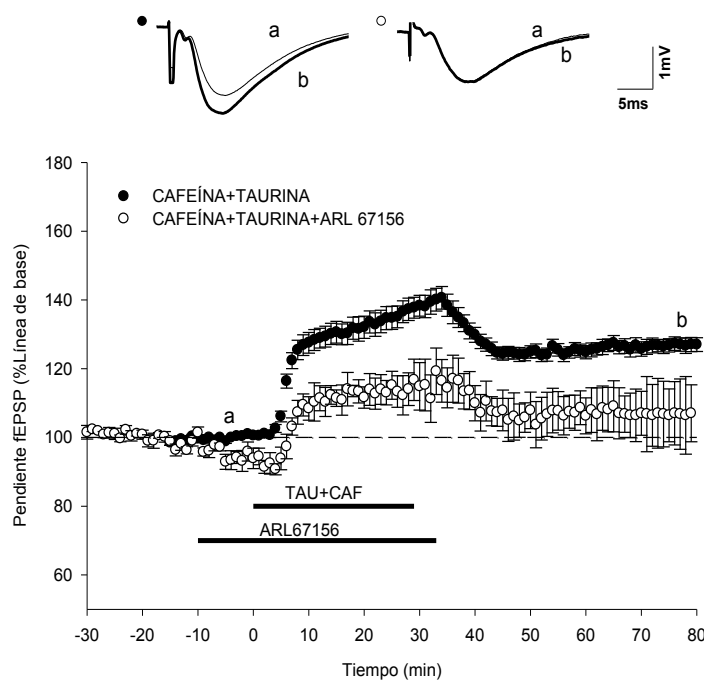


Figura 4.18. La aplicación de un antagonista de la ectonucleotidasa inhibe la potenciación sináptica duradera provocada por la aplicación de taurina y cafeína.

Cursos temporales comparando la potenciación producida por la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M durante 30 minutos en presencia (●, n=24) y en ausencia (○, n=4) de un antagonista específico de la ectonucleotidasa, ARL67156 50 μ M.

podiera tener un efecto depresor de la actividad sináptica, realizamos una serie de experimentos donde estudiamos como afectaba la aplicación exógena de ATP

RESULTADOS

10 μM a la potenciación sináptica inducida por taurina y cafeína (Fig. 4.19, $n=2$). Cuando aplicamos ATP, se produjo una depresión de la respuesta sináptica ($64\pm 1\%$), que se recuperó casi hasta niveles basales durante la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μM durante 30 minutos ($85\pm 6\%$), cayendo posteriormente durante el lavado de taurina y cafeína pero manteniendo el ATP, a los mismos niveles de potenciación provocados durante la aplicación de ATP ($67\pm 6\%$).

Esto es coherente con otros trabajos publicados (*Burnstock y cols., 2011*) que describen efectos opuestos sobre los potenciales sinápticos provocados por la aplicación de ATP. Por un lado se activan receptores purinérgico de tipo P2X que provocan un aumento en la respuesta sináptica y por otro una activación de los receptores P2Y cuyo efecto depresor es bien conocido. El efecto neto en nuestros experimentos, como sería de esperar, es depresor y previene la potenciación duradera inducida por taurina y cafeína, ya que se activan de manera inespecífica ambos tipos de receptores.

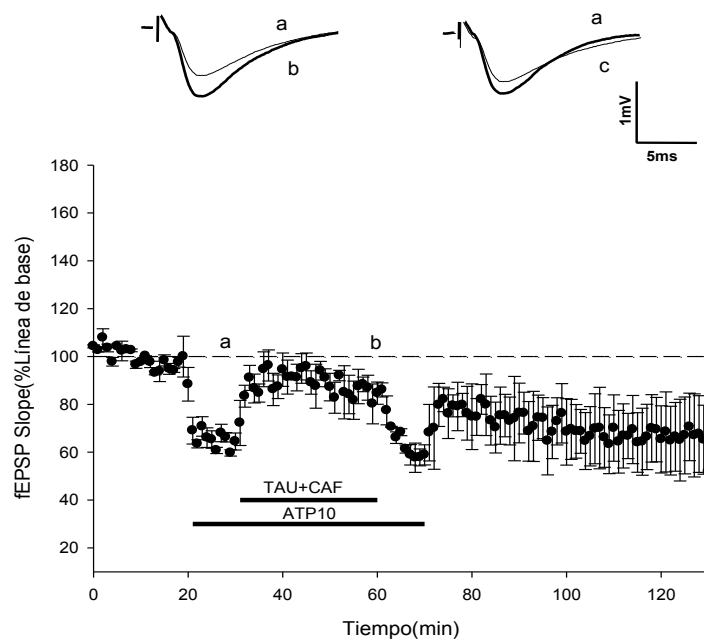


Figura 4.19. Aplicación de taurina y cafeína en presencia de un agonista de los receptores purinérgico.

Efecto de la perfusión de ATP 10 μM (●, $n=2$) sobre el fEPSP durante su presencia en el medio (a). Nótese que al coaplicar taurina 1 mM y cafeína 50 μM aumenta la respuesta sináptica (b).

RESULTADOS

Para confirmar que los receptores P2X participan en la potenciación inducida por taurina y cafeína, usamos α,β Metileno ATP, un derivado no hidrolizable de ATP cuya unión a estos receptores provoca su desensibilización. En menor medida también puede activar receptores P2Y (Ralevic y Burnstock, 1998). La aplicación de α,β Metileno ATP 20 μ M (Fig. 4.20) produjo una depresión del potencial sináptico de aproximadamente un 20% a los 5 minutos de su perfusión.

Este efecto depresor fue totalmente inhibido por la cafeína (50 μ M) sin que se observaran cambios perdurables en el fEPSP, una vez retirado el α,β Metileno ATP del medio de perfusión (Fig. 4.20 A, n=6). Estos resultados se pueden interpretar como una activación de receptores de adenosina A1 por el α,β Metileno ATP.

En otro grupo de experimentos (Fig. 4.20 B; n=7) comprobamos que la aplicación de taurina y cafeína en presencia de α,β Metileno ATP provocaba una potenciación sináptica duradera de menor magnitud que la producida en el medio de perfusión estándar ($128\pm 2\%$ vs $116\pm 5\%$, tras 60 minutos de lavado de taurina y cafeína en ausencia y presencia de α,β Metileno ATP, respectivamente; $p < 0,05$). Estos resultados, aunque son compatibles con la participación de los receptores P2X en el efecto sinérgico producido por la coaplicación de taurina y cafeína, hay que interpretarlos con cautela dado el efecto depresor de la transmisión sináptica provocado por el α,β Metileno ATP. La inhibición provocada por este compuesto parece ser debida a la activación de receptores de adenosina A1 (*Burnstock y Kennedy, 1985*). Por lo tanto solo podemos concluir que la activación continuada de ambos tipos de receptores P2 no modifica ni el aumento transitorio producido por cafeína sola ni la potenciación duradera provocada por la coaplicación de taurina y cafeína.

RESULTADOS

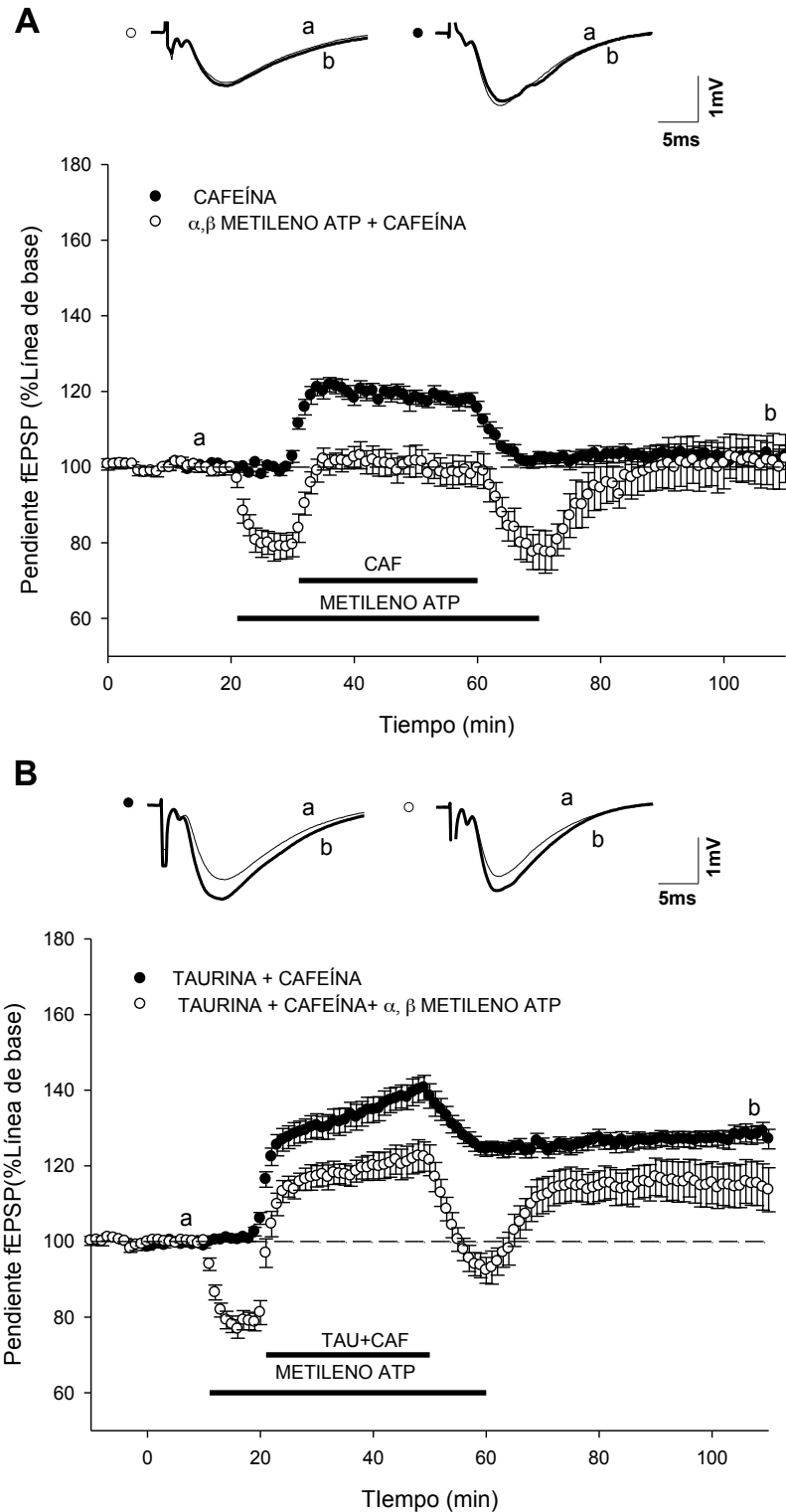


Figura 4. 20. La aplicación de un agonista de receptores purinérgicos de tipo P2 no afecta a la potenciación producida por la aplicación de taurina y cafeína.

(A) Curso temporal comparando la aplicación de cafeína en presencia de α,β -metileno ATP 20 μ M (O, n=6) con la aplicación de cafeína 50 μ M sola (●, n=11).

(B) Aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (O, n=7) en presencia del agonista α,β -metileno ATP 20 μ M frente al curso temporal producido por la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (●, n=24).

4.5. La potenciación inducida por taurina y cafeína es inhibida por antagonistas de los receptores GABA_B

La taurina puede activar varios receptores de neurotransmisores en el SNC como los receptores de glicina y los receptores GABA_A y GABA_B, (*Kontro y Oja, 1990; del Olmo y cols., 2000a; De Saint Jan y cols., 2001*).

Decidimos estudiar si los receptores GABA estaban implicados en la potenciación producida por la aplicación de taurina y cafeína.

En un primer grupo de experimentos (Fig. 4.21), inhibimos tanto los receptores GABA_A como los GABA_B, aplicando antagonistas específicos para cada uno de ellos (picrotoxina 100 μ M y CGP55845 2 μ M, respectivamente). Para evitar que la desinhibición provocada por el antagonista GABA_A produjese descargas epilépticas, cortamos la conexión con la CA3 y elevamos la concentración de calcio y magnesio a 4 mM en la solución de perfusión durante todo el experimento. Este procedimiento, descrito inicialmente por *Wigström y Gustafsson (1983)*, es utilizado preferentemente en el hipocampo para evitar la generación de descargas epilépticas cuando se perfunden antagonistas GABA_A.

En estas condiciones experimentales, la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M durante 30 minutos (Fig. 4.21 A, n=5), aumentó el fEPSP ($117\pm 2\%$) pero significativamente menos que cuando lo comparamos con la situación control ($p < 0,001$). Curiosamente, en presencia de los antagonistas GABA, el fEPSP volvió a la línea de base ($101\pm 1\%$) a los veinte minutos del lavado de taurina y cafeína.

Como se puede apreciar en la Fig. 4.21 B la potenciación producida por taurina y cafeína en presencia de los antagonistas GABA ($117\pm 2\%$), es muy similar a

RESULTADOS

la provocada por cafeína sola en una disolución de perfusión estándar ($117 \pm 2\%$), lo que indica que estos antagonistas impiden la acción facilitadora de la taurina sobre el efecto potenciador de la cafeína.

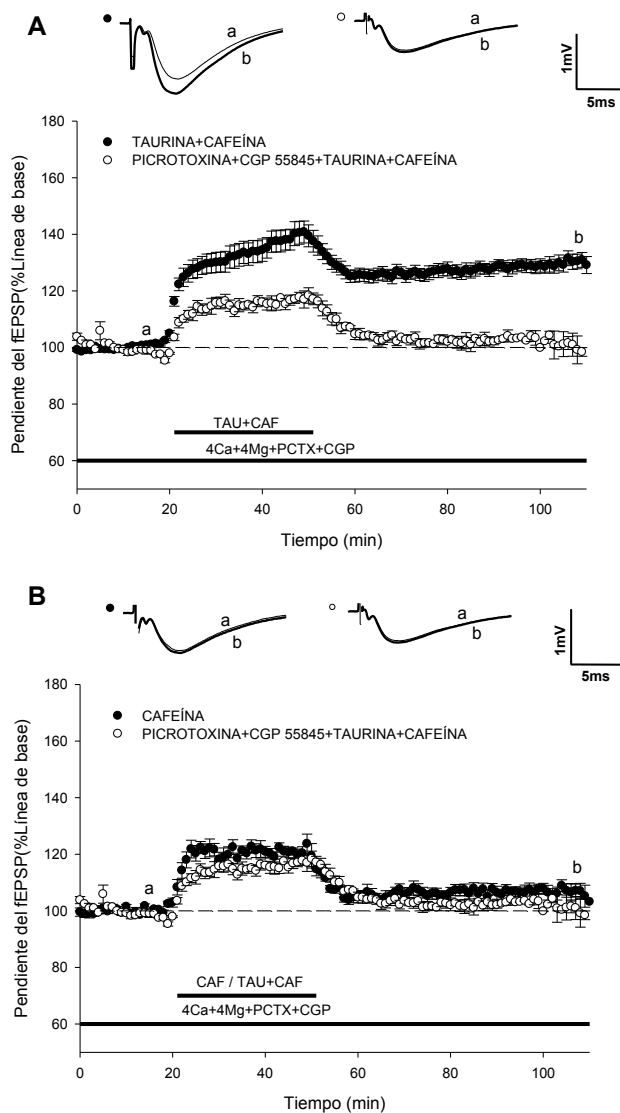


Figura 4.21. Efecto de la inhibición de los receptores de GABA_A y GABA_B sobre la potenciación inducida por la aplicación de taurina y cafeína.

Todos los experimentos se realizaron en presencia de Ca^{+2} 4 mM, Mg^{+2} 4mM, picrotoxina 100 μM y CGP55845 2 μM .

(A) En estas condiciones se perfundió taurina 1 mM y cafeína 50 μM (○, n=5) y comparamos su efecto sobre el fEPSP con el inducido al perfundir taurina 1 mM y cafeína 50 μM , en un medio estándar, (●, n=24; $p < 0,001$).

(B) La barra negra indica la perfusión de cafeína sola o taurina 1 mM y cafeína juntas. Comparamos el curso temporal provocado al perfundir cafeína 50 μM en un medio estándar (●, n=11) con el provocado en presencia de los antagonistas GABA al aplicar taurina y cafeína, siendo ambos efectos indistinguibles ($p > 0,05$).

RESULTADOS

Tras una serie de experimentos preliminares llegamos a discernir que solo con la inclusión del antagonista GABA_B (CGP55845) en el medio de perfusión era suficiente para impedir que la mezcla de taurina y cafeína provocasen potenciación duradera (Fig. 4.22 A, n=10, 106±2% vs 128±2% en presencia y en ausencia de CGP55845, respectivamente; p<0,001).

Para descartar un posible efecto farmacológico del CGP55845 independiente de su acción sobre los receptores GABA_B, repetimos los experimentos en presencia de otros dos antagonistas de estos receptores a la misma concentración que el anterior. Al coaplicar taurina y cafeína en presencia del antagonista GABA_B, CGP52432 2 μM, (Fig. 4.22 B, n=15), se produjo una potenciación significativamente menor que en los experimentos control (139±3% vs 123±2% en ausencia y en presencia del antagonista, respectivamente, p<0.01) volviendo a los valores basales cuando se retiraron las sustancias del medio (107±2% comparando con la situación control; p<0,01).

Sorprendentemente, en presencia del tercer antagonista GABA_B, el CGP54626, 2 μM (Fig. 4.22 C, n=9), la aplicación de taurina y cafeína provocó una potenciación sináptica casi idéntica a la inducida por la taurina y la cafeína solas tanto durante la aplicación como durante el lavado de ambas sustancias (139±3% vs 128±3%, durante la aplicación y 128±2% vs 121±4% durante el lavado, en ausencia y en presencia del antagonista, respectivamente; p>0,05).

Estos resultados demuestran que distintos antagonistas de receptores GABA_B, con idéntica potencia farmacológica, actúan de manera diferente sobre la potenciación inducida por taurina y cafeína, sugiriendo la existencia de unos receptores GABA_B con distinta sensibilidad a estos antagonistas.

RESULTADOS

De hecho, cuando en un grupo de experimentos (Fig. 4.22 D, n=5) aumentamos a más del doble la concentración de CGP54626 (5 μ M), el antagonista GABA_B que no afectaba a la potenciación sináptica inducida por taurina y cafeína, pudimos observar que esta nueva condición provocaba una disminución de la potenciación del fEPSP tanto durante la aplicación de taurina y cafeína (113 \pm 6%) como al final del período de lavado (97 \pm 6%; p<0,01).

RESULTADOS

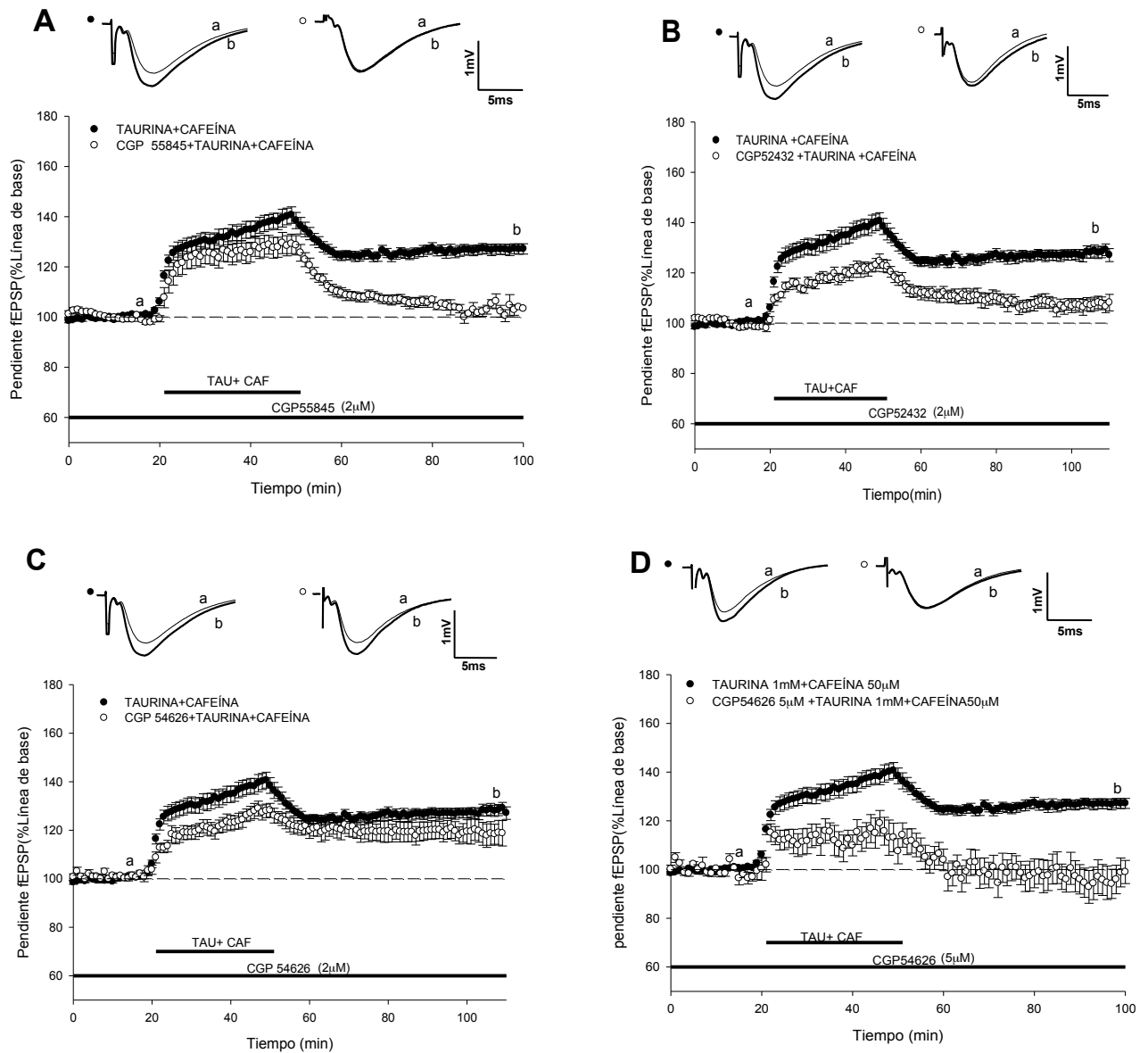


Figura 4.22. Varios antagonistas de los receptores GABAB afectan de forma diferente la potenciación inducida por taurina y cafeína.

Los datos representados por los círculos negros corresponden a los experimentos control en los que se aplicó taurina 1 mM y cafeína 50 μM (●, n=24).

(A) Curso temporal comparando el efecto de la perfusión de taurina 1 mM y cafeína 50 μM en presencia y en ausencia de CGP55845, un antagonista específico de los receptores GABAB (○, n=10), $p < 0,0001$.

(B) La presencia de otro antagonista específico para dichos receptores, CGP52432 a la misma concentración (○ n=15) también inhibe la potenciación inducida al coaplicar taurina 1mM y cafeína 50 μM ($p < 0,001$).

(C) Sin embargo, la potenciación inducida por la coaplicación de taurina y cafeína no se ve afectada por otro antagonista específico GABAB, el CGP54626, a la misma concentración que los anteriores inhibidores (○, n=9; $p > 0,05$).

(D) Cuando aumentamos la concentración del antagonista CGP54626 a 5 μM, se inhibe el aumento duradero de la actividad sináptica inducido por taurina y cafeína (○, n=5; $p < 0,01$).

4.5.1. Los antagonistas CGP55845 y CGP54626 son equipotentes inhibiendo la respuesta GABA_B inducida por baclofeno en registros intracelulares

En el apartado anterior mostramos resultados que sugieren la existencia de una población de receptores GABA_B no convencionales con diferente sensibilidad farmacológica a distintos antagonistas para este receptor. Para afianzar esta hipótesis, realizamos una serie de experimentos en los que quisimos corroborar que los antagonistas usados (CGP55845 y CGP54626) eran equipotentes inhibiendo las respuestas mediadas por receptores GABA_B convencionales, las cuales fueron activadas por baclofeno, el prototípico agonista GABA_B (Nicoll, 2004).

En los experimentos (Fig. 4.23) se registraron intracelularmente células piramidales, y en presencia de picrotoxina 100 μ M aplicamos baclofeno 50 μ M. Este agonista activa todos los receptores GABA_B conocidos, los cuales tienen un efecto inmediato, hiperpolarizando el potencial de membrana y disminuyendo su resistencia de entrada, debido a la activación de canales de potasio e inhibiendo el EPSP, debido a una disminución en la liberación de glutamato por la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje. Tomando estos tres parámetros (reversión del efecto de baclofeno sobre el EPSP, la reversión del efecto de baclofeno sobre la resistencia de entrada y la reversión de la hiperpolarización producida por baclofeno sobre el potencial en membrana) comprobamos la acción inhibitoria de CGP55845 (n=3) y CGP54626 (n=3).

En la Figura 23A, mostramos dos ejemplos de registros en célula única en los que, como podemos ver, los dos inhibidores revierten el efecto de baclofeno

RESULTADOS

sobre los tres parámetros (EPSP, la resistencia de entrada y la hiperpolarización producida por la acción de baclofeno sobre el potencial de membrana).

Cuando comparamos la capacidad de revertir la acción del baclofeno de ambos antagonistas (CGP55845 vs CGP54626) y lo cuantificamos expresándolo en % de la capacidad para revertir la acción del baclofeno (Fig. 4.23B), comprobamos que ambos antagonistas son equipotentes ($p > 0,05$ para cada uno de los parámetros medidos) sobre el EPSP (B1), sobre la resistencia de entrada (B2) y sobre la hiperpolarización del potencial de membrana (B3).

Sin embargo cuando comparamos el porcentaje que queda del aumento provocado por la aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (B4) en presencia de cada uno de los antagonistas (CGP55845, $n=10$; y CGP54626, $n=9$), comprobamos que los antagonistas tenían un efecto diferente sobre la potenciación del fEPSP, siendo mucho más eficaz el antagonista CGP55845 que el CGP54626 ($p < 0,001$).

Con estos experimentos demostramos que el baclofeno, a las concentraciones utilizadas, activa todos los receptores GABA_B y sus acciones conocidas en los registros intracelulares, y que estas son revertidas completamente y de forma similar por los dos antagonistas utilizados. Esto no ocurre con la potenciación sináptica duradera inducida por taurina y cafeína que es más sensible al CGP55845 que al CGP54626, lo que indica que existen unos receptores GABA_B no convencionales que se activan durante la perfusión de taurina y cafeína.

RESULTADOS

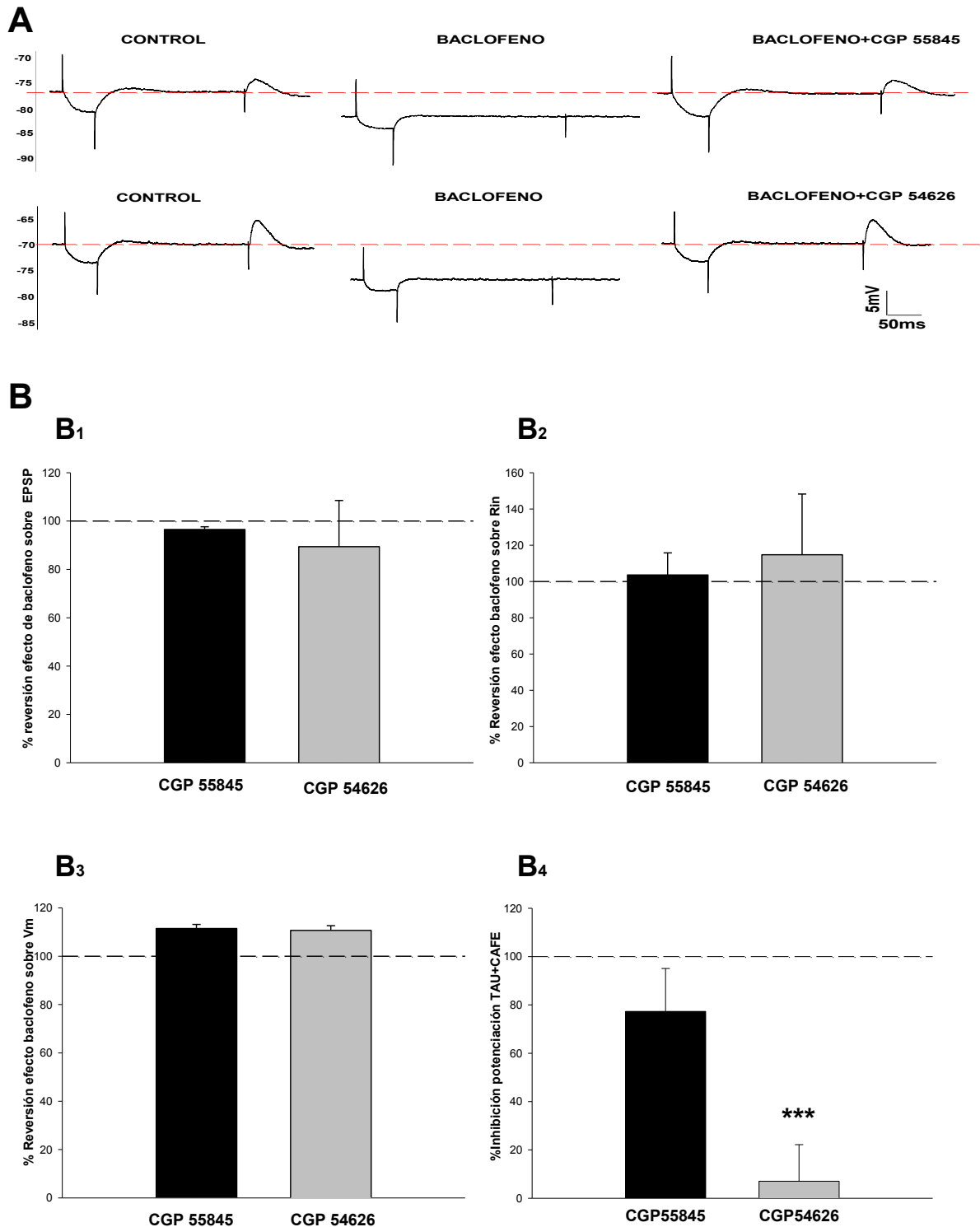


Figura 4.23. La potenciación inducida por taurina y cafeína involucra unos receptores GABAB no convencionales.

(A) Los antagonistas GABAB, CGP55845 y CGP54626 son equipotentes, inhibiendo las acciones conocidas mediadas por GABAB, (B1) efecto del baclofeno sobre el EPSP debido a su acción inhibitoria sobre las corrientes de calcio, (B2) y (B3), efectos del baclofeno sobre la Rin y Vm, debido a la activación de la conductancia de potasio. (B4) Sin embargo, estos antagonistas tienen diferente eficacia inhibiendo la potenciación sináptica inducida por taurina y cafeína. t de Student; *** $p < 0,001$.

4.5.2. La aplicación conjunta de agonistas GABA_B y cafeína no presentan un efecto sinérgico sobre la transmisión sináptica

Como dos de los antagonistas GABA_B (CGP55845 y CGP52432) inhiben la potenciación sináptica inducida por la coaplicación de taurina y cafeína y otro no (CGP54626), activamos todos los receptores GABA_B conocidos mediante el agonista baclofeno (*Nicoll, 2004*) y en su presencia aplicamos cafeína junto con el antagonista (CGP54626) que no inhibía la potenciación provocada por la aplicación de taurina y cafeína. Con estos experimentos intentamos mimetizar la potenciación inducida por taurina y cafeína dejando activos los receptores GABA_B no sensibles al antagonista CGP54626.

Aplicamos cafeína 50 μ M y baclofeno a dos concentraciones (10 μ M ó 50 μ M) en presencia de CGP54626 1 μ M (Fig. 4.24 A). En ambos casos, durante la perfusión de estos compuestos, el fEPSP aumentó ligeramente de manera transitoria (114 \pm 2%, n=6 y 110 \pm 6%, n=3, para las concentraciones de baclofeno de 10 μ M y 50 μ M, respectivamente). Los valores alcanzados durante el lavado por las distintas concentraciones utilizadas de baclofeno y cafeína 50 μ M, son indistinguibles de los experimentos donde se perfundió solo cafeína 50 μ M (103 \pm 3% vs 110 \pm 2% para una concentración de baclofeno de 10 μ M y 103 \pm 3% vs 104 \pm 7; para una concentración de baclofeno de 50 μ M respectivamente; p>0,05).

Se ha demostrado que la aplicación de baclofeno a concentraciones más elevadas, desplaza al antagonista CGP54626 (*Hirst y cols., 2003*) activando los receptores GABA_B tanto a nivel presináptico como postsináptico y provocando un efecto neto inhibitorio sobre el fEPSP. Por lo tanto no podemos, mediante estos experimentos, demostrar una participación de los receptores GABA_B

RESULTADOS

insensibles al antagonista CGP54626 en la potenciación duradera provocada por la aplicación de baclofeno y cafeína.

También hicimos un grupo de experimentos aplicando otro agonista GABA_B, el ácido 3-aminopropilfosfónico (3-APPA, 100 μ M), junto con cafeína 50 μ M en presencia del antagonista CGP54626 2 μ M, (Figura 4.24 B, n=4).

El fEPSP aumentó ligeramente, volviendo a valores basales antes de lavar ambos compuestos (105 \pm 3%) permaneciendo durante la hora de lavado en unos valores ligeramente inferiores a los registrados durante la línea de base (92 \pm 7%).

Comparando estos resultados, con la potenciación transitoria provocada por cafeína, los valores son significativamente menores, con $p < 0,01$ durante la aplicación y no significativos durante el lavado ($p > 0,05$).

Estos resultados indican que no podemos imitar el efecto provocado por la taurina en presencia de cafeína mediante la aplicación de agonistas GABA_B, dada la dificultad de inhibir eficazmente los receptores GABA_B convencionales dejando inalterados los no convencionales. La activación de los receptores GABA_B convencionales tanto presinápticos como postsinápticos tendrían una acción neta inhibitoria sobre el fEPSP, que se opondría a la potenciación provocada por la taurina y la cafeína.

RESULTADOS

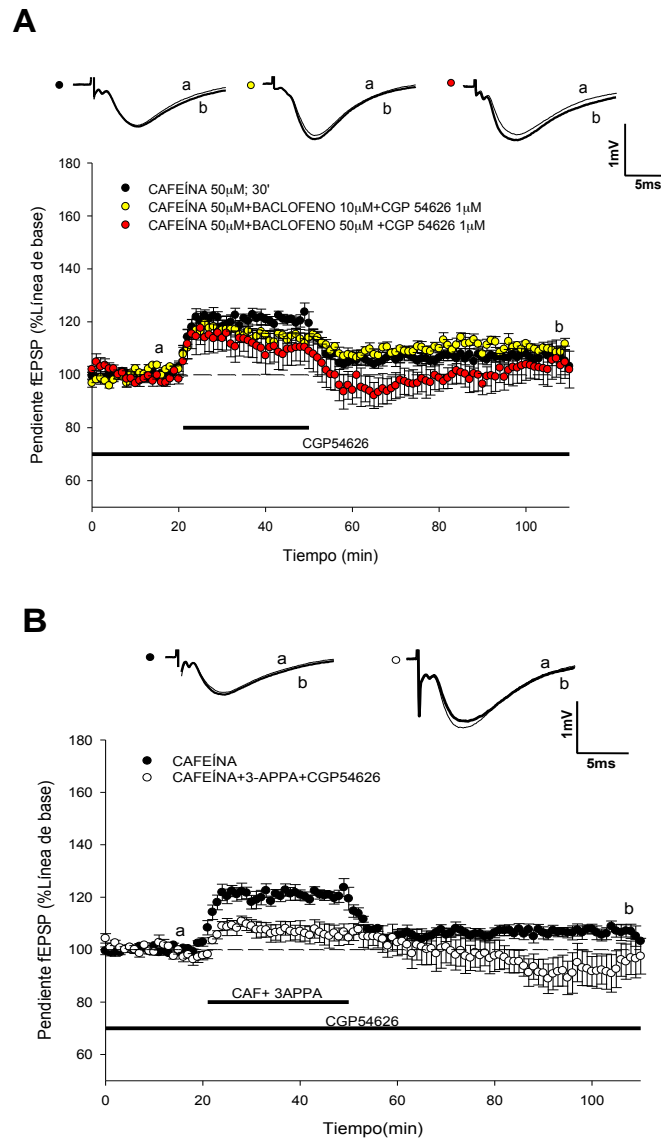


Figura 4.24. Efectos sobre el fEPSP de la perfusión conjunta de cafeína y agonistas GABA_B.

(A) La barra horizontal negra muestra los tiempos de aplicación de cafeína o cafeína y baclofeno. Curso temporal donde se muestra la aplicación de baclofeno a distintas concentraciones (● 10 μ M, n=6; ● 50 μ M, n= 3) junto con cafeína 50 μ M en presencia del antagonista para GABA_B, CGP54626 1 μ M. Comparamos el efecto provocado por la aplicación conjunta de cafeína y baclofeno en presencia del antagonista con el inducido por cafeína sola (●, n=11), siendo estadísticamente indistinguible ($p>0,05$).

(B) Como en (A) pero perfundiendo el agonista GABA_B, 3-APPA 100 μ M en vez de baclofeno (○, n=4). Este resultado lo comparamos con el curso temporal de cafeína 50 μ M sola (●, n=11) siendo el aumento provocado por la perfusión cafeína y 3-APPA, en presencia del antagonista, menor que el inducido por la aplicación de cafeína ($p<0,01$).

RESULTADOS

4.5.3. La potenciación inducida por taurina y un agonista de los receptores A_{2A} también requiere la activación de receptores GABA_B

Siguiendo con la caracterización de la potenciación sináptica producida por la sinergia entre la taurina y un agonista A_{2A}, nos planteamos si, al igual que la potenciación inducida por taurina y cafeína, también se vería inhibida por el antagonista GABA_B, CGP55845.

Para ello, en presencia de CGP55845 2 μ M, aplicamos taurina 1 mM junto con CGS21680 50 nM (Fig. 4.25A). Durante la aplicación se produjo un pequeño aumento ($108\pm 2\%$; $p > 0,05$) que volvió a sus valores basales durante el periodo de lavado ($101\pm 4\%$).

Sin embargo cuando aplicamos el antagonista de receptores GABA_B, CGP54626 2 μ M junto con CGS21680 y taurina, no afectó de forma significativa a la potenciación sináptica duradera inducida por el agonista y la taurina. Estos resultados sugieren que los receptores GABA_B no convencionales propuestos también participan en los mecanismos involucrados en la potenciación sináptica inducida por taurina y el agonista A_{2A}.

RESULTADOS

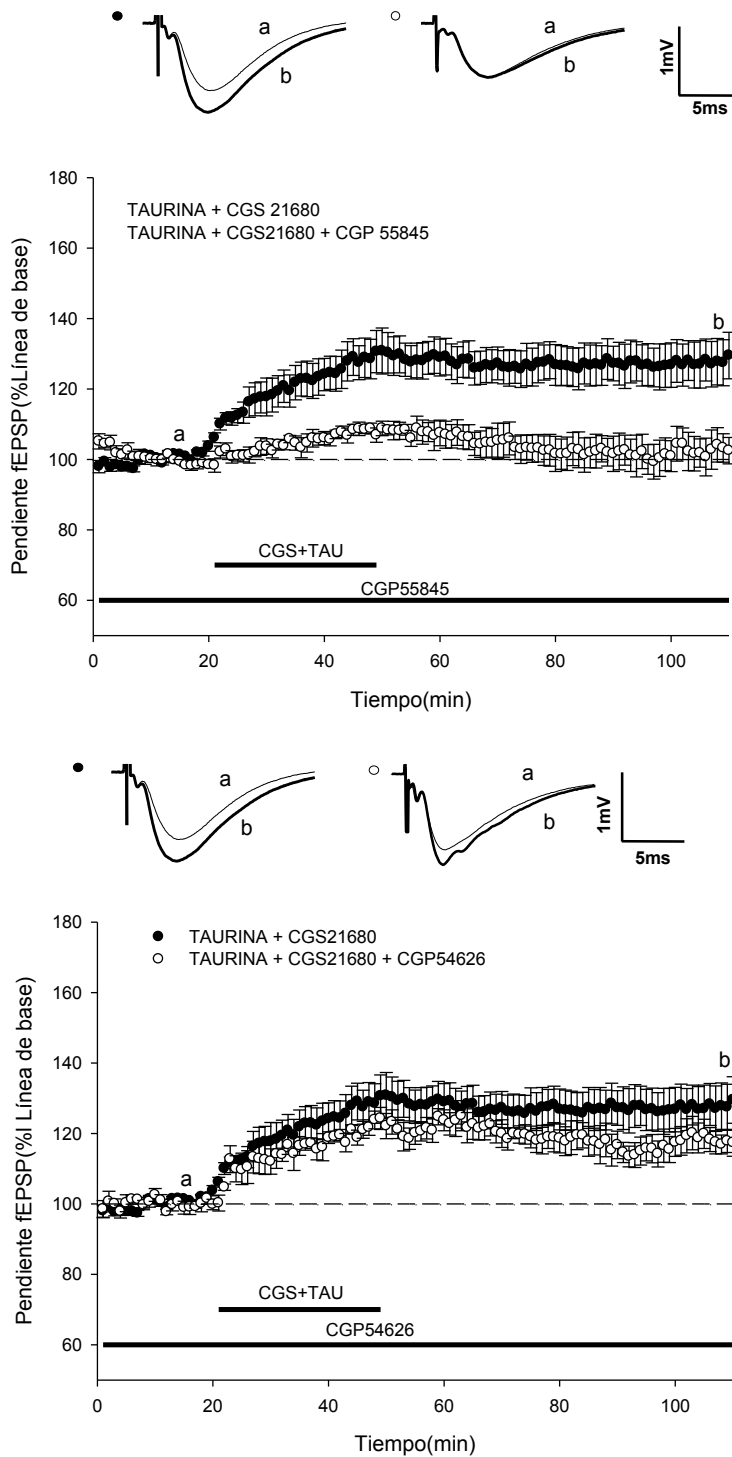


Figura 4.25. La potenciación inducida por la activación de los receptores de adenosina A_{2A} y taurina también depende de la activación de receptores GABA_B.

(A) Curso temporal en el que se muestra el efecto de la coaplicación de taurina 1 mM y CGS21680 50 nM (●, n=9). Nótese que en presencia de un antagonista específico para los receptores GABA_B, CGP55845 2 μM, el efecto producido es inhibido cayendo a línea de base durante el lavado (○, n=5).

(B) Sin embargo, la presencia de otro antagonista específico GABA_B (CGP54626) no inhibe la potenciación inducida por la coaplicación de CGS21680 y taurina (○, n=3)

4.6. Cadenas de señalización intracelular implicadas en la potenciación sináptica inducida por taurina y cafeína

En otros fenómenos de potenciación duradera de la transmisión sináptica como el de la LTP inducida por estímulos eléctricos de alta frecuencia, se conoce que los cambios iniciales producidos por dicha estimulación activan una serie de proteínas quinasas que están implicadas en los procesos de inducción y mantenimiento de la potenciación. Entre las quinasas involucradas se encuentra la CaMKII, PKC y PKA (*Kandel, 2001*).

Para estudiar si el efecto potenciador de la taurina y cafeína requería la activación de dichas rutas de señalización, aplicamos estaurosporina 100 nM, un inhibidor de amplio espectro de esas proteínas quinasas. Al perfundir estaurosporina se produjo una lenta depresión de la actividad sináptica ($85\pm 6\%$) que se estabilizó sobre los 20 minutos de su aplicación (Fig. 4.26 B, $n=4$). Cuando aplicamos taurina 1 mM y cafeína 50 μM en presencia de dicho inhibidor (Fig. 4.26 A, $n=7$) el fEPSP aumentó ($113\pm 1\%$) mientras estuvieron las sustancias presentes en el medio, aunque menos que en los experimentos control ($p<0,001$).

Cuando retiramos los compuestos del medio, el fEPSP volvió a unos valores indistinguibles de los obtenidos cuando aplicamos estaurosporina sola (Fig. 4.26 B, $90\pm 3\%$).

RESULTADOS

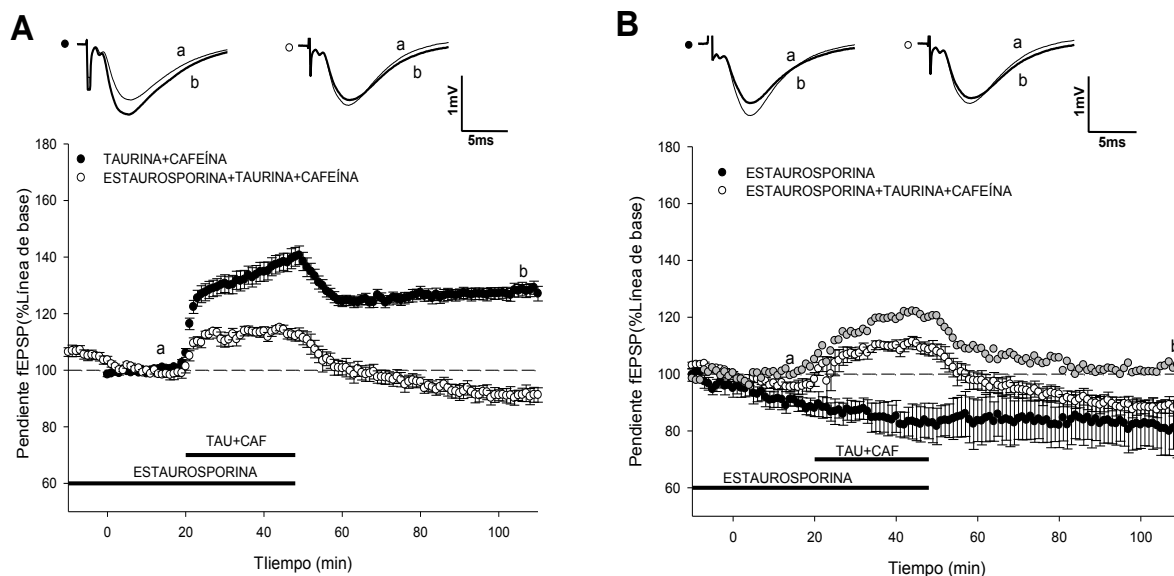


Figura 4.26. La potenciación inducida por taurina y cafeína depende de proteínas quinasas.

(A) La aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M provoca una potenciación duradera (\bullet , n=24) que es inhibida por un antagonista inespecífico de proteínas quinasas, estaurosporina 100 nM (\circ , n=7).

(B) La aplicación durante una hora de estaurosporina 100 nM provoca una depresión del fEPSP que se estabiliza durante el lavado (\bullet , n=4). Los grises (\circ) representan el curso temporal del efecto producido por taurina y cafeína una vez restado el efecto causado por la estaurosporina sobre el fEPSP. Nótese que la potenciación duradera se convierte en un proceso transitorio en presencia de estaurosporina.

La estaurosporina es un inhibidor inespecífico de varias quinasas como la PKA y la PKC, las cuales han sido relacionadas con la activación de receptores de adenosina (*Freedholm, 1995*). Para determinar cuál o cuáles de estas quinasas estaban implicadas hicimos una serie de experimentos utilizando inhibidores específicos contra ellas.

Usamos un inhibidor específico de la PKA (H-89), a una concentración de 10 μ M, y lo aplicamos veinte minutos antes y durante la perfusión de cafeína 50 μ M y taurina 1 mM (Fig. 4.27, n=4).

Como se puede apreciar, la potenciación del fEPSP producida durante la perfusión de ambas sustancias ($129\pm 4\%$), es indistinguible de la que se produce en ausencia del antagonista ($p>0,05$), lo que indica que el aumento de

RESULTADOS

la transmisión sináptica producida por la taurina y la cafeína es independiente de la activación de la PKA.

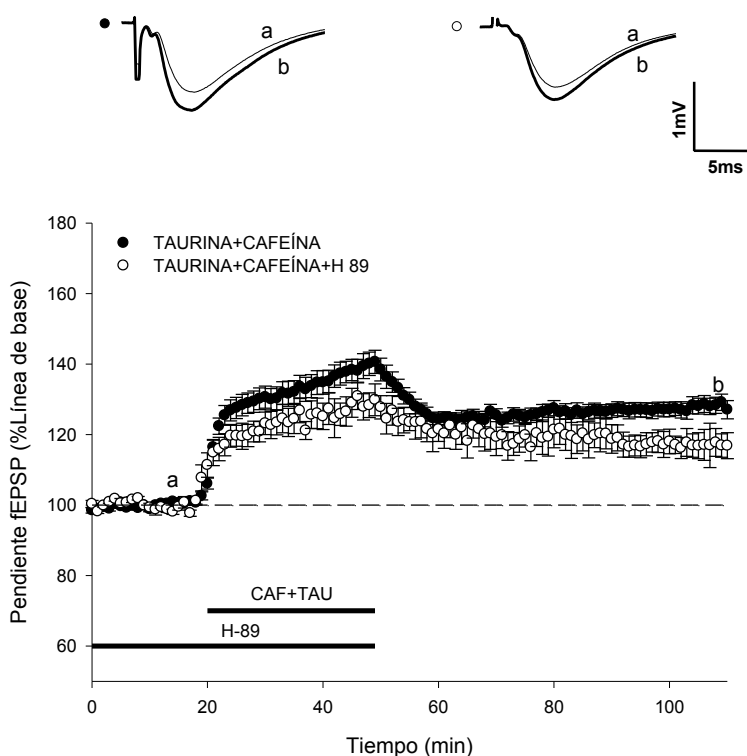


Figura 4.27. La potenciación sináptica inducida por la aplicación de taurina y cafeína no depende de la activación de la PKA.

La presencia de H89 (10 μ M), un inhibidor de la PKA, no afecta significativamente a la potenciación sináptica producida por taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (O, n=4).

Otra de la proteína kinasa que podría estar implicada en la ruta de señalización es la PKC, activada por la presencia de calcio y por fosfolípidos de membrana implicados en la ruta de la producción del diacilglicerol e inosítidos (Newton, 2009). Para comprobarlo aplicamos un inhibidor muy potente y selectivo para dicha quinasa (GF109203X 1 μ M) veinte minutos antes, durante la perfusión de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M, y diez minutos después del lavado de ambas sustancias (Fig. 4.28, n=7).

RESULTADOS

Al aplicar taurina y cafeína en presencia del antagonista, el fEPSP aumentó ($113\pm 3\%$; $p < 0,1$) significativamente menos que en ausencia del antagonista. Durante el lavado, el fEPSP volvió a sus valores basales ($99\pm 2\%$).

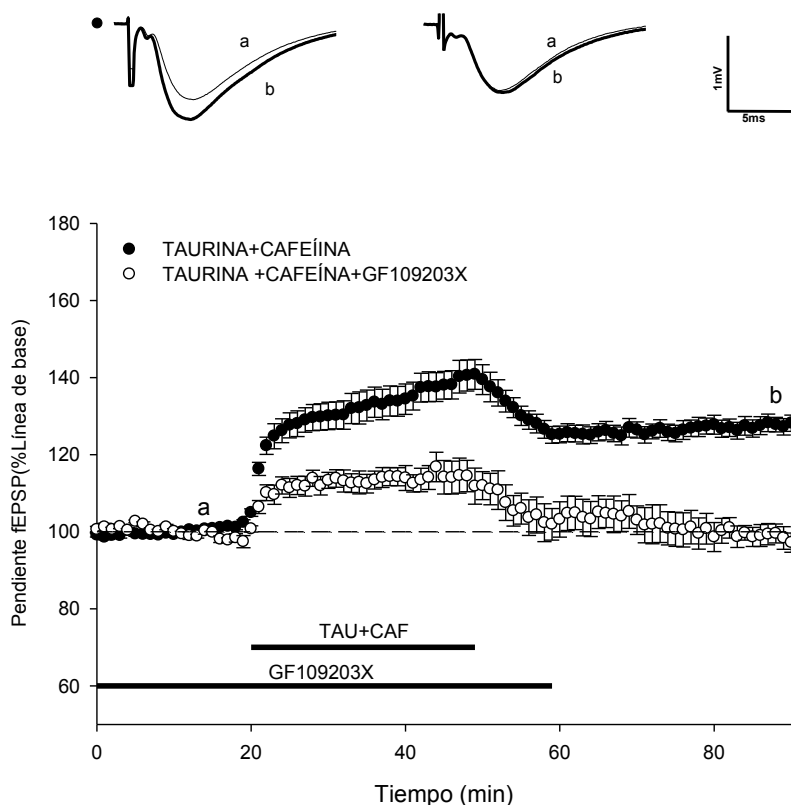


Figura 4.28. La potenciación inducida por taurina y cafeína depende de la activación de la PKC.

La potenciación duradera inducida por la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M es inhibida en presencia de un antagonista específico para la PKC, GF109203X 1 μ M (\circ , $n=7$).

Dado que el fenómeno parece requerir la activación de la PKC, comprobamos si como en otros casos (*Rhee y Choi, 1992*) se requiere una fosfolipasa C (PLC) para activar esta quinasa.

Para ello hicimos una serie de experimentos (Fig. 4.29), en presencia de U73122, un inhibidor selectivo de la PLC a una concentración de 5 μ M que fue perfundido veinte minutos antes y durante la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (Fig. 4.29 A, $n=8$). La aplicación del antagonista produjo una

RESULTADOS

depresión de la actividad sináptica ($77\pm 8\%$) que se estabilizó durante su lavado (Fig. 4.29 B, $n=4$).

Cuando en presencia del antagonista se perfundió taurina y cafeína, el fEPSP aumentó hasta un $108\pm 4\%$ de sus valores basales. Durante el lavado el fEPSP cayó rápidamente a valores similares ($76\pm 7\%$) a los obtenidos cuando se aplica el antagonista solo.

Estos experimentos demuestran que el mantenimiento de la potenciación del fEPSP provocada por taurina y cafeína, recluta a la vía de señalización formada por la PLC y PKC.

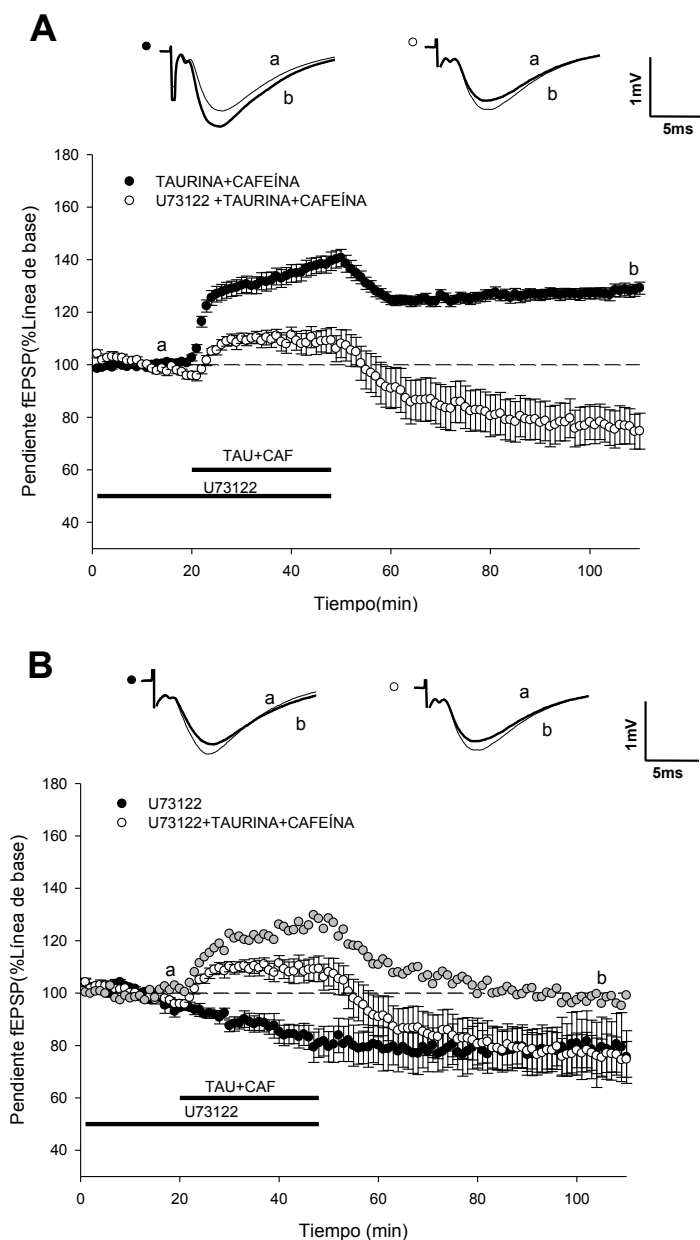


Figura 4.29. La aplicación de taurina y cafeína activa una cascada de señalización que está mediada por la PLC.

A) El aumento duradero del fEPSP inducido por la coaplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M (●, $n=24$) es inhibido por un antagonista específico de la PLC, U73122 5 μ M (○, $n=8$).

B) La aplicación durante 50 minutos de U73122 a una concentración de 5 μ M induce una depresión del fEPSP que se estabiliza durante el lavado (●, $n=4$). Aplicación de taurina 1 mM y cafeína 50 μ M en presencia de U73122 como en A (○, $n=8$).

Los puntos grises (○) representan el curso temporal del efecto producido por la taurina y la cafeína una vez restado el efecto causado por U73122 sobre el fEPSP. Nótese que la potenciación duradera se convierte en un proceso transitorio en presencia del inhibidor de la PLC.

RESULTADOS

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En esta tesis hemos demostrado que la perfusión conjunta de cafeína y taurina tiene un efecto sinérgico que consiste en producir una potenciación duradera de la transmisión sináptica en células piramidales de la región CA1 del hipocampo de rata. Esta potenciación es dependiente de la actividad sináptica y requiere calcio en el espacio extracelular. También hemos demostrado que en esta potenciación duradera intervienen diversos receptores: de glutamato del tipo AMPA, de adenosina A1 y A2_A, de ATP del tipo P2X, y GABA_B. La co-activación de estos receptores actúa de forma coordinada para poner en marcha la vía de señalización que recluta a la PLC y a la PKC.

En nuestros experimentos utilizamos concentraciones moderadas de cafeína y taurina, parecidas a las que se pueden encontrar en las denominadas "bebidas energéticas" (*Wesnes y cols., 2013; Grasser y cols., 2015*). El consumo mundial de estas bebidas se ha triplicado en la última década (*Wolk y cols., 2012*) fomentado por la publicidad que propone efectos positivos sobre la concentración mental, tiempo de reacción y estado de alerta. Algunos de estos efectos han sido comprobados en estudios en humanos (*Wesnes y cols., 2013*). No obstante, en un estudio reciente han observado que la ingesta de una marca de bebida energética aumenta la presión sanguínea y disminuye la velocidad del flujo sanguíneo cerebral (*Grasser y cols., 2015*). Actualmente se desconoce si estos efectos, tanto los potencialmente beneficiosos como los perjudiciales, son causados solo por la cafeína o por una interacción de la cafeína con alguno de los otros ingredientes de la bebida energética (taurina y glucoronolactona, principalmente). En este contexto, nuestros resultados tienen una gran relevancia dado que por primera vez demuestran la existencia y determinan parte de los mecanismos de la interacción de dos de los principales componentes de este tipo de bebidas: cafeína y taurina.

5.1. Mecanismo por el que la cafeína potencia la transmisión sináptica

Las concentraciones de cafeína medidas en el plasma de humanos que habían ingerido cantidades moderadas de café estuvieron en el rango de 5 a 70 μM , y se estimó que en el cerebro alcanzaba una concentración de $\sim 30 \mu\text{M}$ (*Lelo y cols., 1986; Kaplan y cols., 1989; Benowitz, 1995*). Esta concentración de cafeína en el rango del bajo micromolar actúa como antagonista sobre los receptores de adenosina de tipo A1 y A2_A (*Fredholm y cols., 1999*); pero no sobre los receptores A2_B (*Dunwiddie y Masino, 2001*) o A3 (*Dunwiddie y cols 1997; Bjorklund y cols., 2008*). Por ello, la dosis de cafeína usada en la mayoría de los experimentos realizados en esta tesis, ejerce su acción inhibiendo casi exclusivamente los receptores de adenosina de tipo A1 y A2_A (*Fredholm y cols., 1999*).

Para otras acciones, tales como inhibición de fosfodiesterasas, inhibición de los receptores GABA_A o la movilización de los reservorios intracelulares de calcio, se requieren mayores concentraciones de cafeína (*Fredholm y cols., 1999*). Dado que en nuestros experimentos el aumento del potencial sináptico provocado por 50 μM de cafeína no sufre incrementos adicionales con mayores concentraciones de cafeína (0,5 y 1 mM), concluimos que solo la inhibición de los receptores de adenosina es la responsable de dicho efecto sináptico. Por otro lado, esta conclusión se ve apoyada por los resultados obtenidos al aplicar antagonistas A1 y A2_A, los cuales imitan y ocluyen este efecto.

En el hipocampo existen receptores A1 localizados pre- y postsinápticamente que pueden estar activados tónicamente por los niveles ambientales de adenosina (*Ballarin y cols., 1991*). La activación de los receptores A1 presinápticos provoca una disminución en la entrada de calcio, lo que reduce la liberación de glutamato

DISCUSIÓN

(Wu y Saggau, 1994; Dunwiddie y Masino, 2001). Por esta razón, la inhibición de estos receptores con cafeína, causa un aumento de la liberación de neurotransmisor, como mostramos en nuestros experimentos usando el paradigma de la facilitación con pares de pulsos, lo que está de acuerdo con lo observado por otros grupos de investigadores (Solinas y cols., 2002; Wang, 2007). Por otra parte, la falta de efecto de la cafeína sobre el potencial de membrana en reposo en nuestros registros intracelulares indica que los receptores A1 postsinápticos, cuya activación aumenta una conductancia de potasio, no participan en la potenciación sináptica inducida por cafeína, al menos en la CA1 del hipocampo.

Nuestros resultados también demuestran que la activación de los receptores A_{2A} mediante un agonista (CGS21680) no afecta al fEPSP ni a las respuestas sinápticas mediadas por receptores AMPA, como han demostrado otros autores (Diógenes y cols., 2004; Rebola y cols., 2008), aunque existen datos que indican que los receptores A_{2A} pueden aumentar las respuestas mediadas por los receptores AMPA (Kessey y Mogul, 1997).

En resumen, la acción neta de la cafeína, a las dosis utilizadas en esta tesis, es la de inhibir la activación tónica de los receptores presinápticos A1 lo que facilita la liberación de glutamato.

5.2. Efecto sinérgico de la cafeína y la taurina sobre la transmisión sináptica

Otros autores (Simons y cols., 2011) han puesto de manifiesto que la aplicación de cafeína 100 μ M en la CA1 solo provoca una ligera potenciación del fEPSP que rápidamente retorna a sus valores basales una vez retirada la cafeína del medio. No así en la región CA2 donde esa concentración de cafeína provoca una potenciación duradera del fEPSP por un mecanismo que depende de la inhibición de los receptores A1 postsinápticos.

DISCUSIÓN

Curiosamente, en nuestros experimentos en la CA1, hemos inducido una potenciación duradera del fEPSP cuando bajas concentraciones de cafeína iban acompañadas del aminoácido taurina (1 mM). Aunque la taurina a altas concentraciones (5-10 mM) es capaz de producir una potenciación duradera del fEPSP que comparte mecanismos con la LTP clásica inducida por estimulación eléctrica (*Galarreta y cols., 1996; del Olmo y cols., 2000b; 2003*), a la concentración de 1 mM solo provoca una pequeña potenciación sináptica transitoria. Sin embargo, cuando la taurina, a esa concentración, se coaplica junto con cafeína provoca una potenciación sináptica duradera. No solo observamos un efecto supra-aditivo en el aumento del fEPSP registrado durante la aplicación de ambas sustancias, sino que además dicho aumento perdura tras su lavado.

La taurina no cambia el umbral de concentración de cafeína que provoca cambios en el fEPSP, lo que indica que la taurina no facilita la acción de este antagonista en los receptores A1. Por otra parte, la presencia de taurina no modifica la magnitud ni la duración del efecto de la cafeína sobre la facilitación de pares de pulsos, lo que sugiere que no aumenta la liberación de glutamato más de lo que hace cafeína por sí sola.

La acción sinérgica provocada por la cafeína y la taurina también se observa en los registros intracelulares, donde demostramos que provoca un aumento duradero en el EPSP, no apreciando sin embargo cambios significativos en la resistencia ni en el potencial de membrana.

¿Cuáles son los mecanismos implicados en este proceso de sinergia desencadenado por la aplicación de cafeína y taurina?

La inhibición de los receptores de adenosina A1 es crucial para la inducción de este fenómeno de potenciación aunque no suficiente para que se produzca un proceso

DISCUSIÓN

perdurable. Como dijimos anteriormente, la desinhibición causada por cafeína provoca un aumento en la liberación de glutamato. Para que la cafeína y la taurina induzcan el fenómeno de potenciación duradera es necesario que el glutamato liberado active sus receptores del tipo AMPA, pero no los NMDA. Curiosamente, los receptores NMDA son una de las piezas fundamentales para la inducción de diferentes procesos que conllevan cambios duraderos de la eficacia sináptica (*Bliss y Collingridge, 1993*) como por ejemplo la inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo, que se origina postsinápticamente mediante la entrada de calcio a través de los receptores de NMDA (*Malenka y Nicoll., 1993*). En esta tesis también hemos demostrado que el aumento duradero del fEPSP inducido por taurina y cafeína depende de la presencia del calcio extracelular y del contenido en los reservorios intracelulares, como demostramos al inhibir la bomba Ca^{2+} -ATPasa presente en el retículo endoplasmático. Sin embargo, en esta potenciación no participan los receptores de rianodina que allí se encuentran y que son activados presinápticamente por concentraciones de cafeína superiores ($>1\text{mM}$) a las usadas en nuestro trabajo (*Martin and Buño, 2003*). No descartamos la implicación de canales de Ca^{2+} activados por IP3 (*Fitzhohn y Collingridge, 2012*).

Dado que la aplicación conjunta de cafeína y taurina no produce cambios en el potencial de membrana, es difícil pensar que los canales de calcio activados por despolarización sean la ruta de entrada del calcio necesaria para el fenómeno de potenciación sináptica. Sin embargo, en nuestros experimentos observamos que la potenciación provocada por cafeína y taurina depende de la activación de los receptores para ATP del tipo P2X. La activación de estos receptores abre una conductancia a calcio de gran relevancia funcional ya que ocurre a potenciales de membrana en reposo (*Egan y Khakh, 2004*) en los que otras vías de entrada de

DISCUSIÓN

calcio están cerradas. Estos receptores bien podrían ser la vía de entrada del calcio necesario para el fenómeno de potenciación que aquí describimos. La activación de los P2X está a menudo relacionada con un incremento en la neurotransmisión excitadora (*Burnstock y cols., 2011*). De hecho, existen evidencias de que la activación de los receptores P2X puede participar en la inducción de la LTP provocada por estimulación sináptica de baja frecuencia y a un potencial de membrana hiperpolarizado (*Pankratov y cols., 2002*) permitiendo una entrada considerable de Ca^{2+} en la célula postsináptica.

La fracción de la corriente sináptica excitadora que es debida a los receptores de ATP es pequeña y en el mejor de los casos correspondería a un 5-15% de las corrientes mediadas por glutamato (*Pankratov y cols., 2002*). Más aun, el mecanismo mediante el cual el ATP es liberado de las terminales presinápticas todavía no está totalmente aclarado. En las sinapsis centrales, se considera que el ATP es co-liberado junto con otros neurotransmisores (*Jo y Role, 2002*) o liberado por separado y actuando como un transmisor excitatorio en solitario como ocurre en la habénula medial (*Robertson y Edwards, 1998*). Además de ser liberado por exocitosis, el ATP en el SNC puede ser liberado por vías alternativas, que incluye, hemicanales de conexinas, canales de calcio sensibles a volumen, o receptores P2X7 (*Arcuino y cols., 2002; Darby y cols., 2003; Suadicani y cols., 2006*). Desde los astrocitos, el ATP también es liberado por activación de receptores AMPA en respuesta a la acción del glutamato liberado desde la terminal nerviosa (*Coco y cols., 2003; Halassa y Haydon, 2010*).

El ATP podría controlar directamente la actividad neuronal activando los receptores P2 del hipocampo (*Inoue y cols., 1996*) o indirectamente metabolizándose en adenosina por la acción de las ectonucleotidasas la cual modularía la transmisión

DISCUSIÓN

sináptica a través de los receptores A1 o A_{2A} (Cuhna y cols., 1996, 1998). En esta tesis demostramos que al aplicar un inhibidor no específico de las ectonucleotidasas (Lévesque y cols; 2007) se impide la potenciación duradera provocada por taurina y cafeína. De estos experimentos inferimos que si el ATP liberado al espacio extracelular no es rápidamente hidrolizado, su presencia continuada podría activar los receptores metabotrópicos P2Y, lo que tendría un efecto depresor sobre el fEPSP.

5.3. Papel de los receptores de adenosina A_{2A}

Hemos demostrado que la inhibición de los receptores A1 mimetiza y ocluye la potenciación provocada por la coaplicación de cafeína y taurina. También hemos observado que un antagonista para receptores A_{2A}, tiene un efecto muy parecido al del antagonista A1, pudiendo ser este resultado debido a una falta de especificidad del antagonista A_{2A} como se ha indicado anteriormente (Halldner y cols., 2004).

En condiciones normales la concentración de adenosina en el espacio extracelular es suficiente para activar los receptores A1 pero no los A_{2A} al presentar una afinidad más baja por ellos (Ciruela y cols; 2006). Un patrón de estimulación de alta frecuencia o la inhibición de los receptores A1 aumentaría la probabilidad de liberación de glutamato conjuntamente con ATP. Este ATP una vez en el espacio extracelular sería hidrolizado por las ectonucleotidasas, produciendo adenosina que se añadiría a la proveniente de otras fuentes y que podría, entonces, alcanzar la concentración suficiente para activar los receptores A_{2A} (Cunha, 2001). Por otra parte, el ATP activando sus receptores P2X puede provocar la liberación de adenosina (Almeida y cols., 2003).

Sin embargo, los mecanismos por los que los receptores A_{2A} afectan a la neurotransmisión no están claros. Se ha propuesto que los receptores A_{2A} podrían

DISCUSIÓN

modular directamente la liberación de glutamato (*Cuhna y cols., 1997, Li y Henry, 1998*). También se ha observado que la activación de los receptores A_{2A} atenúa el efecto inhibitorio de los agonistas A₁ sobre la transmisión sináptica (*Sebastiao y Ribeiro, 2009*). Esta modulación ha llevado a pensar en la existencia de receptores heteroméricos A₁-A_{2A} que ejercerían un control fino sobre la neurotransmisión (*Ciruela y cols., 2006*). Estos heterómeros presentan una baja afinidad de la cafeína por el componente A_{2A} del complejo, lo que podría dar lugar a la situación paradójica de un efecto neto similar a la activación de un receptor A_{2A} pero en presencia de la cafeína (*Ferre y cols., 2008*). Esta posibilidad la podemos desechar en nuestro estudio dado que la potenciación sináptica también se consiguió con concentraciones de cafeína de 1 mM, que serían suficientes para inhibir dichos heterómeros A₁-A_{2A}.

Paradójicamente, en presencia de taurina tanto la inhibición de los receptores A₁ y A_{2A} con cafeína como la activación de los A_{2A} con CGS21680 provoca la potenciación duradera de la transmisión sináptica. Esto se puede explicar porque tanto la inhibición de los receptores A₁ como la activación de los A_{2A} provoca la activación de la adenilato ciclasa, lo que favorece la liberación de neurotransmisor (*Cuhna y cols., 1997*).

Ya que solo en presencia de taurina la potenciación del fEPSP producida por la cafeína o el agonista A_{2A} es duradera en el tiempo, cabe preguntarse, ¿qué papel juega la taurina en ese fenómeno?

5.4. Papel de la taurina en la LTP inducida por cafeína y taurina

La aplicación de taurina a concentraciones entre 5 y 10 mM provoca por sí sola una potenciación duradera de la eficacia sináptica, pero a una concentración de 1 mM no provoca un cambio perdurable (*Galarreta y cols., 1996*) como confirmamos en el

DISCUSIÓN

presente estudio. No obstante, una breve aplicación de 1 mM de taurina puede facilitar que un protocolo de estimulación sináptica produzca una LTP duradera dependiente de la síntesis de nuevas proteínas (*Suárez y cols., 2014*).

La taurina en el cerebro está implicada en un gran número de funciones biológicas, aunque los receptores a través de los que realiza esas funciones son generalmente desconocidos. Existen suficientes evidencias de que la taurina activa receptores de glicina (*Wang y cols., 1998; Mori y cols., 2002; Jiang y cols., 2004*) y receptores GABA_A (*del Olmo y cols., 2000a; Jia y cols., 2008*). También existen datos que indican que la taurina puede activar receptores GABA_B (*Kontro y Oja, 1990; Smith y Li, 1991; Frosini y cols., 2003*), aunque otros investigadores no han encontrado evidencias de tal acción en la región CA1 del hipocampo (*del Olmo y cols., 2000a*).

Curiosamente, la potenciación sináptica inducida por la cafeína y la taurina requiere que se activen receptores GABA_B. Estos receptores presentan un perfil farmacológico no convencional, dado que al usar tres antagonistas GABA_B, que son equipotentes para inhibir las acciones conocidas mediadas por GABA_B, uno de ellos (CGP54626) no afectó a la potenciación sináptica inducida por cafeína y taurina, mientras que los otros dos antagonistas (CGP55845 y CGP52432) la inhibieron totalmente. Por otra parte, los antagonistas utilizados en nuestros experimentos son equipotentes inhibiendo las acciones desencadenadas por la activación de los receptores GABA_B convencionales como son la apertura de canales de potasio y la inhibición de canales de calcio. Este perfil farmacológico no nos ayuda a desvelar la identidad de los receptores GABA_B implicados. Los dos tipos de receptores GABA_B expresados y clonados (GABA_{B1a}-GABA_{B2} y GABA_{B1b}-GABA_{B2}) no revelan diferencias farmacológicas (*Kaupmann y cols., 1998*). No obstante, en la literatura se han ido acumulando ejemplos de la existencia de subtipos de receptores GABA_B

DISCUSIÓN

con distinto comportamiento farmacológico (*Holopainen y cols., 1992; Bonnano y Raiteri, 1993; Cunningham y Enna, 1996; Bonnano y cols., 1997; Ong y cols., 1998*). *Bonnano y Raiteri* (1993) propusieron que los receptores GABA_B se podían clasificar de acuerdo a su sensibilidad al baclofen. En nuestro estudio hemos constatado que la sustitución de taurina por baclofeno en presencia de cafeína no producía potenciación sináptica, por lo que de acuerdo a la clasificación de *Bonnano y Raiteri* (1993) el receptor GABA_B involucrado en el fenómeno de potenciación aquí descrito sería del tipo "insensible a baclofeno". De todas formas, cabe la posibilidad de que dicho receptor tenga una baja afinidad por baclofeno, lo que sería difícil de estimar en nuestra preparación experimental.

El receptor GABA_B no convencional también podría estar formado por homodímeros GABA_{B1}, cuya existencia en el hipocampo ha sido propuesta por Gassmann y cols. (2004). Tales receptores pueden estar acoplados a la vía de la MAP quinasa ERK1/2 (*Richer y cols., 2009*).

En definitiva, la taurina podría activar un subtipo de receptor GABA_B con propiedades farmacológicas diferentes a la de los GABA_B convencionales, que junto con la acción inhibitoria de la cafeína sobre los receptores de A1 o la activación de los A2_A, provocaría la activación de una cascada de señalización intracelular, que daría lugar a cambios duraderos en la eficacia sináptica.

5.5. Mecanismos de la señalización intracelular

En nuestro estudio hemos identificado farmacológicamente alguno de los componentes de la vía de señalización que participan en la potenciación sináptica inducida por cafeína y taurina (Fig. 5.1). Así, hemos observado que el mantenimiento de esa potenciación requiere la activación de la PKC y la PLC pero no de la PKA. ¿Cómo se integran estos estadios de la vía de señalización con los

DISCUSIÓN

receptores implicados en el fenómeno de potenciación inducido por cafeína y taurina? El proceso requiere que las sinapsis estén activadas lo que se traduce en la necesaria participación de los receptores AMPA. Como factor de coincidencia también se requiere la activación de los receptores P2X, que aportarían el calcio necesario para la estimulación de determinadas quinasas, por ejemplo la PKC. Por otra parte, tanto la inhibición de los A1 por cafeína como la activación de los A2_A, causaría la activación de la adenilato ciclasa, produciendo un aumento en la concentración de AMPc que activaría a la PKA, la cual está implicada en múltiple procesos de plasticidad sináptica. Sin embargo, nuestros experimentos indican que la PKA no es necesaria para el proceso de potenciación sináptica perdurable. Además de estar acoplados a la PKA, los receptores A2_A pueden acoplarse a la PKC (*Gubitz y cols., 1996*), lo que podría explicar la acción del agonista A2_A. De hecho, la activación de los receptores A2_A, a través de un mecanismo que involucra a la PKC, facilita la inducción de LTP (*Almeida y cols., 2003*). Estos datos podrían explicar cómo se estimula la vía de señalización cuando la potenciación sináptica la provocamos con un agonista A2_A y taurina, pero no serían apropiados para explicar la potenciación cuando aplicamos cafeína, dado que esta sustancia inhibe tanto los receptores A1 como los A2_A. En este caso es más plausible que la acción de la cafeína produzca un aumento de la actividad de la adenilato ciclasa, como comentamos anteriormente, y por lo tanto un incremento de AMPc en el citosol, pero que actuase en los mecanismos que dan lugar a la potenciación sináptica por un proceso independiente de la activación de la PKA. Se han descrito otros sensores de AMPc como la Epac ("Exchange protein directly activated by cAMP") que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para las GTPasas Rap1 y Rap2 (*Kawasaki y cols., 1998*). La activación de Epac en el hipocampo aumenta el

DISCUSIÓN

mantenimiento de la LTP (*Gelinas y cols., 2008*), por lo que no es descabellado proponer que la aplicación de cafeína provoca la activación de Epac en nuestros experimentos.

En cuanto a los receptores GABA_B no canónicos propuestos en este trabajo, desconocemos qué vías de señalización activan, aunque teniendo en cuenta nuestros datos debería reclutar a la vía de la PLC/PKC. Los receptores GABA_B convencionales normalmente tienen como efectores primarios a la adenilato ciclasa y a los canales de calcio y potasio; provocando la inhibición de los dos primeros y la activación del último (*Filippov y cols., 2000; Billinton y cols., 2001; Nicoll, 2004*). No obstante, existen evidencias de que la activación de los receptores GABA_B aumenta las corrientes de los canales de calcio de tipo L por un mecanismo que requiere la activación de la PKC, tanto en neuronas de la retina de la salamandra (*Shen y Slaughter, 1999*) como en el hipocampo de rata (*Tremblay y cols., 1995; Bray y Mynlieff, 2011*). Recientemente, han observado en *Aplysia* que la activación de los receptores GABA_B potencia las respuesta mediadas por dopamina a través de un mecanismo postsináptico que involucra a la PKC (*Svensson y cols., 2014*). Estos datos aportan la base experimental para nuestra propuesta de que la activación de los receptores GABA_B con características no canónicas está ligada a la vía PLC/PKC.

En resumen, la coaplicación de cafeína y taurina induciría, a través de la inhibición de los receptores de adenosina A1, la activación de los receptores de ATP de tipo P2X y la de unos GABA_B no canónicos, produciendo la activación de la vía adenilato ciclasa/AMPC/Epac; una entrada de Ca²⁺ y la activación PLC/PKC (Ver esquema de la figura 5.1). Aunque es bien conocida la participación de la PKC en los cambios de los receptores AMPA que se expresan en la LTP (*Boehm y cols., 2006; Knafo y*

DISCUSIÓN

cols., 2012), desconocemos cómo cooperan estas vías de señalización para, finalmente, producir un aumento duradero de la eficacia sináptica. No obstante, en neuronas sensoriales han puesto de manifiesto la existencia de una cooperación de vías de transducción de señales como la que proponemos. La Epac está implicada en la activación de PKC en respuesta a la estimulación de los receptores β -adrenérgicos (*Hucho y cols.*, 2005). Esta interacción entre Epac y PKC sensibiliza a los receptores de dolor y aumenta la sensibilidad al dolor mecánico.

5.6. Relevancia fisiológica y farmacológica.

El panel de expertos consultado por la Comunidad Europea en relación al uso de la taurina en las bebidas energéticas concluyó que el contenido de taurina en este tipo de bebidas no presentaba mayor problema de seguridad (*Aguilar y cols.*, 2009). Aunque reconocían que las posibles interacciones entre taurina y cafeína no habían sido investigadas.

En este contexto, los resultados obtenidos en esta tesis son especialmente relevantes al poner de manifiesto, por primera vez, un efecto sinérgico sobre la transmisión sináptica ocasionada por la administración de taurina y cafeína, dos de los componentes mayoritarios en este tipo de bebidas.

















Dado que no existe un incremento neto en los niveles de taurina en cerebro tras la administración oral de taurina en rata (*Sved y cols.*, 2007), se ha considerado improbable que la taurina proveniente del consumo de bebidas energéticas ejerza algún efecto farmacológico en el SNC (*Aguilar y cols.*, 2009). No obstante, la taurina podría tener un efecto neuroactivo sin que aumentase su concentración en el cerebro. Por ejemplo, existen datos experimentales que ponen de manifiesto que la taurina puede ejercer efectos duraderos sobre la eficacia sináptica por un mecanismo en el que está implicado su transporte en la membrana plasmática,

DISCUSIÓN

pero no su acumulación intracelular (del Olmo y cols., 2004; Suárez y cols., 2014). Además, en esta tesis hemos presentado evidencias experimentales de la existencia de un efecto de la taurina a través de la activación de un receptor GABA_B no convencional, lo que también sería independiente de un aumento de su concentración intracelular.

El efecto sinérgico de la coaplicación de taurina y y cafeína sobre la transmisión sináptica glutamatérgica podría tener consecuencias perjudiciales en estados de hiperexcitabilidad como la epilepsia. Por el contrario, la presencia de taurina también podría ser beneficiosa aumentando los moderados efectos cognitivos de la cafeína (*Nehlig, 2010*) y potenciando la capacidad neuroprotectora de la cafeína en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (*Costa y cols., 2011*).

DISCUSIÓN

-  Receptor GABAB
-  Receptor de adenosina A1
-  Receptor de adenosina A2A
-  Proteína G activadora
-  Proteína G inhibidora
-  Adenilato Ciclasa
-  Proteína quinasa C
-  Proteína Lipasa C
-  Canal Iónico
-  Receptor de Glutamato AMPA
-  Taurina
-  Cafeína
-  Adenosina
-  Receptor de Glutamato
-  Glutamato
-  ATP
- EN: Ectonucleotidasa

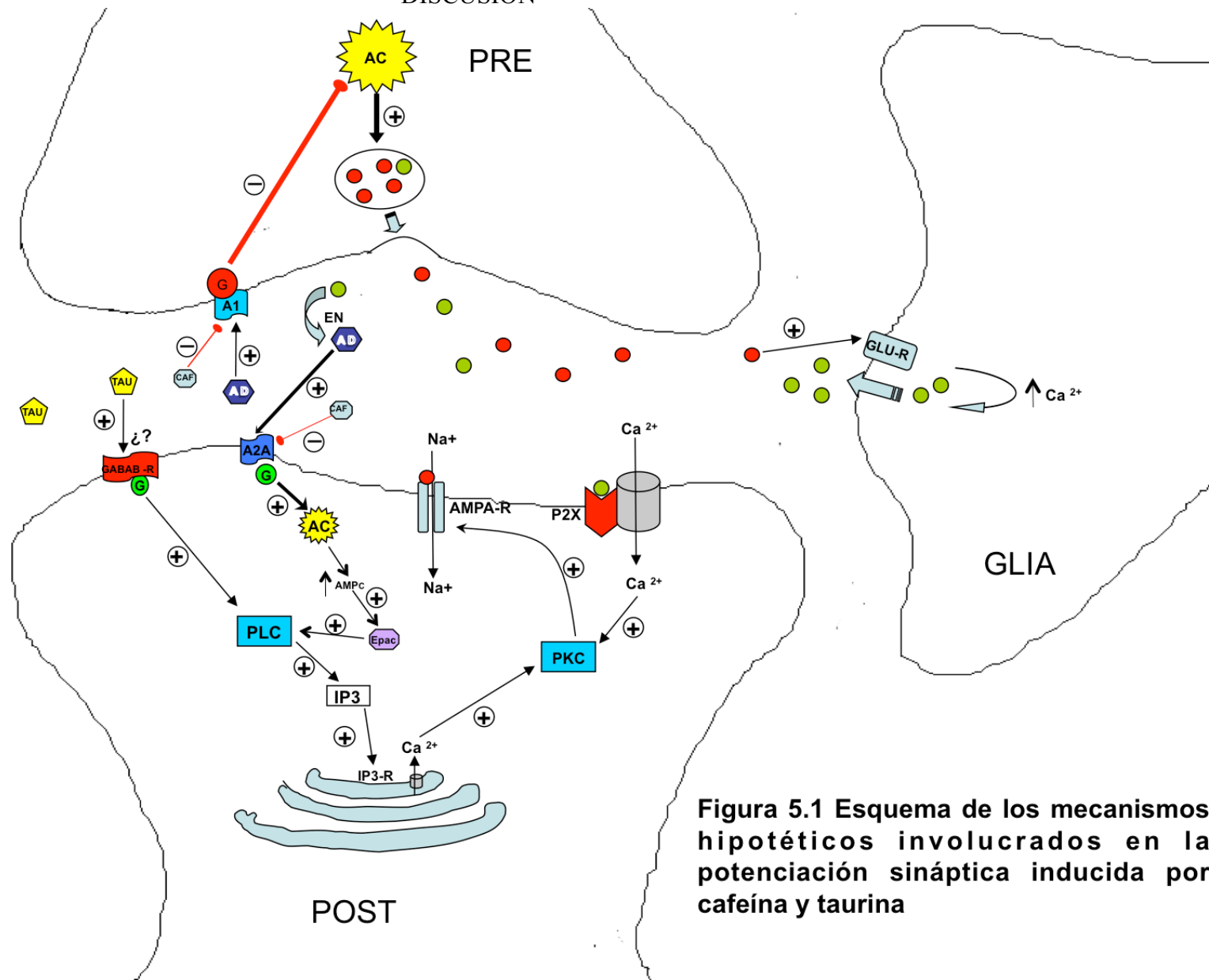


Figura 5.1 Esquema de los mecanismos hipotéticos involucrados en la potenciación sináptica inducida por cafeína y taurina

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tras los resultados presentados en esta tesis podemos concluir que:

1. La acción concomitante de taurina y cafeína en el hipocampo provoca un efecto sinérgico consistente en una potenciación duradera de la eficacia sináptica glutamatérgica.
2. Dicha potenciación sináptica necesita de la participación de diversos receptores de adenosina (del tipo A₁ y A_{2A}), de glutamato (del tipo AMPA), de ATP (del tipo P_{2X}) y de GABA (del tipo B).
3. La activación coordinada de estos receptores pone en marcha una vía de señalización que involucra a la proteína lipasa C y a la proteína quinasa C, la cual es necesaria para la inducción de esta potenciación sináptica.
4. La taurina activa receptores GABA_B no convencionales.
5. Las bebidas energéticas que contienen cafeína y taurina en su composición podrían tener un efecto sinérgico neuroactivo que aquí hemos presentado.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhatsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. <i>Trends Neurosci.</i> 2009; 1:19-29.
F. Aguilar, U.R. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D.M. Gott, S. Grilli, R. Guertler, G.E.N. Kass, J. Koenig, C. Lambré, J-C. Larsen, J-C. Leblanc, A. Mortensen, D. Parent-Massin, I. Pratt, I.M.C.M. Rietjens, I. Stankovic, P. Tobback, T. Verguieva, R.A. Woutersen. The use of taurine and D-glucurono-γ-lactone as constituents of the so-called “energy” drinks. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (Question No EFSA-Q-2007-113). <i>The EFSA Journal.</i> 2009; 935, 1-31
Akbar M, Okajima F, Tomura H, Shimegi S, Kondo Y. A single species of A1 adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release. <i>Mol Pharmacol.</i> 1994;5:1036-42.
Alford C, Cox H, Wescott R. The effects of red bull energy drink on human performance and mood. <i>Amino Acids.</i> 2001;2:139-50.
Almeida T, Rodrigues RJ, de Mendonça A, Ribeiro JA, Cunha RA. Purinergic P2 receptors trigger adenosine release leading to adenosine A2A receptor activation and facilitation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. <i>Neuroscience.</i> 2003;1:111-21.
Alom J, Mahy JN, Brandi N, Tolosa E. Cerebrospinal fluid taurine in Alzheimer's disease. <i>Ann Neurol.</i> 1991;5:735.
Andersen P, Silfvenius H, Sundberg SH, Sveen O, Wigström H. Functional characteristics of unmyelinated fibres in the hippocampal cortex. <i>Brain Res.</i> 1978; 1:11-8.
Aragon CM, Trudeau LE, Amit Z. Effect of taurine on ethanol-induced changes in open-field locomotor activity. <i>Psychopharmacology (Berl).</i> 1992;2-3 :337-40.
Aranda M, Morlock G. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. <i>J Chromatogr A.</i> 2006; 1-2:253-60.
Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M. Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2002; 15:9840-5.
Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. <i>Neuroscience.</i> 2006;4:941-52.
Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. <i>Handb Exp Pharmacol.</i> 2011;200:33-91.
Bagley PJ, Stipanuk MH. The activities of rat hepatic cysteine dioxygenase and cysteinesulfinate decarboxylase are regulated in a reciprocal manner in response to dietary casein level. <i>J Nutr.</i> 1994;12:2410-21.
Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı O, Cevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. <i>Hum Exp Toxicol.</i> 2001;5:251-4.
Balkan J, Kanbağlı O, Hatipoğlu A, Küçük M, Cevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. <i>Biosci Biotechnol Biochem.</i> 2002;8:1755-8.

BIBLIOGRAFÍA

Ballarín M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. <i>Acta Physiol Scand.</i> 1991;1:97-103.
Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. <i>Nat Rev Neurosci.</i> 2001;5:325-34.
Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL. GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. <i>Cereb Cortex.</i> 2001;8:744-53.
Benowitz NL, Jacob P 3rd, Mayan H, Denaro C. Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. <i>Clin Pharmacol Ther.</i> 1995;6:684-91.
Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. <i>J Neurochem.</i> 2006;6:1600-10.
Billinton A, Ige AO, Bolam JP, White JH, Marshall FH, Emson PC. Advances in the molecular understanding of GABA(B) receptors. <i>Trends Neurosci.</i> 2001; 5:277-82.
Björklund O, Halldner-Henriksson L, Yang J, Eriksson TM, Jacobson MA, Daré E, Fredholm BB. Decreased behavioral activation following caffeine, amphetamine and darkness in A3 adenosine receptor knock-out mice. <i>Physiol Behav.</i> 2008; 5:668-76.
Blanchard J, Sawers SJ. Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. <i>J Pharmacokinet Biopharm.</i> 1983;2:109-26.
Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. <i>Nature.</i> 1993; 6407:31-9.
Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. <i>Neuron.</i> 2006; 2:213-25.
Bonanno G, Fassio A, Schmid G, Severi P, Sala R, Raiteri M. Pharmacologically distinct GABAB receptors that mediate inhibition of GABA and glutamate release in human neocortex. <i>Br J Pharmacol.</i> 1997; 1:60-4.
Bonanno G, Raiteri M. gamma-Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABAB receptor. <i>J Pharmacol Exp Ther.</i> 1993; 2:765-70.
Bonanno G, Raiteri M. Multiple GABAB receptors. <i>Trends Pharmacol Sci.</i> 1993; 7:259-61.
Bosboom JL, Stoffers D, Wolters ECh. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. <i>J Neural Transm.</i> 2004;10-11:1303-15.
Boujendar S, Arany E, Hill D, Remacle C, Reusens B. Taurine supplementation of a low protein diet fed to rat dams normalizes the vascularization of the fetal endocrine pancreas. <i>J Nutr.</i> 2003;9:2820-5.
Bureau MH, Olsen RW. Taurine acts on a subclass of GABAA receptors in mammalian brain in vitro. <i>Eur J Pharmacol.</i> 199; 207(1):9-16.
Bray JG, Mynlieff M. Involvement of protein kinase C and protein kinase A in the enhancement of L-type calcium current by GABAB receptor activation in neonatal hippocampus. <i>Neuroscience.</i> 2011;179:62-72.
Burke LM. Caffeine and sports performance. <i>Appl Physiol Nutr Metab.</i> 2008; 6:1319-34.
Burnstock G, Fredholm BB, Verkhratsky A. Adenosine and ATP receptors in the brain. <i>Curr Top Med Chem.</i> 2011;8:973-1011.
Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? <i>Gen Pharmacol.</i> 1985;5:433-40.
Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. <i>J Neurosci.</i> 2009 ;29:147410

BIBLIOGRAFÍA

Carrier O, Pons G, Rey E, Richard MO, Moran C, Badoual J, Olive G. Maturation of caffeine metabolic pathways in infancy. <i>Clin Pharmacol Ther.</i> 1988;2:145-51.
Chaput MA, Palouzier-Paulignan B, Delaleu JC, Duchamp-Viret P. Taurine action on mitral cell activity in the frog olfactory bulb in vivo. <i>Chem Senses.</i> 2004;29:83-91.
Chelben J, Piccone-Sapir A, Ianco I, Shoenfeld N, Kotler M, Strous RD. Effects of amino acid energy drinks leading to hospitalization in individuals with mental illness. <i>Gen Hosp Psychiatry.</i> 2008;2:187-9.
Chen JF, Yu L, Shen HY, He JC, Wang X, Zheng R. What knock-out animals tell us about the effects of caffeine. <i>J Alzheimers Dis.</i> 2010;1:17-24.
Chen WQ, Jin H, Nguyen M, Carr J, Lee YJ, Hsu CC, Faiman MD, Schloss JV, Wu JY. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. <i>J Neurosci Res.</i> 2001;4:612-9.
Chen X, Ghribi O, Geiger JD. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. <i>J Alzheimers Dis.</i> 2010;20 Suppl 1:S127-41.
Chepkova AN, Doreulee N, Yanovsky Y, Mukhopadhyay D, Haas HL, Sergeeva OA. Long-lasting enhancement of corticostriatal neurotransmission by taurine. <i>Eur J Neurosci.</i> 2002;8:1523-30.
Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Cunha RA, Lluís C, Franco R. Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. <i>Cell Mol Life Sci.</i> 2006;21:2427-31.
Clements JR, Magnusson KR, Beitz AJ. Ultrastructural description of taurine-like immunoreactive cells and processes in the rat hippocampus. <i>Synapse.</i> 1989;1:70-9.
Cobb CO, Nasim A, Jentink K, Blank MD. The Role of Caffeine in the Alcohol Consumption Behaviors of College Students. <i>Subst Abus.</i> 2013, 26:1-9.
Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. <i>J Biol Chem.</i> 2003; 2:1354-62.
Cognato GP, Agostinho PM, Hockemeyer J, Müller CE, Souza DO, Cunha RA. Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. <i>J Neurochem.</i> 2010;2:453-62.
Cohen SM, Laurito CE, Curran MJ. Grand mal seizure in a postpartum patient following intravenous infusion of caffeine sodium benzoate to treat persistent headache. <i>J Clin Anesth.</i> 1992;1:48-51.
Cools R, Barker RA, Sahakian BJ, Robbins TW. Enhanced or impaired cognitive function in Parkinson's disease as a function of dopaminergic medication and task demands. <i>Cereb Cortex.</i> 2001;12:1136-43.
Cornelis MC, El-Sohehy A, Campos H. Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption. <i>Am J Clin Nutr.</i> 2007; 1:240-4.
Costa J, Lunet N, Santos C, Santos J, Vaz-Carneiro A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. <i>J Alzheimers Dis.</i> 2010;20:S221-38
Costenla AR, Cunha RA, de Mendonça A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. <i>J Alzheimers Dis.</i> 2010;20 Suppl 1:25-34.
Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. <i>Curr Opin Neurobiol.</i> 2001;3:327-35.
Cunha RA, Constantino MD, Ribeiro JA. ZM241385 is an antagonist of the facilitatory responses produced by the A2A adenosine receptor agonists CGS21680 and HENECA in the rat hippocampus. <i>Br J Pharmacol.</i> 1997;7:1279-84.
Cunha RA, Sebastião AM, Ribeiro JA. Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into

BIBLIOGRAFÍA

adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. <i>J Neurosci.</i> 1998; 6:1987-95.
Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastião AM. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. <i>J Neurochem.</i> 1996;5:2180-7.
Cunha RA. [Caffeine, adenosine receptors, memory and Alzheimer disease]. <i>Med Clin (Barc).</i> 2008;20:790-5.
Cunha RA. Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. <i>Neurochem Res.</i> 2001;8-9:979-91.
Cunningham MD, Enna SJ. Evidence for pharmacologically distinct GABAB receptors associated with cAMP production in rat brain. <i>Brain Res.</i> 1996; 1-2:220-4.
Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. <i>Cell Mol Neurobiol.</i> 2002;3:227-37.
Dall'Igna OP, Porciúncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. <i>Br J Pharmacol.</i> 2003; 7:1207-9.
Daly JW, Fredholm BB. Caffeine--an atypical drug of dependence. <i>Drug Alcohol Depend.</i> 1998;1-2:199-206.
Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. <i>J Neurophysiol.</i> 2003; 4:1870-7.
Davis JK, Green JM. Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. <i>Sports Med.</i> 2009;10:813-32.
Dawson R Jr, Biasetti M, Messina S, Dominy J. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. <i>Amino Acids.</i> 2002;4:309-24.
De la Rosa J, Stipanuk MH. The effect of taurine depletion with guanidinoethanesulfonate on bile acid metabolism in the rat. <i>Life Sci.</i> 1985; 36(14):1347-51.
De Saint Jan D, David-Watine B, Korn H, Bregestovski P. Activation of human alpha1 and alpha2 homomeric glycine receptors by taurine and GABA. <i>J Physiol.</i> 2001; 3:741-55.
Deckert J, Jorgensen MB. Evidence for pre- and postsynaptic localization of adenosine A1 receptors in the CA1 region of rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. <i>Brain Res.</i> 1988; 1:161-4.
del Olmo N, Bustamante J, del Río RM, Solís JM. Taurine activates GABA(A) but not GABA(B) receptors in rat hippocampal CA1 area. <i>Brain Res.</i> 2000a;2:298-307.
del Olmo N, Galarreta M, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM. Taurine-induced synaptic potentiation: role of calcium and interaction with LTP. <i>Neuropharmacology.</i> 2000b;1:40-54.
del Olmo N, Handler A, Alvarez L, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM. Taurine-induced synaptic potentiation and the late phase of long-term potentiation are related mechanistically. <i>Neuropharmacology.</i> 2003; 1:26-39.
del Olmo N, Suárez LM, Orensanz LM, Suárez F, Bustamante J, Duarte JM, Martín del Río R, Solís JM. Role of taurine uptake on the induction of long-term synaptic potentiation. <i>Eur J Neurosci.</i> 2004;7:1875-86.
Denaro CP, Brown CR, Wilson M, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. <i>Clin Pharmacol Ther.</i> 1990; 3:277-85.
Dewachter I, van Dorpe J, Spittaels K, Tesseur I, Van Den Haute C, Moechars D, Van Leuven F. Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. <i>Exp Gerontol.</i>

BIBLIOGRAFÍA

2000;6-7:831-41.
Diógenes MJ, Fernandes CC, Sebastião AM, Ribeiro JA. Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. <i>J Neurosci</i> . 2004;12:2905-13.
Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. <i>Br J Pharmacol</i> . 1996;6:1461-8.
Djuricic B, Berger R, Paschen W. Protein synthesis and energy metabolism in hippocampal slices during extended (24 hours) recovery following different periods of ischemia. <i>Metab Brain Dis</i> . 1994; 4:377-89.
Dominy JE, Stipanuk MH. New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H ₂ S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. <i>Nutr Rev</i> . 2004;9:348-53.
Duan WM, Rodrigues CM, Zhao LR, Steer CJ, Low WC. Tauroursodeoxycholic acid improves the survival and function of nigral transplants in a rat model of Parkinson's disease. <i>Cell Transplant</i> . 2002;3:195-205.
Duarte JM, Carvalho RA, Cunha RA, Gruetter R. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. <i>J Neurochem</i> . 2009;2:368-79.
Dubois B, Pillon B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. <i>J Neurol</i> . 1997;1:2-8.
Dunwiddie TV, Diao L, Kim HO, Jiang JL, Jacobson KA. Activation of hippocampal adenosine A ₃ receptors produces a desensitization of A ₁ receptor-mediated responses in rat hippocampus. <i>J Neurosci</i> . 1997;2:607-14.
Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. <i>Annu Rev Neurosci</i> . 2001;24:31-55.
Dux E, Fastbom J, Ungerstedt U, Rudolphi K, Fredholm BB. Protective effect of adenosine and a novel xanthine derivative propentofylline on the cell damage after bilateral carotid occlusion in the gerbil hippocampus. <i>Brain Res</i> . 1990;2:248-56.
Egan TM, Khakh BS. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. <i>J Neurosci</i> . 2004; 13:3413-20.
El Idrissi A, Messing J, Scalia J, Trenkner E. Prevention of epileptic seizures by taurine. <i>Adv Exp Med Biol</i> . 2003;526:515-25.
El Idrissi A, Trenkner E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. <i>J Neurosci</i> . 1999;21:9459-68.
Engelborghs S, Marescau B, De Deyn PP. Amino acids and biogenic amines in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. <i>Neurochem Res</i> . 2003;8:1145-50.
Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. <i>J Alzheimers Dis</i> . 2009;16:85-91.
F. Aguilar, UR. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D.M. Gott, S. Grilli, R. Guertler, G.E.N. Kass, J. Koenig, C. Lambré, J-C Larsen, J-C. Leblanc, A. Motensen, D. Parent-Massin, I. Pratt, I.M.C.M. Rietjens, I. Stankovic, P. Tobback, T. Verguieva, R.A. Woutersen. The use of taurine and D-Glucorono-g-lactone as constituents of the so-called "energy" drinks. <i>The EFSA Journal</i> . 2009; 935, 1-31.
Ferko AP, Bobyock E. Effect of taurine on ethanol-induced sleep time in mice genetically bred for differences in ethanol sensitivity. <i>Pharmacol Biochem Behav</i> . 1988;3:667-73.
Ferre S, Ciruela F, Borycz J, Solinas M, Quarta D, Antoniou K, Quiroz C, Justinova Z, Lluís C, Franco R, Goldberg SR. Adenosine A ₁ -A _{2A} receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. <i>Front Biosci</i> . 2008; 13:2391-9.

BIBLIOGRAFÍA

Ferreira SE, de Mello MT, Pompéia S, de Souza-Formigoni ML. Effects of energy drink ingestion on alcohol intoxication. <i>Alcohol Clin Exp Res.</i> 2006; 4:598-605.
Ferreira SE, de Mello MT, Rossi MV, Souza-Formigoni ML. Does an energy drink modify the effects of alcohol in a maximal effort test? <i>Alcohol Clin Exp Res.</i> 2004;9:1408-12.
Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. <i>Nat Rev Neurosci.</i> 2006;6:423-36.
Filippov AK, Couve A, Pangalos MN, Walsh FS, Brown DA, Moss SJ. Heteromeric assembly of GABA(B)R1 and GABA(B)R2 receptor subunits inhibits Ca(2+) current in sympathetic neurons. <i>J Neurosci.</i> 2000; 8:2867-74.
Fitzjohn SM, Collingridge GL. Calcium stores and synaptic plasticity. <i>Cell Calcium.</i> 2002; 32:405-11
Flint AC, Liu X, Kriegstein AR. Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. <i>Neuron.</i> 1998; 1:43-53.
Flora SJ, Pande M, Bhadauria S, Kannan GM. Combined administration of taurine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in the treatment of chronic lead intoxication in rats. <i>Hum Exp Toxicol.</i> 2004;4:157-66.
Franco R, Torres-Márquez ME, Pasantes-Morales H. Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. <i>Pflugers Arch.</i> 2001;5:791-800.
Franconi F, Loizzo A, Ghirlanda G, Seghieri G. Taurine supplementation and diabetes mellitus. <i>Curr Opin Clin Nutr Metab Care.</i> 2006;1:32-6.
Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. <i>Pharmacol Rev.</i> 1999;1:83-133.
Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. <i>Int Rev Neurobiol.</i> 2005;63:191-270.
Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. <i>Pharmacol Rev.</i> 2011;1:1-34.
Fredholm BB, Lerner U. Metabolism of adenosine and 2'-deoxy-adenosine by fetal mouse calvaria in culture. <i>Med Biol.</i> 1982;5:267-71.
Fredholm BB. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. <i>Pharmacol Toxicol.</i> 1995;2:93-101.
Fredholm BB. Purinoceptors in the nervous system. <i>Pharmacol Toxicol.</i> 1995;4:228-39.
Freund S, Ungerer M, Lohse MJ. A1 adenosine receptors expressed in CHO-cells couple to adenylyl cyclase and to phospholipase C. <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.</i> 1994;1:49-56.
Frosini M, Sesti C, Dragoni S, Valoti M, Palmi M, Dixon HB, Machetti F, Sgaragli G. Interactions of taurine and structurally related analogues with the GABAergic system and taurine binding sites of rabbit brain. <i>Br J Pharmacol.</i> 2003; 6:1163-71.
Gähwiler BH, Brown DA. GABAB-receptor-activated K+ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1985;5:1558-62.
Galarreta M, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM. Taurine induces a long-lasting increase of synaptic efficacy and axon excitability in the hippocampus. <i>J Neurosci.</i> 1996 ;1:92-102.
Garaschuk O, Yaari Y, Konnerth A. Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. <i>J Physiol.</i> 1997; 1:13-30.
Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, Humeau Y, Schuler V, Müller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly PH, Gentry C, Jatón AL, Van der Putten H, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan JF, Fritschy JM, Lüthi A, Kaupmann K, Bettler B. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB

BIBLIOGRAFÍA

responses in GABAB(2)-deficient mice. <i>J Neurosci.</i> 2004; 27:6086-97.
Gelinas JN, Banko JL, Peters MM, Klann E, Weeber EJ, Nguyen PV. Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. <i>Learn Mem.</i> 2008; 6:403-11.
Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, Szarek WA, Tremblay P. Targeting soluble Aβ peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. <i>Neurobiol Aging.</i> 2007;4:537-47.
Gilliland K, Bullock W. Caffeine: a potential drug of abuse. <i>Adv Alcohol Subst Abuse.</i> 1983-1984;1-2:53-73.
Goldstein L, Brill SR. Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. <i>Am J Physiol.</i> 1991;2:1014-20.
Goodman RR, Synder SH. Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. <i>J Neurosci.</i> 1982;9:1230-41.
Gottardi W, Nagl M. N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. <i>J Antimicrob Chemother.</i> 2010;3:399-409.
Grasser EK, Dulloo AG, Montani JP. Cardiovascular and cerebrovascular effects in response to red bull consumption combined with mental stress. <i>Am J Cardiol.</i> 2015; 2:183-9.
Green RM, Stiles GL. Chronic caffeine ingestion sensitizes the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. <i>J Clin Invest.</i> 1986;1:222-7.
Grisham MB, Jefferson MM, Thomas EL. Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. <i>J Biol Chem.</i> 1984;11:6757-65.
Gubitza AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ. Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. <i>J Neurochem.</i> 1996; 1:374-81.
Gunja N, Brown JA. Energy drinks: health risks and toxicity. <i>Med J Aust.</i> 2012;1:46-9.
Gupta RC, Win T, Bittner S. Taurine analogues; a new class of therapeutics: retrospect and prospects. <i>Curr Med Chem.</i> 2005;17:2021-39.
Hagar HH. The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. <i>Toxicol Lett.</i> 2004;2:335-43.
Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. <i>Annu Rev Physiol.</i> 2010;72:335-55
Halldner L, Lopes LV, Daré E, Lindström K, Johansson B, Ledent C, Cunha RA, Fredholm BB. Binding of adenosine receptor ligands to brain of adenosine receptor knock-out mice: evidence that CGS 21680 binds to A1 receptors in hippocampus. <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.</i> 2004; 4:270-8.
Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. The taurine transporter: mechanisms of regulation. <i>Acta Physiol (Oxf).</i> 2006;1-2:61-73.
Hanretta AT, Lombardini JB. Properties of spontaneous and evoked release of taurine from hypothalamic crude P2 synaptosomal preparations. <i>Brain Res.</i> 1986;2:205-15.
Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. <i>Diabetes Metab Res Rev.</i> 2001;5:330-46.
Hauber W, Bareiss A. Facilitative effects of an adenosine A1/A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. <i>Behav Brain Res.</i> 2001;1:43-52.

BIBLIOGRAFÍA

Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. <i>J Food Sci.</i> 2010;3:77-87.
Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G. Diet and Parkinson's disease. II: A possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case-control study. <i>Neurology.</i> 1996;3:644-50.
Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D. Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. <i>FASEB J.</i> 2002;2:231-3.
Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Saldaña IT, Ramos-Mandujano G. Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. <i>J Neurosci Res.</i> 2010;8:1673-81.
Hernández-Benítez R, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H. Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. <i>Stem Cell Res.</i> 2012;1:24-34.
Hettinger BD, Lee A, Linden J, Rosin DL. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. <i>J Comp Neurol.</i> 2001; 3:331-46.
Hewlett P, Smith A. Effects of repeated doses of caffeine on performance and alertness: new data and secondary analyses. <i>Hum Psychopharmacol.</i> 2007;6:339-50.
Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. <i>Eur J Pharmacol.</i> 2003;1:21-5.
Hirst WD, Babbs AJ, Green A, Minton JA, Shaw TE, Wise A, Rice SQ, Pangalos MN, Price GW. Pharmacological characterisation of a cell line expressing GABA B1b and GABA B2 receptor subunits. <i>Biochem Pharmacol.</i> 2003 Apr 1;65(7):1103-13. PubMed PMID: 12663046.
Holopainen I, Rau C, Wojcik WJ. Proposed antagonists at GABAB receptors that inhibit adenylyl cyclase in cerebellar granule cell cultures of rat. <i>Eur J Pharmacol.</i> 1992; 2:225-8.
Horikoshi T, Asanuma A, Yanagisawa K, Anzai K, Goto S. Taurine and beta-alanine act on both GABA and glycine receptors in <i>Xenopus</i> oocyte injected with mouse brain messenger RNA. <i>Brain Res.</i> 1988;2:97-105.
Hörtnagl H, Berger ML, Sperk G, Piffl C. Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. <i>Neuroscience.</i> 1991;2:261-72.
Huang DY, Boini KM, Lang PA, Grahmmer F, Duszenko M, Heller-Stilb B, Warskulat U, Häussinger D, Lang F, Vallon V. Impaired ability to increase water excretion in mice lacking the taurine transporter gene TAUT. <i>Pflugers Arch.</i> 2006;5:668-77.
Hucho TB, Dina OA, Levine JD. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. <i>J Neurosci.</i> 2005; 26:6119-26.
Hughes JR, Oliveto AH, Liguori A, Carpenter J, Howard T. Endorsement of DSM-IV dependence criteria among caffeine users. <i>Drug Alcohol Depend.</i> 1998;2:99-107.
Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarménien MG, Moos F. Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. <i>J Physiol.</i> 1997;3:609-21.
Hussy N. Glial cells in the hypothalamo-neurohypophysial system: key elements of the regulation of neuronal electrical and secretory activity. <i>Prog Brain Res.</i> 2002;139:95-112.
Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. <i>Physiol Rev.</i> 1992;1:101-63.
Huxtable RJ. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. <i>Prog Neurobiol.</i> 1989;6:471-533.

BIBLIOGRAFÍA

Inomata H, Nabekura J, Akaike N. Suppression of taurine response in acutely dissociated substantia nigra neurons by intracellular cyclic AMP. <i>Brain Res.</i> 1993;615(2):347-50.
Inoue K, Koizumi S, Ueno S. Implication of ATP receptors in brain functions. <i>Prog Neurobiol.</i> 1996; 5-6:483-92.
Isaacson JS, Solís JM, Nicoll RA. Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. <i>Neuron.</i> 1993; 2:165-75.
Iyadurai SJ, Chung SS. New-onset seizures in adults: possible association with consumption of popular energy drinks. <i>Epilepsy Behav.</i> 2007;3:504-8.
Jensen BW, Nichols M, Allender S, de Silva-Sanigorski A, Millar L, Kremer P, Lacy K, Swinburn B. Consumption patterns of sweet drinks in a population of Australian children and adolescents (2003-2008). <i>BMC Public Health.</i> 2012; 12:771.
Jia F, Yue M, Chandra D, Keramidas A, Goldstein PA, Homanics GE, Harrison NL. Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. <i>J Neurosci.</i> 2008;1:106-15.
Jiang Z, Krnjević K, Wang F, Ye JH. Taurine activates strychnine-sensitive glycine receptors in neurons freshly isolated from nucleus accumbens of young rats. <i>J Neurophysiol.</i> 2004;1:248-57.
Jo YH, Role LW. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. <i>J Neurosci.</i> 2002; 12:4794-804.
Jockers R, Linder ME, Hohenegger M, Nanoff C, Bertin B, Strosberg AD, Marullo S, Freissmuth M. Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A1-adenosine receptor. <i>J Biol Chem.</i> 1994;51:32077-84.
Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, Itoh T. Release of taurine and its effects on release of neurotransmitter amino acids in rat cerebral cortex. <i>Adv Exp Med Biol.</i> 1996;403:445-54.
Kanayama A, Inoue J, Sugita-Konishi Y, Shimizu M, Miyamoto Y. Oxidation of Ikappa Balpha at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-kappa B activation. <i>J Biol Chem.</i> 2002;27:24049-56.
Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. <i>Science.</i> 2001, 5544:1030-8.
Kaplan GB, Greenblatt DJ, Leduc BW, Thompson ML, Shader RI. Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity. <i>J Pharmacol Exp Ther.</i> 1989; 3:1078-83.
Kaufman KR, Sachdeo RC. Caffeinated beverages and decreased seizure control. <i>Seizure.</i> 2003;7:519-21.
Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B. Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K ⁺ channels. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1998; 25:14991-6.
Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, Chen EJ, Bany IA, Mochizuki N, Ashbacher A, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1998;95:13278-83.
Kendler KS, Prescott CA. Caffeine intake, tolerance, and withdrawal in women: a population-based twin study. <i>Am J Psychiatry.</i> 1999; 2:223-8.
Kessey K, Mogul DJ. NMDA-Independent LTP by adenosine A2 receptor-mediated postsynaptic AMPA potentiation in hippocampus. <i>J Neurophysiol.</i> 1997; 4:1965-72.
Király E, Jones DG. Dendritic spine changes in rat hippocampal pyramidal cells after postnatal lead treatment: a Golgi study. <i>Exp Neurol.</i> 1982;1:236-9.
Kirchner A, Breustedt J, Rosche B, Heinemann UF, Schmieden V. Effects of taurine and glycine on epileptiform activity induced by removal of Mg ²⁺ in combined rat entorhinal cortex-hippocampal slices. <i>Epilepsia.</i> 2003;44(9):1145-52.

BIBLIOGRAFÍA

Klyuch BP, Dale N, Wall MJ. Receptor-mediated modulation of activity-dependent adenosine release in rat cerebellum. <i>Neuropharmacology</i> . 2012; 62:815-24
Knafo S, Venero C, Sánchez-Puelles C, Pereda-Peréz I, Franco A, Sandi C, Suárez LM, Solís JM, Alonso-Nanclares L, Martín ED, Merino-Serrais P, Borcel E, Li S, Chen Y, Gonzalez-Soriano J, Berezin V, Bock E, Defelipe J, Esteban JA. Facilitation of AMPA receptor synaptic delivery as a molecular mechanism for cognitive enhancement. <i>PLoS Biol</i> . 2012;2:1001262.
Kontro P, Marnela KM, Oja SS. Free amino acids in the synaptosome and synaptic vesicle fractions of different bovine brain areas. <i>Brain Res</i> . 1980;1:129-41.
Kontro P, Oja SS. Interactions of taurine with GABAB binding sites in mouse brain. <i>Neuropharmacology</i> . 1990;3:243-7.
Kontro P, Oja SS. Taurine and GABA binding in mouse brain: effects of freezing, washing and Triton X-100 treatment on membranes. <i>Int J Neurosci</i> . 1987;3-4:881-9.
Krogsgaard-Larsen P, Falch E. GABA agonists. Development and interactions with the GABA receptor complex. <i>Mol Cell Biochem</i> . 1981;1:129-46.
Kulakowski EC, Maturo J. Does taurine bind to the insulin binding site of the insulin receptor? <i>Prog Clin Biol Res</i> . 1990;351:95-102.
Kundaiker S, Hussain AA, Marshall J. Component characteristics of the vectorial transport system for taurine in isolated bovine retinal pigment epithelium. <i>J Physiol</i> . 1996;2:505-16.
Kunin D, Gaskin S, Rogan F, Smith BR, Amit Z. Caffeine promotes ethanol drinking in rats. Examination using a limited-access free choice paradigm. <i>Alcohol</i> . 2000;3:271-7.
Kuribara H, Tadokoro S. Caffeine does not effectively ameliorate, but rather may worsen the ethanol intoxication when assessed by discrete avoidance in mice. <i>Jpn J Pharmacol</i> . 1992;3:393-8.
Kuriyama K, Hashimoto T. Interrelationship between taurine and GABA. <i>Adv Exp Med Biol</i> . 1998;442:329-37.
Lake N, Marshall J, Voaden MJ. The entry of taurine into the neural retina and pigment epithelium of the frog. <i>Brain Res</i> . 1977;3:497-503.
Lambert IH, Hoffmann EK. Regulation of taurine transport in Ehrlich ascites tumor cells. <i>J Membr Biol</i> . 1993;1):67-79.
Langosch D, Thomas L, Betz H. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 1988;19:7394-8.
Lasley SM, Gilbert ME. Lead inhibits the rat N-methyl-d-aspartate receptor channel by binding to a site distinct from the zinc allosteric site. <i>Toxicol Appl Pharmacol</i> . 1999 ;3:224-33.
Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. <i>J Neurochem</i> . 2001;3:463-84.
Lehmann A, Isacson H, Hamberger A. Effects of in vivo administration of kainic acid on the extracellular amino acid pool in the rabbit hippocampus. <i>J Neurochem</i> . 1983;5:1314-20.
Lelo A, Miners JO, Robson R, Birkett DJ. Assessment of caffeine exposure: caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines. <i>Clin Pharmacol Ther</i> . 1986;1:54-9.
Leon R, Wu H, Jin Y, Wei J, Buddhala C, Prentice H, Wu JY. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. <i>J Neurosci Res</i> . 2009;5:1185-94.
Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, Martín del Río R. In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. <i>Brain Res</i> . 1986;1:145-55.

BIBLIOGRAFÍA

Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sévigny J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. <i>Br J Pharmacol.</i> 2007; 1:141-50.
Li H, Henry JL. Adenosine A2 receptor mediation of pre- and postsynaptic excitatory effects of adenosine in rat hippocampus in vitro. <i>Eur J Pharmacol.</i> 1998; 2-3:173-82.
Liguori A, Robinson JH. Caffeine antagonism of alcohol-induced driving impairment. <i>Drug Alcohol Depend.</i> 2001;2:123-9.
Liu QR, López-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1992;24:12145-9.
Lobo MV, Alonso FJ, Martin del Rio R. Immunocytochemical localization of taurine in different muscle cell types of the dog and rat. <i>Histochem J.</i> 2000;32:53-61.
Lombardini JB. Effects of ATP and taurine on calcium uptake by membrane preparations of the rat retina. <i>J Neurochem.</i> 1983;2:402-6.
Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA. Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. <i>Neuroscience.</i> 2002;2:319-29.
Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA. Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A2A receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats. <i>J Neurochem.</i> 1999;4:1733-8.
Maar T, Morán J, Schousboe A, Pasantes-Morales H. Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. <i>Int J Dev Neurosci.</i> 1995;5:491-502.
Machado-Vieira R, Viale CI, Kapczinski F. Mania associated with an energy drink: the possible role of caffeine, taurine, and inositol. <i>Can J Psychiatry.</i> 2001;5:454-5.
Maia L, de Mendonça A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? <i>Eur J Neurol.</i> 2002 Jul;9:377-82.
Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. <i>Trends Neurosci.</i> 1993; 12:521-7.
Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ, Nicoll RA. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. <i>J Neurophysiol.</i> 1993; 4:1451-9.
Martín del Río R, Solís JM. The anion-exchanger AE1 is a diffusion pathway for taurine transport in rat erythrocytes. <i>Adv Exp Med Biol.</i> 1998;442:255-60.
Martín ED, Buño W. Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. <i>J Neurophysiol.</i> 2003;6:3029-38.
Matsushima Y, Sekine T, Kondo Y, Sakurai T, Kameo K, Tachibana M, Murakami S. Effects of taurine on serum cholesterol levels and development of atherosclerosis in spontaneously hyperlipidaemic mice. <i>Clin Exp Pharmacol Physiol.</i> 2003;4:295-9.
McCool BA, Botting SK. Characterization of strychnine-sensitive glycine receptors in acutely isolated adult rat basolateral amygdala neurons. <i>Brain Res.</i> 2000;2:341-51.
McPherson PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. <i>Neuron.</i> 1991;1:17-25.
Menéndez N, Solís JM, Herreras O, Sánchez Herranz A, Martín del Río R. Role of endogenous taurine on the glutamate analogue-induced neurotoxicity in the rat hippocampus in vivo. <i>J Neurochem.</i> 1990; 2:714-7.
Mintz IM, Bean BP. GABAB receptor inhibition of P-type Ca ²⁺ channels in central neurons. <i>Neuron.</i> 1993;5:889-98.
Mori M, Gähwiler BH, Gerber U. Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. <i>J Physiol.</i> 2002;1:191-200.

BIBLIOGRAFÍA

Morris RG, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, O'Carroll C. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. <i>Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.</i> 2003; 358:773-86.
Mueller SM, Solow EB. Seizures associated with a new combination "pick-me-up" pill. <i>Ann Neurol.</i> 1982;3:322.
Murakami S, Kondo Y, Nagate T. Effects of long-term treatment with taurine in mice fed a high-fat diet: improvement in cholesterol metabolism and vascular lipid accumulation by taurine. <i>Adv Exp Med Biol.</i> 2000;483:177-86.
Nagelhus EA, Lehmann A, Ottersen OP. Neuronal-glia exchange of taurine during hypo-osmotic stress: a combined immunocytochemical and biochemical analysis in rat cerebellar cortex. <i>Neuroscience.</i> 1993;3:615-31.
Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Anuradha CV. Stimulation of glucose utilization and inhibition of protein glycation and AGE products by taurine. <i>Acta Physiol Scand.</i> 2004;3:297-303.
Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Anuradha CV. Taurine modifies insulin signaling enzymes in the fructose-fed insulin resistant rats. <i>Diabetes Metab.</i> 2005a;1:337-44.
Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. <i>Singapore Med J.</i> 2005b;2:82-7.
Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. <i>Brain Res Brain Res Rev.</i> 1992; 2:139-70.
Nehlig A. Is caffeine a cognitive enhancer? <i>J Alzheimers Dis.</i> 2010;20:S85-94.
Neuringer M, Palackal T, Kujawa M, Moretz RC, Sturman JA. Visual cortex development in rhesus monkeys deprived of dietary taurine. <i>Prog Clin Biol Res.</i> 1990;351:415-22.
Newton AC. Lipid activation of protein kinases. <i>J Lipid Res.</i> 2009 Apr;50 Suppl:S266-71. doi: 10.1194/jlr.R800064-JLR200. Epub 2008 Nov 24. Review. PubMed PMID: 19033211; PubMed Central PMCID: PMC2674703.
Nicoll RA, Alger BE. A simple chamber for recording from submerged brain slices. <i>J Neurosci Methods.</i> 1981; 2:153-6.
Nicoll RA. My close encounter with GABA(B) receptors. <i>Biochem Pharmacol.</i> 2004;8:1667-74.
O'Brien MC, McCoy TP, Rhodes SD, Wagoner A, Wolfson M. Caffeinated cocktails: energy drink consumption, high-risk drinking, and alcohol-related consequences among college students. <i>Acad Emerg Med.</i> 2008;5:453-60.
Okada M, Kiryu K, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Tasaki H, Kaneko S. Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine release by in vivo microdialysis. <i>Eur J Pharmacol.</i> 1997; 2:181-8.
Ong J, Marino V, Parker DA, Kerr DI. Differential effects of phosphonic analogues of GABA on GABA(B) autoreceptors in rat neocortical slices. <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.</i> 1998; 4:408-12.
Ottersen OP. Quantitative assessment of taurine-like immunoreactivity in different cell types and processes in rat cerebellum: an electronmicroscopic study based on a postembedding immunogold labelling procedure. <i>Anat Embryol (Berl).</i> 1988;5:407-21.
Palkovits M, Elekes I, Láng T, Patthy A. Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. <i>J Neurochem.</i> 1986; 5:1333-5.
Pankratov YV, Lalo UV, Krishtal OA. Role for P2X receptors in long-term potentiation. <i>J Neurosci.</i> 2002; 19:8363-9.
Pasantes Morales H, Schousboe A. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. <i>J Neurosci Res.</i> 1988;4:503-9.
Pasantes-Morales H, Cruz C. Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. <i>J Neurosci Res.</i> 1984;3:303-11.

BIBLIOGRAFÍA

Pasantes-Morales H, Schousboe A. Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. <i>Glia</i> . 1989;1:45-50.
Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. <i>Science</i> . 2005;5745:113-6.
Paula-Lima AC, De Felice FG, Brito-Moreira J, Ferreira ST. Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. <i>Neuropharmacology</i> . 2005;8:1140-8.
Peck EJ Jr, Awapara J. Formation of taurine and isethionic acid in rat brain. <i>Biochim Biophys Acta</i> . 1967; 3:499-506.
Pereira GS, Mello e Souza T, Vinadé ER, Choi H, Rodrigues C, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ, Bonan CD. Blockade of adenosine A1 receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. <i>Eur J Pharmacol</i> . 2002 ;3:151-4.
Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. <i>J Neurosci</i> . 2001;4:1228-37.
Petróczi A, Naughton DP, Pearce G, Bailey R, Bloodworth A, McNamee M. Nutritional supplement use by elite young UK athletes: fallacies of advice regarding efficacy. <i>J Int Soc Sports Nutr</i> . 2008;5:22.
Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S. Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. <i>Glia</i> . 2002; 2:153-68.
Puopolo M, Kratskin I, Belluzzi O. Direct inhibitory effect of taurine on relay neurones of the rat olfactory bulb in vitro. <i>Neuroreport</i> . 1998;10:2319-23.
Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. <i>Pharmacol Rev</i> . 1998; 3:413-92.
Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. <i>Neuron</i> . 2008; 1:121-34.
Rebola N, Rodrigues RJ, Lopes LV, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. <i>Neuroscience</i> . 2005;1:79-83.
Reissig CJ, Strain EC, Griffiths RR. Caffeinated energy drinks--a growing problem. <i>Drug Alcohol Depend</i> . 2009 ;1-3:1-10.
Reymond I, Almarghini K, Tappaz M. Immunocytochemical localization of cysteine sulfinate decarboxylase in astrocytes in the cerebellum and hippocampus: a quantitative double immunofluorescence study with glial fibrillary acidic protein and S-100 protein. <i>Neuroscience</i> . 1996; 2:619-33.
Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. <i>J Biol Chem</i> . 1992; 18:12393-6.
Ricci L, Frosini M, Gaggelli N, Valensin G, Machetti F, Sgaragli G, Valoti M. Inhibition of rabbit brain 4-aminobutyrate transaminase by some taurine analogues: a kinetic analysis. <i>Biochem Pharmacol</i> . 2006;10:1510-9.
Richer M, David M, Villeneuve LR, Trieu P, Ethier N, Pétrin D, Mamarbachi AM, Hébert TE. GABA-B(1) receptors are coupled to the ERK1/2 MAP kinase pathway in the absence of GABA-B(2) subunits. <i>J Mol Neurosci</i> . 2009; 1:67-79.
Riedel W, Hogervorst E, Lebox R, Verhey F, van Praag H, Jolles J. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. <i>Psychopharmacology (Berl)</i> . 1995;2:158-68.
Ritchie K, Carrière I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). <i>Neurology</i> . 2007;69:536-45.

BIBLIOGRAFÍA

Robertson SJ, Edwards FA. ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. <i>J. Physiol.</i> 1998; 3:691-701
Rodríguez-Navarro JA, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, González-Vigueras JM, Solís JM. High potassium induces taurine release by osmosensitive and osmoresistant mechanisms in the rat hippocampus in vivo. <i>J Neurosci Res.</i> 2009;1:208-17.
Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Tanner CM. Relationship between caffeine intake and parkinson disease. <i>JAMA.</i> 2000;11:1378-9.
Sajikumar S, Navakkode S, Frey JU. Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques. <i>Curr Opin Neurobiol.</i> 2005; 5:607-13.
Sans N, Prybylowski K, Petralia RS, Chang K, Wang YX, Racca C, Vicini S, Wenthold RJ. NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. <i>Nat Cell Biol.</i> 2003;6:520-30.
Santa-María I, Hernández F, Moreno FJ, Avila J. Taurine, an inducer for tau polymerization and a weak inhibitor for amyloid-beta-peptide aggregation. <i>Neurosci Lett.</i> 2007;2-3:91-4.
Santiago Ramón y Cajal. <i>Histología del Sistema Nervioso de l'Homme et des Vertébrés.</i> 1911. París: A. Maloine
Satoh H, Sperelakis N. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. <i>Gen Pharmacol.</i> 1998;4:451-63.
Schmidt D. Comments on Iyadurai SJ, Chung SS. New-onset seizures in adults: possible association with consumption of popular energy drinks. <i>Epilepsy & behavior</i> 2007;10:504-508. <i>Epilepsy Behav.</i> 2014;40:45-6.
Schmieden V, Kuhse J, Betz H. Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. <i>EMBO J.</i> 1992;6:2025-32.
Schousboe A, Sánchez Olea R, Morán J, Pasantes-Morales H. Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. <i>J Neurosci Res.</i> 1991;4:661-5.
Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. <i>Neurochem Res.</i> 2004;1:117-26.
Sebastião AM, Cunha RA, de Mendonça A, Ribeiro JA. Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. <i>Br J Pharmacol.</i> 2000; 8:1629-34.
Sebastião AM, Ribeiro JA. Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. <i>Curr Neuropharmacol.</i> 2009; 3:180-94.
Sebring LA, Huxtable RJ. Taurine modulation of calcium binding to cardiac sarcolemma. <i>J Pharmacol Exp Ther.</i> 1985;2:445-51.
Sergeeva OA, Chepkova AN, Doreulee N, Eriksson KS, Poelchen W, Mönnighoff I, Heller-Stilb B, Warskulat U, Häussinger D, Haas HL. Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: role of transporters. <i>J Physiol.</i> 2003;3:911-9.
Sergeeva OA, Haas HL. Expression and function of glycine receptors in striatal cholinergic interneurons from rat and mouse. <i>Neuroscience.</i> 2001;4:1043-55.
Shen W, Slaughter MM. Metabotropic GABA receptors facilitate L-type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons. <i>J Physiol.</i> 1999; 3:711-8.
Simons SB, Caruana DA, Zhao M, Dudek SM. Caffeine-induced synaptic potentiation in hippocampal CA2 neurons. <i>Nat Neurosci.</i> 2011;1:23-5.
Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. <i>Mol Pharmacol.</i> 1992;4:563-9.

BIBLIOGRAFÍA

Smith SS, Li J. GABAB receptor stimulation by baclofen and taurine enhances excitatory amino acid induced phosphatidylinositol turnover in neonatal rat cerebellum. <i>Neurosci Lett.</i> 1991;1:59-64.
Solá S, Castro RE, Laires PA, Steer CJ, Rodrigues CM. Tauroursodeoxycholic acid prevents amyloid-beta peptide-induced neuronal death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathway. <i>Mol Med.</i> 2003;9-12:226-34.
Solinas M, Ferré S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. <i>J Neurosci.</i> 2002;15:6321-4.
Solis JM, Herranz AS, Herreras O, Lerma J, Martín del Río R. Low chloride-dependent release of taurine by a furosemide-sensitive process in the in vivo rat hippocampus. <i>Neuroscience.</i> 1988;3:885-91.
Solís JM, Herranz AS, Herreras O, Lerma J, Martín del Río R. Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain? <i>Neurosci Lett.</i> 1988;91:53-8.
Solís JM, Herranz AS, Herreras O, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J. Variation of potassium ion concentrations in the rat hippocampus specifically affects extracellular taurine levels. <i>Neurosci Lett.</i> 1986;3:263-8.
Stipanuk MH, Ueki I, Dominy JE Jr, Simmons CR, Hirschberger LL. Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. <i>Amino Acids.</i> 2009; 1:55-63.
Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. <i>Annu Rev Nutr.</i> 2004; 24:539-77.
Stridh MH, Tranberg M, Weber SG, Blomstrand F, Sandberg M. Stimulated efflux of amino acids and glutathione from cultured hippocampal slices by omission of extracellular calcium: likely involvement of connexin hemichannels. <i>J Biol Chem.</i> 2008;16:10347-56.
Sturman JA, Chesney RW. Taurine in pediatric nutrition. <i>Pediatr Clin North Am.</i> 1995; 4:879-97.
Sturman JA. Taurine in development. <i>Physiol Rev.</i> 1993; 1:119-47.
Suadcani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca ²⁺ signaling. <i>J Neurosci.</i> 2006;5:1378-85.
Suárez LM, Bustamante J, Orensanz LM, Martín del Río R, Solís JM. Cooperation of taurine uptake and dopamine D1 receptor activation facilitates the induction of protein synthesis-dependent late LTP. <i>Neuropharmacology.</i> 2014; 79:101-11.
Suárez LM, Solís JM. Taurine potentiates presynaptic NMDA receptors in hippocampal Schaffer collateral axons. <i>Eur J Neurosci.</i> 2006;2:405-18.
Sulaiman SA, Suliman FE, Barghouthi S. Kinetic studies on the inhibition of GABA-T by gamma-vinyl GABA and taurine. <i>J Enzyme Inhib Med Chem.</i> 2003;4:297-301.
Sved DW, Godsey JL, Ledyard SL, Mahoney AP, Stetson PL, Ho S, Myers NR, Resnis P, Renwick AG. Absorption, tissue distribution, metabolism and elimination of taurine given orally to rats. <i>Amino Acids.</i> 2007;32:459-66
Svenningsson P, Le Moine C, Aubert I, Burbaud P, Fredholm BB, Bloch B. Cellular distribution of adenosine A2A receptor mRNA in the primate striatum. <i>J Comp Neurol.</i> 1998;2:229-40.
Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. <i>Prog Neurobiol.</i> 1999;4:355-96.
Svensson E, Proekt A, Jing J, Weiss KR. PKC-mediated GABAergic enhancement of dopaminergic responses: implication for short-term potentiation at a dual-transmitter synapse. <i>J Neurophysiol.</i> 2014; 1:22-9.
Tabassum H, Rehman H, Banerjee BD, Raisuddin S, Parvez S. Attenuation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by taurine in mice. <i>Clin Chim Acta.</i> 2006;1-2:129-36.

BIBLIOGRAFÍA

Tan EK, Tan C, Fook-Chong SM, Lum SY, Chai A, Chung H, Shen H, Zhao Y, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Chandran VR, Wong MC. Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese. <i>J Neurol Sci.</i> 2003 ;1:163-7.
Tappaz M, Almarghini K, Legay F, Remy A. Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) from brain: the long and tricky trail to identification. <i>Neurochem Res.</i> 1992;9:849-59.
Terauchi A, Nakazaw A, Johkura K, Yan L, Usuda N. Immunohistochemical localization of taurine in various tissues of the mouse. <i>Amino Acids.</i> 1998;1-2:151-60.
Thompson SM, Gähwiler BH. Effects of the GABA uptake inhibitor tiagabine on inhibitory synaptic potentials in rat hippocampal slice cultures. <i>J Neurophysiol.</i> 1992 ;6:1698-701.
Tonazzini I, Trincavelli ML, Montali M, Martini C. Regulation of A1 adenosine receptor functioning induced by P2Y1 purinergic receptor activation in human astroglial cells. <i>J Neurosci Res.</i> 2008;13:2857-66.
Tovar KR, Westbrook GL. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. <i>J Neurosci.</i> 1999;10:4180-8.
Tranberg M, Stridh MH, Guy Y, Jilderos B, Wigström H, Weber SG, Sandberg M. NMDA-receptor mediated efflux of N-acetylaspartate: physiological and/or pathological importance? <i>Neurochem Int.</i> 2004;8:1195-204.
Tremblay E, Ben-Ari Y, Roisin MP. Different GABAB-mediated effects on protein kinase C activity and immunoreactivity in neonatal and adult rat hippocampal slices. <i>J Neurochem.</i> 1995; 2:863-70.
Tuz K, Peña-Segura C, Franco R, Pasantes-Morales H. Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes. <i>Eur J Neurosci.</i> 2004;4:916-24.
Ulrich D, Bettler B. GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. <i>Curr Opin Neurobiol.</i> 2007;3:298-303.
Van Gelder NM, Courtois A. Close correlation between changing content of specific amino acids in epileptogenic cortex of cats, and severity of epilepsy. <i>Brain Res.</i> 1972;2:477-84.
Vitvitsky V, Garg SK, Banerjee R. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. <i>J Biol Chem.</i> 2011;37:32002-10.
Wade JV, Samson FE, Nelson SR, Pazdernik TL. Changes in extracellular amino acids during soman- and kainic acid-induced seizures. <i>J Neurochem.</i> 1987;2:645-50.
Wall MJ, Dale N. Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. <i>J Physiol.</i> 2013; 591:3853-71
Wang DS, Xu TL, Pang ZP, Li JS, Akaike N. Taurine-activated chloride currents in the rat sacral dorsal commissural neurons. <i>Brain Res.</i> 1998; 1:41-7.
Wang SJ. Caffeine facilitation of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) through activation protein kinase C pathway: an interaction with presynaptic adenosine A1 receptors. <i>Synapse.</i> 2007; 6:401-11.
Warburton DM, Bersellini E, Sweeney E. An evaluation of a caffeinated taurine drink on mood, memory and information processing in healthy volunteers without caffeine abstinence. <i>Psychopharmacology.</i> 2001;3:322-8.
Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, Heller-Stilb B, Mönnighoff I, Buchczyk D, Donner M, Flögel U, Kappert G, Soboll S, Beer S, Pfeffer K, Marschall HU, Gabrielsen M, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Dienes HP, Häussinger D. Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. <i>FASEB J.</i> 2006;3:574-6.
Wesnes KA, Barrett ML, Udani JK. An evaluation of the cognitive and mood effects of an energy shot over a 6h period in volunteers: a randomized, double-blind, placebo controlled, cross-over study. <i>Appetite.</i> 2013;67:105-13.

BIBLIOGRAFÍA

Wigström H, Gustafsson B. Heterosynaptic modulation of homosynaptic long-lasting potentiation in the hippocampal slice. <i>Acta Physiol Scand</i> . 1983;4:455-8.
Wojtecka-Lukasik E, Grzybowska-Kowalczyk A, Maslinska D, Szukiewicz D, Schunack W, Maslinski S. Effect of histamine chloramine on luminol-dependent chemiluminescence of granulocytes. <i>Inflamm Res</i> . 2008;1:19-20.
Wojtecka-Lukasik E, Gujski M, Roguska K, Maslinska D, Maslinski S. Taurine chloramine modifies adjuvant arthritis in rats. <i>Inflamm Res</i> . 2005; 1:21-2.
Wolf OT, Dyakin V, Vadasz C, de Leon MJ, McEwen BS, Bulloch K. Volumetric measurement of the hippocampus, the anterior cingulate cortex, and the retrosplenial granular cortex of the rat using structural MRI. <i>Brain Res Brain Res Protoc</i> . 2002;10:41-6
Wolk BJ, Ganetsky M, Babu KM. Toxicity of energy drinks. <i>Curr Opin Pediatr</i> . 2012;2:243-51.
Worrall BB, Phillips CD, Henderson KK. Herbal energy drinks, phenylpropanoid compounds, and cerebral vasculopathy. <i>Neurology</i> . 2005;7:1137-8.
Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE. Taurine: biological update. <i>Annu Rev Biochem</i> . 1986;55:427-53.
Wu JY, Johansen FF, Lin CT, Liu JW. Taurine system in the normal and ischemic rat hippocampus. <i>Adv Exp Med Biol</i> . 1987;217:265-74.
Wu JY, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system. <i>J Biomed Sci</i> . 2010;1:1.
Wu LG, Saggau P. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. <i>Neuron</i> . 1994; 5:1139-48.
Wu N, Lu Y, He B, Zhang Y, Lin J, Zhao S, Zhang W, Li Y, Han P. Taurine prevents free fatty acid-induced hepatic insulin resistance in association with inhibiting JNK1 activation and improving insulin signaling in vivo. <i>Diabetes Res Clin Pract</i> . 2010; 90:288-96
Xu H, Zhou KQ, Huang YN, Chen L, Xu TL. Taurine activates strychnine-sensitive glycine receptors in neurons of the rat inferior colliculus. <i>Brain Res</i> . 2004;2:232-40.
Xu J, Wojcik WJ. Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. <i>J Pharmacol Exp Ther</i> . 1986;2:568-73.
Yang Z, Taran E, Webb TI, Lynch JW. Stoichiometry and subunit arrangement of $\alpha 1\beta$ glycine receptors as determined by atomic force microscopy. <i>Biochemistry</i> . 2012;26:5229-31.
Yu SS, Wang M, Li XM, Chen WH, Chen JT, Wang HL, Ruan DY. Influences of different developmental periods of taurine supplements on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of rats following prenatal and perinatal lead exposure. <i>BMC Dev Biol</i> . 2007;7:51.
Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. <i>Neuron</i> . 2003; 5:971-82.
Zhang L, Yuan Y, Tong Q, Jiang S, Xu Q, Ding J, Zhang L, Zhang R, Zhang K. Reduced plasma taurine level in Parkinson's disease: association with motor severity and levodopa treatment. <i>Int J Neurosci</i> . 2015; 23:1-24
Zhang M, Bi LF, Fang JH, Su XL, Da GL, Kuwamori T, Kagamimori S. Beneficial effects of taurine on serum lipids in overweight or obese non-diabetic subjects. <i>Amino Acids</i> . 2004;3:267-71.