

1984-B

081199329

Universidad de Guadalajara

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



CUCRA



BIBLIOTECA CENTRAL

ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL DESARROLLO POSNATAL
DE LA CORTEZA CEREBELOS A EN RATAS
CON DEFICIENCIA EN TAURINA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

YOLANDA SILVA LEPE

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO 1993.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....

Número

Sección

C. YOLANDA SILVA LEPE

P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis ESTUDIO HISTOLOGICO DEL DESARROLLO POSNATAL DE LA CORTEZA CEREBELOSA EN RATAS CON DEFICIENCIA EN TAURINA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis la M. en C. Guadalupe Tapia Arizmendi.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 22 de Abril de 1994

EL DIRECTOR



Fernando Alfaro Bustamante
 DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

G. Barba Calvillo
 BIOL. GUILLELMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- La M. en C. Guadalupe Tapia Arizmendi, Director de Tesis.-pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GBC/cgI.r.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Centro Universitario de Ciencias
Biológicas y Agropecuarias.

Guadalajara, Jalisco
22 de Abril de 1996.

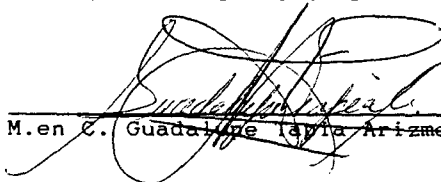
C. Alfonso E. Islas Rodríguez
Director de la División de Ciencias
Biológicas y Ambientales.

PRESENTE.


Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante YOLANDA SILVA LEPE con el título: "ESTUDIO HISTOLOGICO DEL DESARROLLO POSTNATAL DE LA CORTEZA CEREBELAR EN RATAS CON DEFICIENCIA EN TAURINA" consideramos que reúne los meritos del exámen correspondiente.

Comunicamos lo anterior para fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E.
El director de tesis


M.en C. Guadalupe Tapia Arizmendi

SINODALES:


Dra. Galina Zeitzeva.


M.en C. Ma. del Rfugio Mora Navarro


M.en C. Carlos Beaz Zárate

**" ESTUDIO HISTOLOGICO DEL
DESARROLLO POSTNATAL DE LA
CORTEZA CEREBELAR EN RATAS CON
DEFICIENCIA EN TAURINA "**

Autor:

Yolanda Silva Lepe.

Director:

M. en C. Guadalupe Tapia Arizmendi

Asesor:

M. en C. Genaro Gabriel Ortiz.

El siguiente trabajo fué realizado en el laboratorio de Neuropatología experimental de la División de Patología en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano de el Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México.

MUCHAS GRACIAS A ...

M.en C. Genaro Gabriel Ortiz,

M.en C. Alicia Navarro Ruiz,

Ing. Rogelio Troyo Sanromán y

Ing. Armando Oscar Carranco López,

quienes siempre han estado en la mejor disposición de ayudarme y con quienes ha sido toda una experiencia trabajar, convivir y aprender en el fascinante mundo de la investigación.

y a...

M.en C. Merisa Fafoutis Morris,

M.en C. Piedad Gómez Contreras,

Dr. Fernando Alfaro Bustamante y

Dr. Alejandro Bravo Cuellar,

quienes siempre me han echado todas las porras y nunca dudaron en darme su apoyo y estar ahí aún durante las peores tempestades.

UN CAMINO HACIA SI MISMO.

" No soy un hombre que sabe,
He sido un hombre que busca y lo soy aún,
pero no busco ya en las estrellas ni en los libros:
comienzo a buscar las enseñanzas que mi sangre murmura en mí.

Mi historia no es agradable,
no es suave y armoniosa como las historias inventadas;
sabe a insensatez y a confusión, a locura y a ensueño,
como la vida de todos los hombres
que no quieren mentirse más a sí mismos.

La vida de todo hombre es un camino a sí mismo,
la tentativa de un camino, la huella de un sendero.
Ningún hombre ha sido nunca por completo él mismo;
pero todos aspiran a llegar a serlo,
oscuramente unos, claramente otros, cada uno como puede.
Cada uno es el impulso de la naturaleza hacia el hombre.

Podemos comprendernos unos a otros,
pero sólo a sí mismo puede interpretarse cada uno".

HERMANN HESSE.

A mi padre con amor,
gracias por enseñarme
"El Camino".

† In Memoriam.

INDICE.

I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	3
1.Cerebelo	4
2.Corteza Cerebelar	4
A.Citoarquitectura	5
B.Comunicación interneuronal	6
3.Desarrollo	9
A.Desarrollo embriológico del cerebelo	9
B.Desarrollo postnatal de la corteza cerebelar	10
4.Taurina	14
A.Bioquímica y biosíntesis	15
B.Análogos estructurales	17
C.Acciones metabólicas	18
D.Taurina en desarrollo	20
III. ANTECEDENTES	21
1.Taurina en el desarrollo del cerebelo	22
A.Estudios histológicos	23
B.Estudios bioquímicos	23
C.Estudios inmuno-histológicos	26
D.Estudios en cultivo celular.	27

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
V. HIPOTESIS	31
VI. OBJETIVOS	33
VII. MATERIAL Y METODOS	35
1.Material Biológico	36
2.Material Químico.	36
3.Equipo	37
4.Metodología	37
VIII. RESULTADOS	40
1.Pesos corporal, encefálico y cerebelar	42
2.Fotomicrografías de la corteza cerebelar	44
3.Espesor de los estratos corticales cerebelares	52
4.Celularidad en los estratos corticales cerebelares	54
5.Relación entre los espesores de los estratos corticales y celularidad en los mismos	55
IX. DISCUSION	57
X. CONCLUSIONES	60
XI. APENDICES	62
A.Preparación del GES a partir de Taurina	63
B.Técnica de Perfusión intracardiaca	64
C.Técnica de deshidratación, infiltración e inclusión en resinas según la técnica de Monic	65
D.Preparación de Azul de Toluidina	66
E.Cálculo del factor de ampliación en las fotografías	67
F.Tablas de datos de los resultados	68
XI. BIBLIOGRAFIA.	72

I. RESUMEN.

La Taurina, ácido 2-aminoetansulfónico es un aminoácido importante involucrado en varios procesos metabólicos. Algunos estudios bioquímicos han demostrado que es importante en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar de ratas. El objetivo de este trabajo es determinar los eventos tisulares que ocurren durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar cuando la taurina es eliminada por uno de sus análogos estructurales, el Guanidinoetilsulfonato (GES). Se administró GES 1% en el agua de consumo de ratas hembras preñadas desde la fecundación, durante el embarazo y después del parto; sus crías fueron sacrificadas recién nacidas (RN) y a los 7, 14, 21 y 28 días (d) de edad, a las cuales se les extrajo el encéfalo. El sexto lóbulo del vermis del cerebelo fue postfijado e incluido en resinas Poly/bed para ser observado y fotografiado. Se registraron los pesos: corporal, de encéfalo y cerebelo, al igual que el espesor de la capa granular externa (CGE), capa molecular (CM), capa de células de Purkinje (CCP) además del número de células en CGE y CM para ser comparados con ratas testigo. En las ratas tratadas con GES 1%, los pesos: corporal, encefálico y del cerebelo fueron significativamente inferiores en todas las edades en comparación a sus testigos. El espesor de la CGE fue significativamente mayor en 14, 21 y 28d; el de la CM fue significativamente menor en el día 7 y el de la CCP fue menor en todas las edades sin que hubiera una significancia estadística. El número de células en CGE y CM también fue significativamente superior en los días 14, 21 y 28 en el grupo experimental. Estos resultados sugieren que la Taurina tiene un importante papel en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar de ratas.

II. INTRODUCCION.

1. CEREBELO.

El cerebelo, junto con otras estructuras del sistema nervioso central, participa en la ejecución de una amplia variedad de movimientos. Tiene un papel esencial en la coordinación de la actividad de grupos musculares. No es iniciador del movimiento pero registra el desarrollo dinámico de la extensión y la tensión dentro del sistema muscular y actúa como eficaz modulador y como mecanismo de gobierno de las actividades motoras. No toma parte en la apreciación de sensaciones ni en las funciones intelectuales (33,91,95,130,131).

El cerebelo es un órgano lobulado cuya superficie presenta gran cantidad de cisuras. Su superficie está recorrida por numerosos surcos finos que delimitan pliegues largos llamados folia (singular, folium). La porción central mediana del cerebelo parecida a un gusano, el vermis, está lateralmente limitada por dos grandes hemisferios. El cerebelo consta de tres lóbulos: anterior, medio (a veces llamado posterior) y floculonodular. Cada uno de ellos incluye porciones del vermis y de los hemisferios (31,91,95).

La superficie del cerebelo está cubierta por la corteza cerebelar. En la parte profunda se encuentra una masa de fibras nerviosas que forman la sustancia blanca. Además, se encuentran cuatro núcleos profundos que de la porción medial a la lateral son: fastigial, globoso, emboliforme y dentado. El cerebelo está conectado con el tronco cerebral mediante tres pedúnculos llamados también brazos o pilares; el pedúnculo cerebelar inferior medio y superior (91,95).

2. CORTEZA CEREBELAR.

La superficie cerebelar está formada por numerosos surcos paralelos, grandes láminas semejantes a giros llamadas folia. Las folia están separadas entre sí por delgadas fisuras corticales equivalentes a los surcos de la corteza cerebral. Aunque el cerebelo es mucho menor que el cerebro, su área cortical total representa cerca de las tres cuartas partes de la corteza cerebral en el hombre (83,91,95).

A. Citoarquitectura.

El cerebelo está constituido de:

- a) Dos tipos de axones eferentes: fibras trepadoras y musgosas,
- b) Cinco tipos de neuronas intrínsecas: granulares, estrelladas, en cesta, de Golgi tipo II y de Purkinje y
- c) Un tipo de neuronas eferentes que son las células de los núcleos profundos.

La corteza cerebelar madura está formada por tres estratos, como se ilustra en la figura 2 (31,83,91,95):

1. Capa Molecular (CM). Ésta es la más superficial de las tres la cual contiene dos tipos de neuronas que son las células estrelladas y en cesta además de las dendritas de las células de Purkinje y de Golgi tipo II, axones de células granulares conocidas como fibras paralelas y proyecciones de la glía de Bergmann.

2. Capa de células de Purkinje (CCP). Es la capa intermedia que contiene los somas de las células de Purkinje, las cuales son neuronas muy grandes y de forma de pera con arborizaciones dendríticas las que se extienden a la capa molecular y de largos axones. A su vez, en este estrato se localizan los somas de las células de la glía de Bergmann.

3. Capa Granular (CG). La capa más interna de todas, la cual contiene numerosas células granulares, células de Golgi II y glomérulos, los que son complejos nódulos sinápticos con axones de fibras musgosas, axones de dendritas y de células de Golgi y dendritas de células granulares.

B. Comunicación interneuronal (83.91).

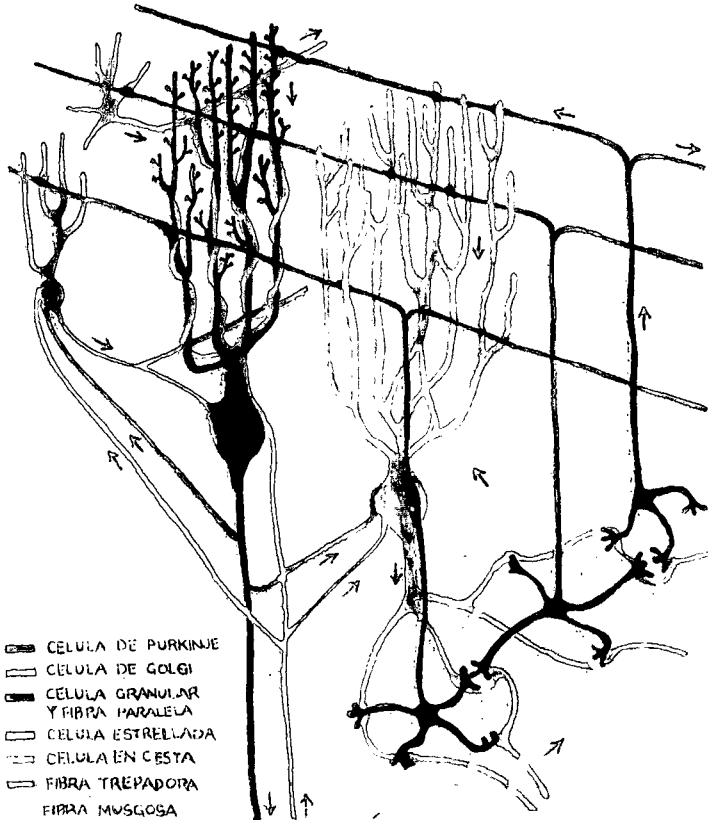


Fig 1. INTERCOMUNICACION NEURONAL. En la corteza cerebelar fluye en un patrón elaborado pero estereotipado. Cada célula de Purkinje está asociada con una sola fibra trepadora y forma muchas uniones sinápticas con ésta. La fibra trepadora a su vez hace conexión con las células en cesta y de Golgi. Las fibras musgosas se ponen en contacto con las dendritas de las células granulares. Los axones de las células granulares ascienden a la capa molecular donde bifurcan para formar las fibras paralelas. Cada fibra paralela se pone en contacto con muchas células de Purkinje, pero por lo general solo forma una sinapsis con cada célula. Las células estrelladas se conectan con las fibras paralelas, con las dendritas de la célula de Purkinje, con las células en cesta pero principalmente con el soma de la célula de Purkinje. La mayoría de las dendritas de las células de Golgi se unen con las fibras paralelas pero otras se unen a fibras musgosas; los axones de las células de Golgi terminan en los glomérulos del cerebelo. Las flechas indican la dirección de la conducción nerviosa.

Las células de Purkinje son las células distintivas de la corteza cerebelar; estas son las únicas neuronas eferentes de la corteza cerebelar; sus árboles dendríticos se distribuyen dentro de la capa molecular. Cada célula de Purkinje recibe impulsos de alrededor de 80,000 células granulares, estrelladas, en cesta y de otras células de su clase. El axón principal de cada célula hace sinápsis con las células de los núcleos profundos del cerebelo o de los núcleos vestibulares laterales. Cada célula tiene también una rama colateral recurrente es que parte de su axon y se ramifica para hacer sinápsis con células estrelladas, en cesta, de Golgi y otras células de Purkinje.

Cada célula de Golgi tiene sus somas en la capa molecular inmediatamente por debajo del soma de la célula de Purkinje y su árbol dendrítico se ramifica en todos los planos a través de la capa molecular; éstas células reciben impulsos de fibras paralelas y trepadoras y de células de Purkinje, que proyectan hacia miles de glomérulos.

El axón de cada célula granular se extiende desde el soma, colocado en la capa granular interna, hasta la capa molecular en donde se bifurca en forma de "T". Estas fibras, llamadas paralelas, tienen conexiones sinápticas con las espinas dendríticas de las células de Purkinje y con las de las células estrelladas, en cesta y de Golgi.

Las células estrelladas y en cesta son interneuronas colocadas dentro de la capa molecular, reciben impulsos de fibras trepadoras, paralelas y colaterales de las células de Purkinje que proyectan hasta estas mismas células. Los axones de las células estrelladas terminan sobre las dendritas de cierto número de células de Purkinje. Los axones de las células en cesta hacen sinápsis en arborizaciones que envuelven los cuerpos celulares de alrededor de 10 células de Purkinje y por medio de colaterales sobre las dendritas de estas mismas células. Una célula de Purkinje recibe así impulsos de muchas células estrelladas y de células en cesta (83,91,95).

Aunque las fibras aferentes conducen impulsos excitatorios hacia el cerebelo, todos los impulsos dentro de la corteza cerebelar son inhibitorios. Las neuronas inhibitorias incluyen las células estrelladas, en cesta, de Golgi y de Purkinje. La neurona excitatoria cortical es la célula granular. El papel de las células de Golgi, estrelladas y en cesta consiste en regular y orientar las influencias excitatorias conducidas por las fibras aferentes sobre las células de Purkinje (83,91,95).

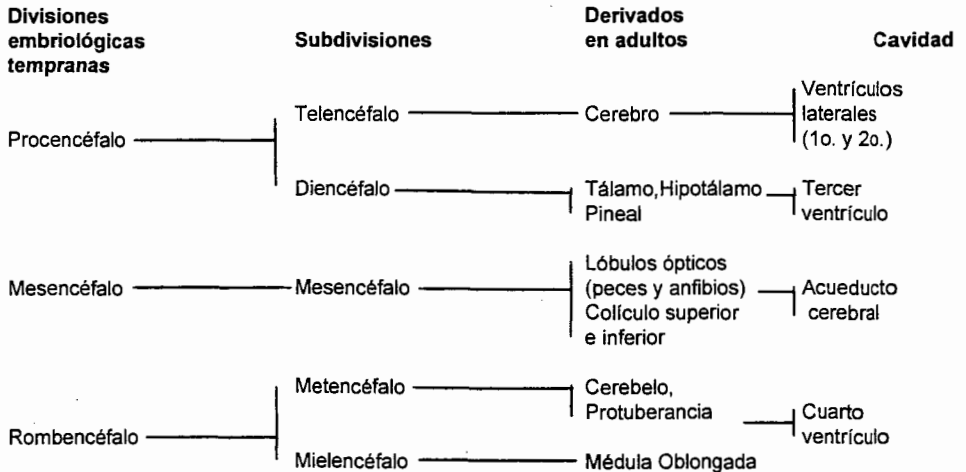
Las fibras trepadoras (excitatorias) estimulan a las células estrelladas (inhibitorias) y las células en cesta para que ejerzan influencia inhibitoria sobre las células de Purkinje. Esta inhibición suprime parcialmente la actividad excitatoria

resultante de las influencias facilitadoras ejercidas por la fibras sobre las células de Purkinje. Las fibras musgosas excitan a las células granulares a ejercer su influencia sobre las células estrelladas, en cesta, de Purkinje y de Golgi. Las células granulares conducen influencias excitatorias directamente hacia las células de Purkinje al través de la facilitación de las células estrelladas y en cesta (83,91,95).

3. DESARROLLO.

A. Desarrollo embriológico del cerebelo.

En el embrión, el encéfalo y la médula espinal se diferencian a partir del tubo neural. En la parte anterior, el tubo se expande y diferencia en las estructuras encefálicas y en la parte posterior desarrolla la médula espinal. Posteriormente se desarrollan tres prominencias principales en la parte anterior del tubo, éstas originan al procencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, o vesículas primarias, los que a su vez originan las estructuras representadas a continuación (22,32,33,94).



Las paredes del metencéfalo forman el puente y el cerebelo y su cavidad forma parte superior del engrosamiento de las partes dorsales de las placas alares. Inicialmente, las prominencias cerebelares se proyectan al interior del cuarto ventrículo. Mientras que las prominencias cerebelares crecen y se fusionan en el medio, cubren la mitad rostral del cuarto ventrículo y cubren la prominencia y la médula. Algunos neuroblastos en la zona intermedia de las placas alares migran a la zona marginal y se diferencian. Estas placas dan origen a los núcleos profundos.

B. Desarrollo postnatal de la corteza cerebelar (10,11,12,116, 117).

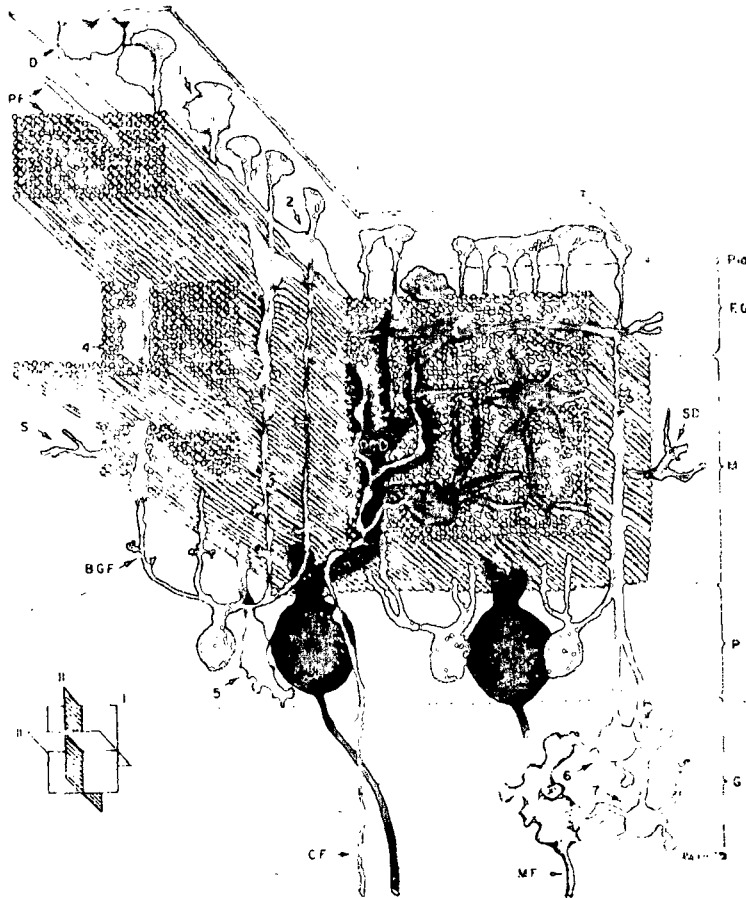


Fig. 2. Reconstrucción "tetra-dimensional" (espacio y tiempo) de la corteza cerebelar en desarrollo en el mono *rhesus*. La figura geométrica en la esquina inferior izquierda indica la orientación de los planos: I, sagital; II longitudinal al folium; III paralelo a la superficie pial. Abreviaciones: BGF, fibra de la glía de Bergmann; CF, fibra trepadora; D, célula granular externa en división; EG, capa granular externa; GEC, célula epitelial de Golgi (glía de Bergmann); G, capa granular; M, capa molecular; MF, fibra musgosa; P, capa de células de Purkinje; PC, célula de Purkinje; PCD, dendrita de la célula de Purkinje; PF, fibra paralela; S₁₋₄, células estrelladas; ST, dendrita de la célula estrellada. Una descripción de las transformaciones en el espacio y en el tiempo de las células granulares postmitóticas (designada con los números 1-7) y células estrelladas (S).

En los mamíferos neonatos, la corteza cerebelar se compone de tres estratos celulares. Las Capa Granular Externa (CGE), Capa Molecular (CM) y la Capa de Células de Purkinje (CCP) (22,94).

Durante el desarrollo postnatal, las células que conforman la CGE migran a través de la CM y la CCP para posteriormente conformar la Capa Granular Interna (CGI). Este proceso está bien establecida a partir de observaciones de preparaciones de cerebelo en el microscópio óptico (12,116,117).

La migración de las células granulares postmitóticas representa un evento mayor en la corteza cerebelar en desarrollo. Las células postmitóticas de la porción más profunda de la CGE se vuelven bipolares en el plano longitudinal a la folia. Posteriormente, desarrolla un proceso descendente orientado verticalmente para asumir una forma de "T". Mientras que el proceso vertical se elonga, el núcleo y el citoplasma que lo rodea se mueve dentro de él para darle al soma una forma bipolar orientado perpendicularmente a la superficie pial. Finalmente, el soma alcanza la CGI y desarrolla una forma redonda característica de la célula granular adulta (12,116,117).

Las ramificaciones primarias, secundarias y terciarias de las células de Purkinje se desarrollan gradualmente de manera ordenada y las fibras de Bergmann (prolongaciones ascendentes de las células de la glía de Bergmann) aumentan su número (12,20,40,116,117). Es apreciable que mientras que las dendritas de las células de Purkinje se detienen entre la capa granular externa y la capa molecular, las fibras de Bergmann ascienden a través de la capa granular externa y terminan en la superficie pial en expansiones cónicas. Células inmaduras estrelladas y en cesta se encuentran presentes en la capa molecular durante el curso de este periodo, las que aumentan en número y desarrollan progresivamente procesos más complicados y establecen contactos con las dendritas de células de Purkinje y fibras paralelas (11,20,40,116).

Mientras que las células granulares postmitóticas se mueven a la zona profunda de la capa granular externa, desarrollan procesos horizontales paralelos al curso de las fibras paralelas ya existentes que son paralelas a los axones largos de el folium. Una expansión vertical es desarrollada desde la parte inferior de el soma y apunta hacia adentro de la capa de células de Purkinje. Esta se asocia a una fibra de Bergmann la cual es una prolongación de la célula de la Glía de Bergmann, cuyos somas se localizan en la CCP. El núcleo migra en este proceso por medio de movimientos amiboideos de modo que la célula asume la forma de "T" característica.

Mientras que el soma de la célula granular se acerca a la capa de células de Purkinje, por lo general pierde su forma bipolar y orientación vertical estricta y pasa oblicuamente a los somas de las células epiteliales de Golgi. En los mismos niveles, las fibras de Bergmann pierden su orientación de 90° a las fibras paralelas y caen oblicuamente. Los somas de las células granulares migratorias se vuelven más cortos y en forma semilunar mientras que pasan entre los somas de las células epiteliales de Golgi y células de Purkinje. Las células granulares se mantienen separadas de las células de Purkinje por medio de recubrimientos de astrocitos que envuelven los somas de las células de Purkinje.

Cuando la célula granular finalmente llega a la capa granular interna, tiende a conservar una estrecha relación con la célula epitelial de Golgi y su núcleo adquiere una forma redonda y con un delgado citoplasma en que la mayor parte de los microtúbulos han desaparecido (10,12,43,46,116).

El crecimiento de las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje, el desarrollo de las fibras de la glía de Bergmann, la formación y crecimiento de las neuronas estrelladas y en cesta contribuyen al incremento en el espesor de la CM. Sin embargo, la mayor contribución para el engrosamiento de este estrato es la adición de las nuevas fibras paralelas. Ya que las fibras, una vez formadas, son relativamente constantes en diámetro, el incremento de el espesor de la capa molecular se debe principalmente a un incremento en su número (10,11,12,116,117).

Altman (10,11,12) ha descrito con precisión los tiempos en los cuales todos estos eventos se llevan al cabo en la rata lo que se pueden resumir en el siguiente orden:

Recién nacido. A esta edad, la corteza cerebelar está formada por una gruesa CGE seguida de unas delgadas e indefinidas CM y CCP.

Día 7. Comienza a haber un gran número de mitosis en la CGE que provoca el engrosamiento de la misma. A su vez, las células granulares comienzan a migrar con una consecuente formación de fibras paralelas a la vez que las células de Purkinje prolongan sus arborizaciones dendríticas lo que provoca el engrosamiento de la CM.

Día 14. A esta edad es donde se observa la mayor migración celular de la CGE a la CGI. Así, hay un aumento considerable en el espesor de la CM de forma contraria a lo que sucede con la CGE debido a los fenómenos celulares descritos en el día 7.

Día 21. La CGE desaparece como tal aunque aún se pueden observar algunas células granulares aisladas a punto de migrar. También se observan algunas células migratorias en la CM. El proceso de maduración está a punto de concluir.

Día 28. La corteza cerebelar ha terminado de desarrollarse, ya no hay células granulares externas; tanto la CM como la CCP y la CGI alcanzan su mayor espesor.

4. TAURINA.

La Taurina es un compuesto filogenéticamente antiguo con una distribución distintiva en la biosfera. En muchos animales, incluso en los mamíferos, es uno de los constituyentes de bajo peso molecular más abundantes. Fué llamada así porque fué aislada por primera vez a partir de los jugos biliares de el toro (*Bos taurus*)(61,133).

La Taurina es un aminoácido que difiere de otros por ser un ácido amínico sulfónico y no carbónico y en ser β en lugar de ser α .

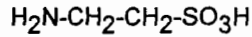
En los mamíferos encontramos la mayor concentración de Taurina en el corazón o en el cerebro, pero el grueso de la Taurina está en la musculatura (59). En la rata, la concentración de Taurina es alta en la corteza cerebral y cerebelar además del bulbo olfatorio (169).

Las mayores concentraciones de Taurina se representan en el cerebro en desarrollo, momento en que la concentración de otros aminoácidos libres tiende a ser baja (37). A lo largo del desarrollo, las concentraciones de Taurina bajan, con niveles en el adulto aproximados a la tercera parte que en los neonatos. Este patrón ha sido observado en humanos (28,49,81,141), monos (141), ratones (77,158), conejos (26) y ratas (34,61,64,134,137).

Quizá la observación más impresionante con respecto a la distribución de taurina es su alta concentración en células que carecen de pared celular y su casi completa ausencia en células con pared celular. En los mamíferos, la taurina tiene una concentración particularmente alta en tejidos excitables, especialmente en estructuras secretorias.

Se ha demostrado que este aminoácido sulfónico es un nutriente esencial para los gatos y probablemente también para los primates (118) principalmente durante el desarrollo.

A. Bioquímica y Biosíntesis.



Acido 2-aminoetansulfónico.

La taurina es un β -aminoácido, lo que indica que el grupo amino reside en el segundo carbono o carbono β y tiene un grupo ácido sulfónico en lugar de un grupo ácido carboxílico (29), aunque se comporta como un electrolito anfotero como los otros α -aminoácidos; sin embargo, presenta otras diferencias con estos aminoácidos debido a la presencia del grupo sulfonato (65). El grupo amino de la taurina puede reaccionar con ácidos carboxílicos por medio de enlaces amino, el que es la base de la conjugación de los ácidos biliares, para dar origen a las sales biliares (65,134). La taurina también puede formar enlaces peptídicos para formar algunos di y tripéptidos de bajo peso molecular sintetizados en tejidos paratiroideos y cerebelares tales como α -L-glutamil-taurina. Sin embargo, la mayor parte de taurina en el cuerpo se encuentra libre en el citosol de muchos tejidos como el cerebral, miocardio, hepático, renal, muscular y hemático (48).

La taurina es sintetizada a partir de la metionina vía cisteína por una serie de reacciones enzimáticas.

La ruta predominante de síntesis varía entre las especies y depende del tipo de tejidos; sin embargo, la enzima cisteín-sulfonato descarboxilasa es determinante en este proceso en mamíferos (163).

Todas las enzimas requeridas para la conversión de metionina a cisteína y taurina se encuentran presentes en el hígado de la rata adulta y no en el cerebro. Más aún, la presencia de esta enzima en hígado y cerebro fetal de humanos, monos, conejos, ratas, cobayos y gatos es menor que en adultos (163).

Como los mamíferos son capaces de oxidar y no de reducir el azufre, necesitan consumir aminoácidos sulfurados como la metionina y cisteína. Animales como los gatos, humanos y algunos monos son incapaces de sintetizar cantidades significativas de taurina y por ende deben apoyarse en su ingesta en la dieta de este aminoácido (35).

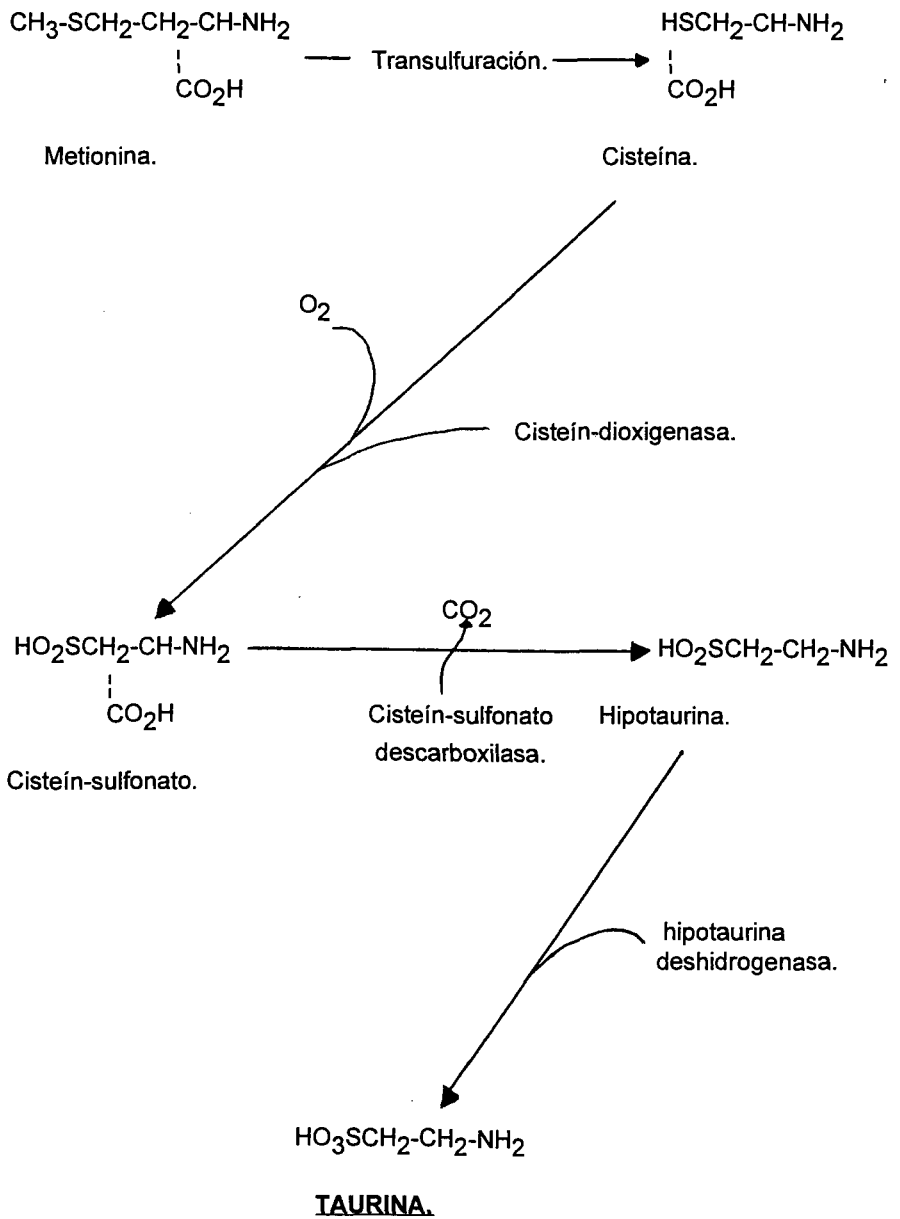
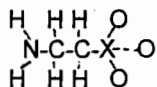
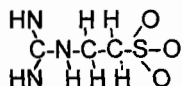


Fig 3. Biosíntesis de la Taurina.

B. Análogos estructurales.



Taurina (X=S)
 β -Alanina (X=C)



Guanidinoetil-sulfonato (GES)

Entre los análogos estructurales de la taurina más importantes encontramos 2; la β -alanina y el Guanidinoetilsulfonato (GES). Ambos inhiben el transporte de taurina al competir con su grupo β aminoácido y producen una disminución en el contenido tisular de taurina en rata (56,63). Ambos análogos han sido utilizados en una serie de estudios con el fin de remover la taurina tisular y de este modo observar los efectos de la ausencia de este aminoácido. Debido a que la β -alanina no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, su eficiencia en la remoción de taurina en encéfalo y específicamente en cerebelo se ve imposibilitada (128).

La administración de GES 1% durante 4 semanas tiene por consecuencia una disminución en el contenido tisular de taurina de 20% en el corazón, 24% en el hígado y de 33% en el cerebelo. A su vez, una exposición prolongada a este agente produce un decremento de taurina en el cerebelo de 11% a los 2 días, 22% a los 4 días, 31% a los 6 días, 30% a los 9 días, 55% a los 20, 30 y 40 días en ratas (62).

C. Acciones Metabólicas.

R.J. Huxtable hace una excelente síntesis de las funciones biológicas de la taurina en una revisión publicada en 1992 (60), de la que nos podemos servir mediante la siguiente tabla.

ACCION.

Sistema cardiovascular.

- Antiarrítmico.
- Inotropía positiva a calcio bajo.
- Inotropía negativa a calcio alto.
- Potenciación de inotropía digital.
- Antagonismo de la paradoja de calcio.
- Hipotensión (acción central y periférica).
- Retardo en el desarrollo de lesión en sobrecarga de calcio.
- Incremento de la resistencia de plaquetas a agregarse.

Cerebro.

- Anticonvulsionante.
- Modulador de la excitabilidad neuronal.
- Mantenimiento de la funcionalidad cerebelar.
- Termoregulación.
- Acciones antiagresivas.
- Regulación central de respuestas cardiorespiratorias.
- Alteración del periodo del sueño.
- Resistencia a anoxia/hipoxia.
- Aprendizaje alterado.
- Motilidad alterada.
- Acciones anti-temblor.
- Supresión de beber.
- Supresión de comer.

Retina.

Mantenimiento de la estructura y función
de fotorreceptores, segmentos externos
y tapetum lúcidum.

Higado.

Síntesis de sales biliares.

Aparato Reproductivo.

Factor de motilidad espermática.

Músculo.

Estabilizador de membrana muscular.

General.

Modulador de la excreción hormonal
y de neurotransmisores.

Osmoregulación.

Estimulación de glicólisis y glicogénesis.

Atenuación de hipercolesterolemia.

Proliferación y viabilidad celular.

Antioxidante.

Regulación de la fosforilación.

Conjugación xenobiótica.

D. Taurina en Desarrollo.

Se ha demostrado que éste ácido aminosulfónico es un nutriente esencial para gatos y probablemente también para primates, especialmente durante el desarrollo (135). Una deficiencia dietética de taurina en gatos da como resultado la disfunción de un número de sistemas (96,113-115,126,127,166), entre los que se incluye al sistema visual, donde se disminuye la agudeza visual, el electroretinograma y las respuestas visuales que se acompañan de degeneración en la retina (107,108,154) y el *tapetum lucidum* (13,18,19,23,24,50-54,68,75,93,125,155,165); durante la embriogénesis ocurren frecuentes reabsorciones espontáneas, abortos y productos muertos y en caso de que los productos sobrevivan, estos presentan malformaciones congénitas (67,103,104,140,144-147). En gatos, en la octava semana de desarrollo postnatal presentan anomalías que incluyen abducción de las extremidades posteriores; las que han reducido su tamaño y tono muscular en comparación con las extremidades anteriores (140,143). Además, las crías son significativamente menores que los de las madres alimentadas con taurina y a su vez, la masa encefálica es también menor (133,140,143). Los pesos cerebrales de productos de madres con dieta deficiente en taurina son significativamente menores que los de madres cuya dieta incluye este aminoácido (133,143), los que no solo son más pequeños sino que también presentan morfología anormal. Los niveles tisulares de este aminoácido en las crías también son grandemente influenciados por las dietas maternas.

El crecimiento de las crías de gatas lactantes deficientes en taurina es inferior que el de gatas suplementadas con taurina. A su vez, se ha observado que este fenómeno es reversible en las crías de estas gatas siempre y cuando ellas reciban una dieta rica en taurina (140,143-146).

III. ANTECEDENTES.

1. TAURINA EN EL DESARROLLO DEL CEREBELO.

Como se ha mencionado anteriormente, hay cambios sustanciales en la concentración de taurina en muchos tejidos durante el desarrollo; pero los mayores cambios ocurren en el cerebro del mamífero. La taurina es en general el aminoácido libre presente en las mayores concentraciones en los cerebros de los mamíferos recién nacidos y disminuyen sus concentraciones conforme se avanza en el desarrollo (1-8,26,34,55,57,72,73,76,78,82,87,90,97-100,106,109,111,121-123,134,137-39,141,148-153,156, 157,163). Aunque los cambios que ocurren en la concentración cerebral de taurina durante el desarrollo son relativamente consistentes, los valores absolutos varían considerablemente de especie a especie por lo que debe aclararse que aunque la concentración de taurina por unidad de peso disminuye postnatalmente, la cantidad total de taurina por cerebro generalmente aumenta (80,137).

Hay pocos datos disponibles sobre la concentración de taurina en el cerebro durante la gestación, pero la que hay indica que las concentraciones de taurina en el cerebro fetal son altas, muy similares a las del cerebro del recién nacido (7,8,15,16,35,36,45,47,58,112,141,153). Sin embargo, no ha habido un patrón consistente de cambio durante la gestación.

El cerebro y la corteza cerebral, seguidos por las regiones subcorticales, tallo cerebral y médula espinal contienen las menores concentraciones de taurina. Si se siguen los razonamientos anteriores, se esperaría que el cerebelo tuviera las mayores concentraciones de taurina durante el desarrollo postnatal para facilitar la neurogénesis de las células granulares, en mucho la estirpe celular más abundante en este órgano, y su migración y diferenciación tienen lugar en el período postnatal inmediato (143,144); esto puede deberse a que como se mencionará en los estudios de cultivo celular, este aminoácido es selectivo a solo dos estirpes celulares, las células granulares y las de Purkinje. Esto contrasta con la corteza cerebral, donde se completa la neurogénesis prenatalmente aunque mucha de la migración y diferenciación sea postnatal.

A. Estudios Histológicos.

Los estudios de este tipo han sido hechos principalmente en gatos (151,152).

Se ha demostrado que una deficiencia de taurina impuesta durante el desarrollo da como resultado una persistencia de células granulares en la capa granular externa del cerebelo de crías de gatos de ocho semanas de edad al igual que la presencia de numerosos cuerpos mitóticos de estas células, lo que indica una continuada división celular (146), cuando la división celular y migración en el cerebelo de estas crías normalmente terminan antes de la tercera semana de desarrollo postnatal (129). Un estudio subsecuente mostró que una suplementación oral de taurina desde el nacimiento de las crías deficientes eliminó estas anomalías en el desarrollo del cerebelo (145). Hasta el momento no ha habido reportes de estudios de este tipo en roedores.

B. Estudios Bioquímicos.

Se han hecho estudios bioquímicos para conocer la función de la taurina durante la gestación de ratas, para lo cual se administró GES 1% en el agua para beber en diferentes estudios perigestacionales y perinatales (21,38,41,79,92). El GES disminuye el contenido tisular de taurina en ratas de diferente manera y estos resultados pueden ser considerados como estudios de deficiencia en taurina (110,128). Otros autores han mencionado que al administrar GES a ratas hembras antes de la fecundación y durante el embarazo se encuentra una sustancial reducción en el contenido tisular tanto en las madres como en las crías a pesar de no haber efectos en el consumo de alimento, en el aumento de peso de las mismas ni en el tamaño de la camada al igual que en el peso de las crías al nacimiento así como tampoco se encontraron cambios en el incremento de peso ni hubo una mortalidad diferente a las crías de ratas testigo (21,39). El riñón juega un papel importante en la regulación total del contenido corporal de taurina ya que la remoción de la misma se dá principalmente por excreción urinaria (29). Los roedores jóvenes no tienen la capacidad de adaptarse a cambios dietéticos y excretan una mayor cantidad de taurina por la orina de lo que lo hacen los adultos, aún

cuando su dieta sea restringida en taurina (30). La concentración de taurina en la leche de las madres tratadas con GES 1% se redujo sustancialmente, a su vez, el contenido de este análogo se incrementó considerablemente, lo que determinó que las crías estuvieran sometidas a un aporte elevado de GES 1% durante el desarrollo postnatal. Esto determina que las crías no solamente reciben poca cantidad de taurina en la leche sino que a su vez lo hacen de un elevado aporte de GES 1% que actúa sobre la taurina producida de manera endógena por las mismas. En otro estudio se trató a ratas preñadas con GES del día 11 al 21 de gestación (41); y nuevamente, no hubo efectos en la madre excepto, por supuesto, en la disminución de la concentración del contenido de taurina en los tejidos y en la leche. Los autores de este estudio observaron una significativa disminución en el peso corporal, del hígado y cerebro de los productos al igual que el de la placenta además una reducción en la concentración de taurina.

En otro estudio mediante el uso de GES en ratas a partir del quinto día antes del parto y hasta el día 17 de lactancia no se encontró un efecto en el peso de las crías en el momento del nacimiento ni en el crecimiento de las mismas (79).

Se ha reportado en ratas a las que se les inyectó taurina radiactiva en el momento del nacimiento, se encuentra mayor radiactividad secretada en la leche de las madres control, que en el de las tratadas con GES 1%; aunque no se determinó si esta radiactividad disminuye posteriormente (142,149). Algunos de los estudios durante el desarrollo de ratas han examinado la morfología de la retina y en general se han encontrado cambios similares a los reportados en gatos.

Se debe enfatizar que la rata tiene una alta concentración de cisteín-sulfonato descarboxilasa y una gran capacidad de biosíntesis de taurina y por ende, a diferencia del gato, no depende de una fuente dietética de taurina (69,70,132,167). La rata lactante no secreta cantidades sustanciales en la leche como la mayoría de las especies, en particular durante los primeros días postnatales (119,120,149). En dos trabajos independientes con el uso de diferentes enfoques experimentales se ha determinado la contribución de taurina que la madre aporta a las crías durante el embarazo, el contenido de taurina en la leche durante la lactancia y la biosíntesis endógena del contenido de taurina en las propias crías (61,64,134). Los resultados fueron notablemente consistentes al demostrar que al nacimiento aproximadamente dos terceras partes de la taurina en las crías derivaba de la madre durante la gestación y una tercera parte había sido sintetizada por las crías. En la tercera semana postnatal (día 21), la cantidad de taurina derivada de la madre durante la gestación, bajó a aproximadamente 5% del total del contenido de taurina de la cría, aproximadamente 10% había derivado de la leche de la madre y el restante había sido sintetizado por las

crías. Una rata adulta que ingiere comida estandar de laboratorio (chow purina), biosintetiza aproximadamente 80% de su contenido total de taurina y obtiene el resto de la dieta. Presumiblemente, el total del contenido corporal de taurina puede ser obtenido al través de la biosíntesis ya que ratas que son alimentadas con dietas libres de taurina por periodos de tiempo prolongados, no muestran ningún descenso en el contenido tisular de la misma (139).

Ratas jóvenes alimentadas con dieta baja en taurina tuvieron un crecimiento reducido y desarrollaron anormalidades en la respuesta en el retinograma. El suplemento de taurina mejoró su crecimiento pero los problemas en la función visual continuaron (17).

C. Estudios Inmuno-histológicos.

En años recientes se ha obtenido información sobre la localización de taurina en células individuales y estructuras por medio de la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales a la taurina conjugados a la albúmina de suero bovino por glutaraldehído (25,89). El cerebelo de rata ha sido estudiado extensivamente mediante este método y se ha demostrado que la taurina está concentrada en células de Purkinje, en sus dendritas y en algunas células granulares (27,66,74,88,101,102,170). Esta técnica ha sido aplicada al estudio del desarrollo del cerebelo de crías de gato deficientes en taurina y sus correspondientes testigo (84-86). En crías recién nacidas, las células de Purkinje no parecen tener taurina. Sin embargo, este aminoácido se encuentra presente en las células granulares y en una banda extracelular en la capa molecular profunda adyacente a la de células de Purkinje. En la octava semana después del nacimiento, la taurina se encuentra presente en la mayoría de las neuronas del cerebelo, en especial en las células de Purkinje y sus dendritas al igual que en las células granulares. En el cerebelo de la rata adulta, la taurina está virtualmente ausente en las células de Purkinje y sus dendritas; sin embargo, en crías neonatales de gatos deficientes en taurina, hay un nivel de inmunorreactividad en el cerebelo significativamente reducido; aunque, como se puede esperar, aparece una banda de tinción aparentemente extracelular en la sustancia blanca.

El cambio más dramático ocurre en la octava semana postnatal en el cerebelo, de gatos deficientes de taurina, ya que las células de Purkinje y sus dendritas están desprovistas de la marca y se muestran como "fantasmas". Las células granulares están también virtualmente desteñidas y algunas permanecen aún en el proceso de migración al través de la CM.

D. Estudios en Cultivo Celular.

Como ya hemos mencionado, la incorporación de taurina a la célula es inhibida por un número de análogos estructurales de los cuales los más importantes son la β -alanina y GES. Se ha demostrado que la maduración y migración de las células granulares es intrínseca y tiene lugar en cultivos celulares en forma análoga a un proceso *in vivo* (44,160,161,164). Así, las células granulares tomadas de la corteza cerebelar antes y durante el proceso migratorio, migrarán a lo largo de "cables" los cuales son paquetes de fibras paralelas y procesos astrogliales que se forman entre los reagregados de células cerebelares en cultivo. Por otra parte, no se pudo inducir *in vitro* la migración de células granulares tomadas de la corteza cerebelar después de haber completado su migración a la CGI, quizá porque sus propiedades de membrana celular externa habían cambiado.

La mutante de ratón Weaver es un modelo experimental especialmente atractivo ya que sus células granulares postmitóticas degeneran en la CGE y no migran a lo largo de las fibras de la glía de Bergmann a la CGI. Estos ratones tienen una concentración de taurina cerebelar sustancialmente reducida durante la etapa crítica de morfogénesis postnatal en comparación con ratones normales (123). Este fenotipo es reproducible *in vitro* y varios cultivos cerebelares muestran "cables" con muy pocas células granulares migratorias, la mayoría de las cuales degeneran durante los días 2-3 de reagregación. Sin embargo, cuando se agrega taurina 10 mM al medio de cultivo, se evita tal fenotipo y prácticamente se reestablece la formación de "cables" y la migración de células granulares similar al modelo normal. Este efecto es específico a la taurina y no es reproducido por otros análogos de taurina tales como β -alanina o GES.

Después de esta demostración del importante papel de la taurina en cultivos de células cerebelares de ratón, se hicieron experimentos similares mediante el uso de células cerebelares de gatos con la expectativa que la taurina fuera esencial para un desarrollo normal en cultivo como sucede *in vivo* (159). Los resultados fueron sorprendentes e incomprensibles. La taurina agregada a cultivos fue tóxica a las neuronas cerebelares y la mayor supervivencia se obtuvo cuando se utilizó suero dializado que no contenía taurina detectable en el medio de cultivo (162). Además, los análogos de taurina tales como la β -alanina y GES aumentan el crecimiento de las mismas células. Estos resultados contradictorios aún esperan una explicación. Es importante determinar si las neuronas cerebelares de rata tienen, como las del ratón Weaver o las de los gatos, una explicación racional en los desordenes migratorios de las células granulares cerebelares.

En una revisión hecha por J.A.Sturman en el *Physiological Reviews* publicada en Enero de 1993 (136) cita: ***"En los estudios previamente descritos en los que se trataron ratas con GES en varios estadios de desarrollo, el producto tuvo concentraciones cerebelares de taurina sustancialmente reducidas. Sin embargo, hasta el momento no han habido reportes que indiquen si estas concentraciones reducidas de taurina afecta cualquier aspecto morfológico o funcional durante el desarrollo de el cerebelo"***; por lo que se considera necesario realizar mas estudios estructurales para corroborar si existen algunas alteraciones en los eventos del desarrollo postnatal del cerebro, en especial del cerebelo debido a que éste es el organo más susceptible a algun daño ya sea en su diferenciación o en su especialización que se llevan al cabo en la etapa postnatal.

**IV. PLANTEAMIENTO
DEL
PROBLEMA.**

La privación de taurina retarda el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar en gatos. Además, la administración de Guanidinoetilsulfonato (GES) remueve severamente el contenido tisular de taurina en rata. Sin embargo, se desconoce si tal deficiencia de taurina en ratas tiene por consecuencia alguna alteración en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar.

V. HIPOTESIS.

La remoción de Taurina por la administración de Guanidinoetil-sulfonato en la etapa gestacional y postnatal retarda el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar en ratas.

VI. OBJETIVOS.

A) GENERAL.

Evaluar el efecto de la deficiencia de Taurina, inducida por la administración de GES, en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar de rata.

B) ESPECIFICOS.

En ratas deficientes en Taurina en comparación con testigos, en los días 0, 7, 14, 21 y 28 de edad postnatal:

1. Evaluar los parámetros de pesos corporal, encefálico y cerebelar
2. Comparar el espesor de los diferentes estratos de la corteza cerebelar,
3. Cuantificar la población celular en cada uno de los estratos corticales del cerebelo,
4. Evaluar morfológicamente el proceso migratorio de las células granulares desde la CGE a la CGI de la corteza cerebelar.

**VII. MATERIAL
Y
METODOS.**

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

- a) Ratas Wistar hembras adultas multiparas entre 290 y 310 gramos de peso.
- b) Las crías de estas ratas multiparas desde el momento del nacimiento hasta los 28 días de edad.

2. MATERIAL QUÍMICO.

a) **Lugol.** Se mezclaron 10 gr de I, 7.1 gr de KI en 25 ml de agua y 75 ml de alcohol.

b) **Guanidinoetilsulfonato (GES) al 1%.** Este compuesto se obtuvo de el laboratorio de Fisiología Celular de la UNAM a cargo de la Dra. Herminia Pasantes Morales (apéndice A). Se disolvió 1 gr en 100 ml de agua bidestilada y desionizada.

c) **Pentobarbital sódico.** Se utilizó la marca comercial Anestosal que contiene 63 mg de pentobarbital sódico/ml (63 mg/ml). Se administró dosis única de 25 mg/kg de peso.

d) **Buffer de Fosfatos de Sodio.** 0.1M, pH 7.4. Se preparó a partir de 2 Soluciones Stock:

A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20.7 grs en 1000 mls de agua.

B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40.2 grs en 1000 mls de agua.

Se mezclaron 270 mls de solución A en 730 mls de solución B.

e) **Solución Lavadora.** En 1000 mls de Buffer de fosfatos, se agregó 1 gr de Procaína y 1000 U.I de Heparina.

f) **Solución Fijadora.** Glutaraldehído al 2.5% en Buffer de fosfatos.

g) **Tetróxido de Osmio 2%.** Se diluyó el contenido de una ampula de 1 gr de OsO_4 en 50 ml de agua bidestilada y desionizada.

h) **Resina Poli/Bed 812.** Se mezclaron 50 gr de resina Poli/Bed 812 en 25 gr de DDSA, 25 gr de NMA y 2 ml de DMP-30.

i) **Alcohol.** Preparado en agua bidestilada y desionizada al 50%, 80%, 95% y al 100%.

j) **Azul de Toluidina.** Se utilizaron 4 gr de borato de sodio, 0.5 gr de Azul de Toluidina y 100 mls de agua bidestilada y desionizada (apéndice D).

3.EQUIPO.

- a) Microscópio óptico Carl Zeiss.
- b) Ultramicrotomo Porter Blum MT-1.
- c) Fotomicroscópio American Optical.

4. METODOS.

Las ratas se matuvieron bajo las condiciones de bioterio con temperatura de 22°C, ciclos luz oscuridad de 12/12 hrs, en jaulas de policarbonato con alimento y agua durante el desarrollo del experimento.

Se hicieron citologías esfoliativas por lavado vaginal para determinar su ciclo estral; estas fueron teñidas con lugol al 10% y observadas al microscópio de luz. Una vez que se encontraron en proestro se aparearon en relación de tres hembras por macho y se continuaron haciendo citologías vaginales hasta encontrar esperma, momento en que se consideraron preñadas y fueron separadas de los machos en dos grupos:

a) **Experimental**, las cuales recibieron tanto GES 1% en el agua de beber como croquetas chow Purina *ad libitum*. Este tratamiento se mantuvo hasta el momento en que las crías alcanzaron los 28 días de edad.

b) **Testigo**, sin tratamiento alguno.

Se sacrificaron 5 crías de cada grupo en el momento de el nacimiento y a los 7, 14, 21 y 28 días de edad por perfusión intracardiaca según la técnica Feria-Velasco y Karnovski (42)(apéndice B) mediante el uso de la solución lavadora y fijadora. Se

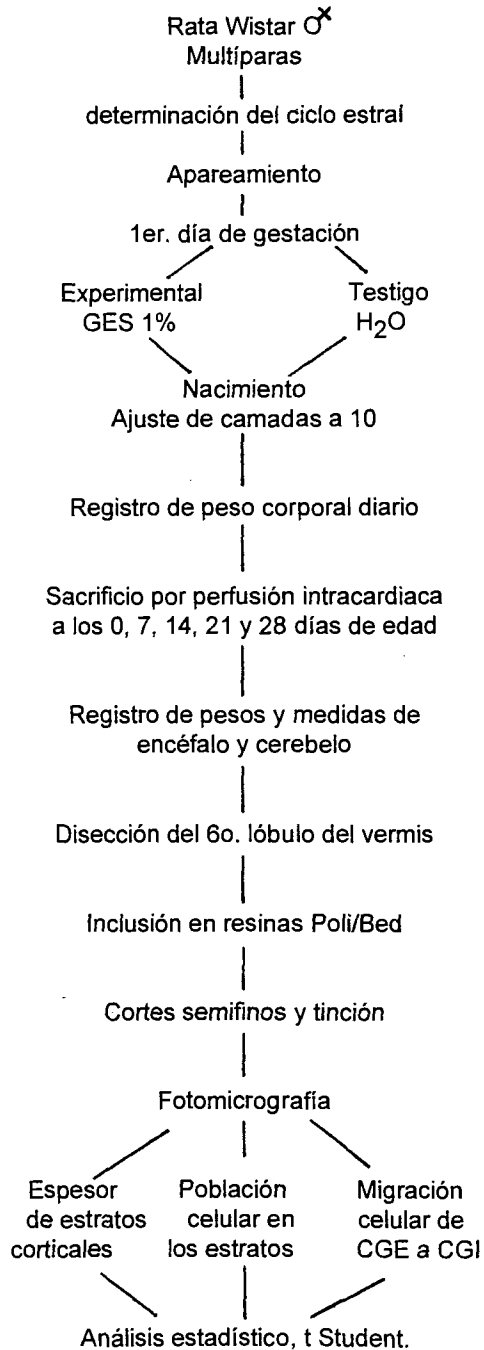
disecó el encéfalo mediante un corte en la médula espinal al nivel de la segunda vertebra cervical, el cual fué extraído e inmerso en la misma solución fijadora por 24 hrs. Posteriormente, se disecó el cerebelo y tanto el encéfalo como el cerebelo fueron pesados.

Se disecó el sexto lóbulo del vermis del cerebelo el cual fué procesado por la técnica de deshidratación, infiltración e inclusión de Monic (apéndice C) para ser posteriormente infiltrado en resinas Poli/Bed.

Se hicieron cortes semifinos de los lóbulos con el ultramicrotomo, los que fueron teñidos con Azul de Toluidina y fotografiados en un fotomicroscópio con objetivos 10x y 20x.

Sobre las fotomicrografías se midieron los diferentes estratos de la corteza del cerebelo a diferentes edades y se aplicó un factor de ampliación en cada fotomicrografía (apéndice E). Posteriormente se cuantificó la población celular de cada estrato cortical a lo largo de 100 μ al igual que se prestó especial atención al número de células premigratorias de la CGE y las migratorias de la CM.

Los resultados de los pesos: corporal, encefálico y cerebelar al igual que los espesores de los estratos corticales como los números celulares en los diferentes estratos corticales fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba "t" de Student (168).



VIII. RESULTADOS.

Todos los resultados presentados a continuación fueron obtenidos en recién nacidos (RN) y en 7, 14, 21, y 28 de desarrollo postnatal de crías de ratas tratadas con GES 1% y a su vez comparados en los mismos días con sus respectivos testigo.

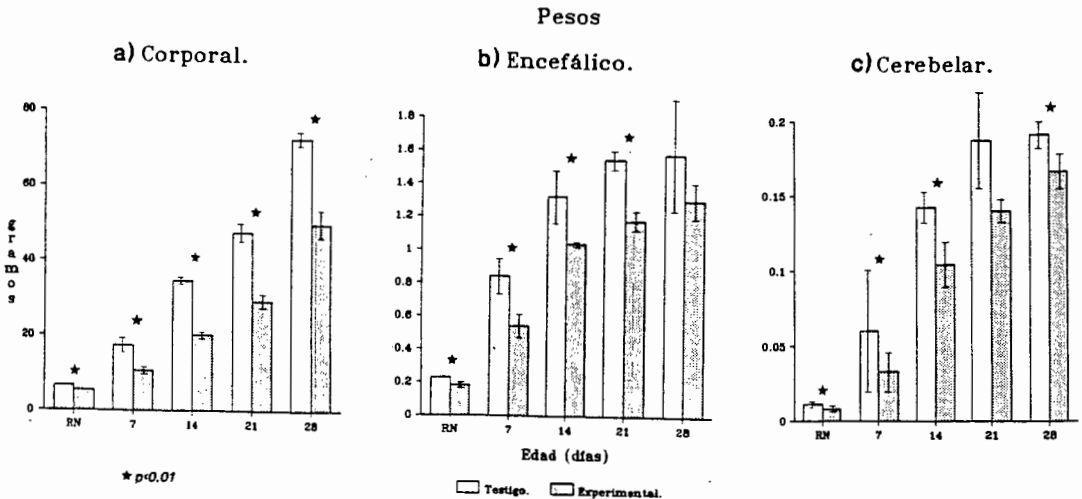
En la gráfica 1, donde se representan diferentes pesos, el corporal fué tomado diariamente de las crías de ambos grupos antes de ser sacrificadas. El peso encefálico fué tomado 24 hrs. después de la perfusión intracardiaca y la disección del cerebelo, mismo que a su vez fué pesado por separado.

Las fotomicrografías de las figura 4 a la 7 fueron tomadas de los cortes obtenidos del sexto lóbulo del vermis tanto de las crías testigo de las experimentales. En cada una de las edades se tomaron las fotomicrografías de la misma laminilla tanto a 10x como a 20x.

Los espesores de los estratos corticales presentados en la Gráfica 2 fueron tomados de fotomicrografías con aumento 20x sobre las que se delinearon los límites de cada estrato para su posterior medición (apéndice E). Posteriormente se contaron los somas de las células granulares tanto en la CGE como en la CM a lo largo de 100 micras y los resultados se presentaron en la gráfica 1.

En la gráfica 4a, se representa en porcentaje la proporción que ocupa el espesor de la CGE en la suma de los espesores de la CGE con la CM, tomando estas dos últimas como el 100%. De manera similar se hizo con el número de células en la CGE en el número celular total en CGE y CM (fig 4b) y a su vez con el número de células migratorias en la CM con respecto a el total de células en en CGE y CM (fig 4c); en ambas se consideró como 100% la suma de células de la CGE y la CM.

Las tablas de datos de las siguientes gráficas se encuentran compiladas en el apéndice F.



Gráfica 1. PESOS CORPORAL, ENCEFALICO Y CEREBELAR.

a) Peso Corporal. En ambos grupos hay un aumento progresivo de la masa corporal al través del tiempo. Sin embargo, en el grupo tratado con GES 1% hay un menor aumento en la masa corporal con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ en todas las edades. A su vez, tal diferencia es menor en un 18% (RN), 38% (7d), 41% (14d), 38% (21d) y 31% (28d) que sus respectivos testigo.

b) Peso encefálico. Tanto en las crías testigo como en las tratadas con GES 1%, hay un incremento en la masa encefálica desde el nacimiento hasta el día 28 de edad postnatal. Sin embargo, en el grupo experimental tal incremento fué menor en todas las edades con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ en el día 14 y $p < 0.01$ en RN y en los días 7 y 21. Las crías experimentales tuvieron un menor desarrollo encefálico de un 18% (RN), 35% (7d), 21% (14d), 24% (21d) y un 17% (28d) que las testigo a las mismas edades.

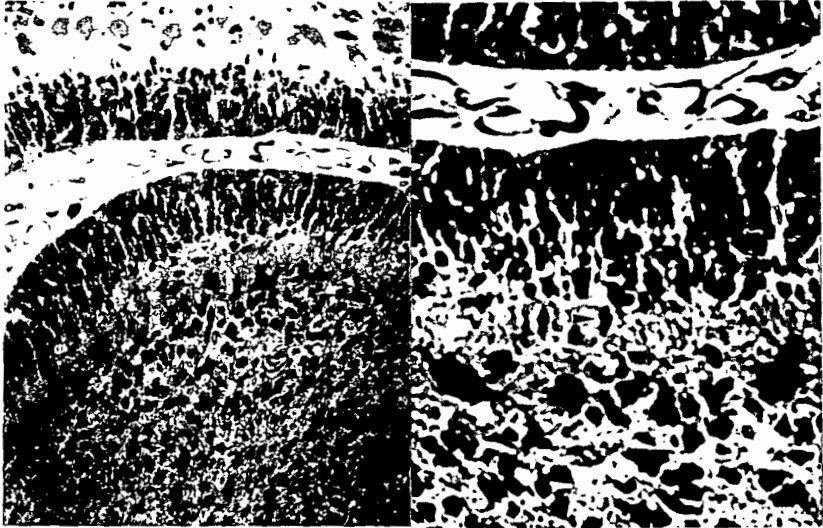
c) Peso Cerebelar. En el grupo experimental, así como en el testigo, hubo un aumento progresivo de la masa del cerebelo. Tal incremento disminuyó ligeramente en el día 28 en las ratas testigo. Así mismo, las crías experimentales también tuvieron un

incremento progresivo en la masa de este órgano. Sin embargo, tal incremento fué menor en las crías experimentales en relación con sus respectivos testigo. Tal diferencia fue estadísticamente significativa en todas las edades, con una $p < 0.01$ en los días 0, 7, 14 y 28 y con una $p < 0.02$ a los 21 días de edad. El incremento del peso cerebelar fue 27% (RN), 45% (7d), 26% (14d), 25% (21d) y 13% (28d) menor en las crías experimentales que en las testigo.

Fig. 4. FOTOMICROGRAFIAS DE LA CORTEZA CEREBELAR.

a y b) 7 días postnatales. En las siguientes fotomicrografías se puede observar que a los 7 días de edad la constitución de la corteza cerebelar es muy similar tanto en el grupo testigo como en el experimental. En ambos grupos, la CGE presenta un gran número de células granulares indiferenciadas. En la parte basal de este estrato se localizan varias células premigratorias fusiformes características del mismo. La capa molecular aún es muy delgada y se encuentra constituida básicamente por las arborizaciones dendríticas que las células de Purkinje comienzan a proyectar; tal estrato aún no se encuentra definido por completo y se puede observar la presencia de algunas células granulares que comienzan a migrar desde CGE a CGI (flechas). Las células de Purkinje comienzan a orientar sus somas en un estrato y a proyectar sus arborizaciones dendríticas hacia la CM. En este estrato se pueden ver algunas células granulares en migración.

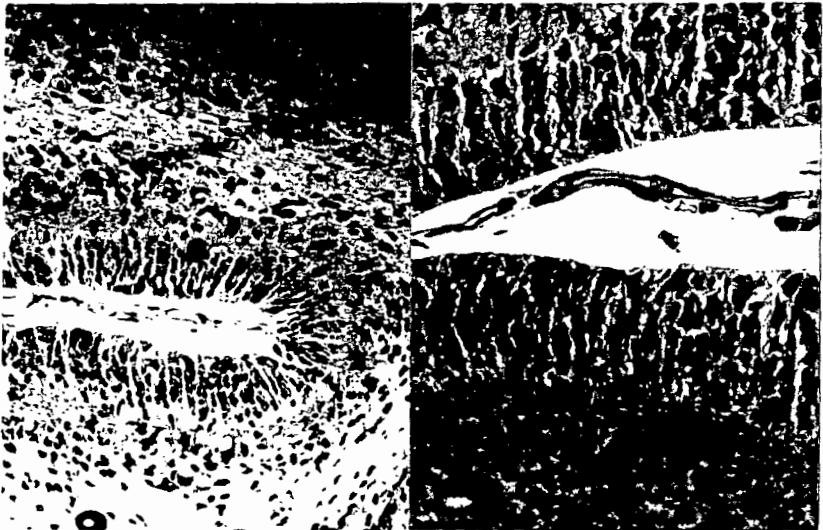
7 días de edad.



10x

20x

a) Testigo.



10x

20x

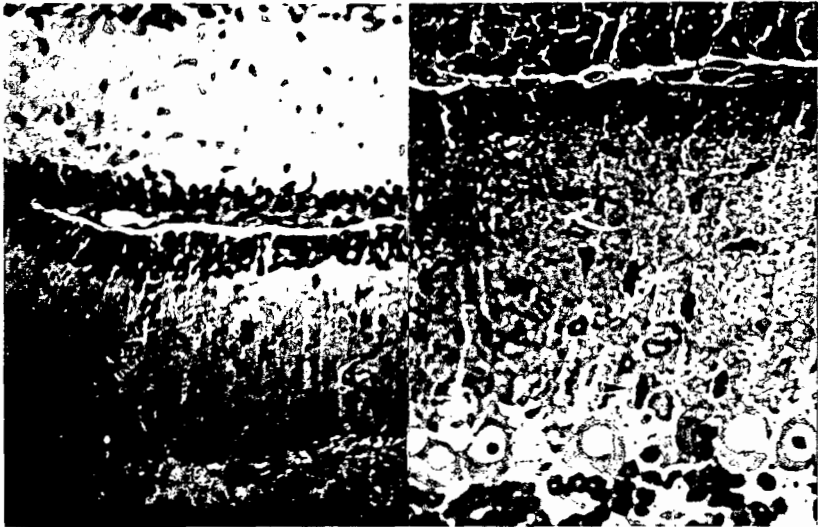
b) Experimental.

Fig.4.

Fig.5

c y d) 14 días postnatales. En las crías testigo, el espesor de la CGE ha disminuido de manera importante (5 células aproximadamente) a los 7 días de desarrollo. La CM ha aumentado considerablemente su espesor por la proliferación de fibras paralelas formadas durante la migración de células granulares de la CGE a la CGI y por la proyección de las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje en desarrollo. A su vez, observamos un gran número de células granulares en migración en este estrato (flechas). Las células de Purkinje han alineado sus somas los que describen su forma esférica característica para formar un estrato como tal; es fácil identificar sus núcleos y nucleolos entre los que se observan algunas células granulares migratorias. En cambio, en las crías tratadas con GES 1% la CGE tiene un mayor espesor (7 células aproximadamente). La CM ha aumentado su espesor, sin embargo este es menor que el de el grupo testigo. Además, se observa un menor número de células granulares migratorias que en las crías normales (flechas). Tanto las arborizaciones dendríticas como los somas de las células de Purkinje se encuentran picnóticos en este grupo; además, los somas de estas células no han tomado su forma esférica característica y no describen la alineación que tiene el grupo testigo.

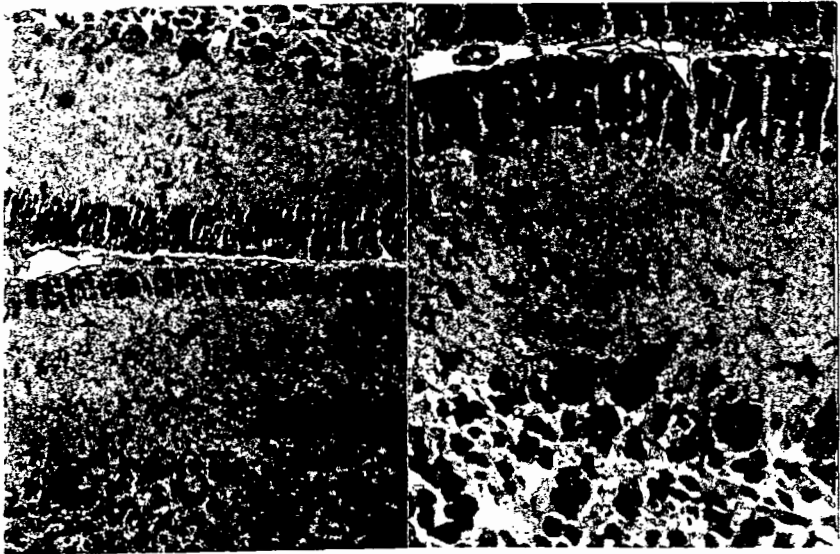
14 días de edad.



10x

20x

a) Testigo.



10x

20x

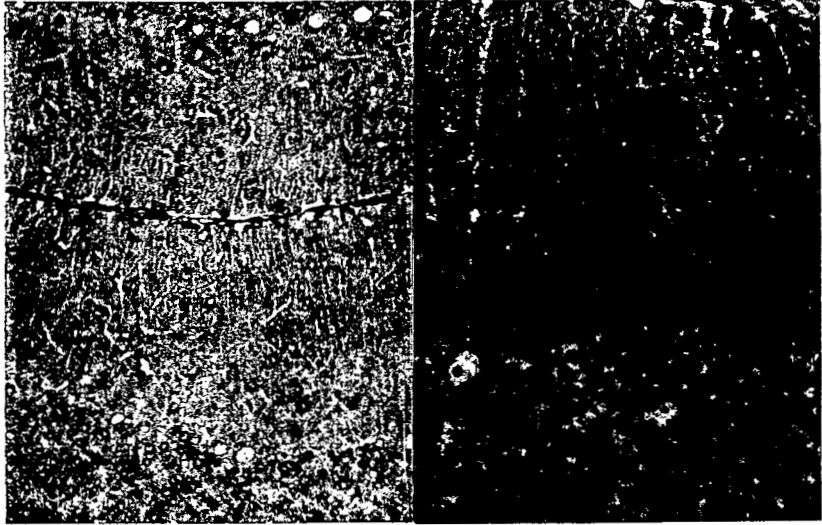
b) Experimental.

Fig.5.

Fig.6

a) y b) 21 días postnatales. La CGE ha desaparecido por completo en las crías testigo a los 21 días de desarrollo postnatal aunque se puedan observar algunas células granulares aisladas a punto de migrar. En la capa molecular se pueden distinguir perfectamente las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje al igual que algunas células granulares en migración, la mayoría de las cuales se encuentran próximas a las células de Purkinje a punto de alcanzar la CGI (flechas). La CCP conserva su distribución característica donde podemos distinguir perfectamente los núcleos y nucleolos de las células de Purkinje. Por otro lado, en las crías tratadas con GES 1% prevalece la CGE con un espesor de 1 a 2 células. Aunque la CM ha aumentado en su espesor, tal no es igual que el de las crías testigo. Además, las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje se encuentran picnóticas y no tienen la distribución que en las crías normales. En este estrato también se puede observar un mayor número de células granulares en migración que en su correspondiente testigo (flechas). Las células de Purkinje de estas crías tienen sus somas retraídos y picnóticos, los que en la mayoría de las crías se encuentran desorientados.

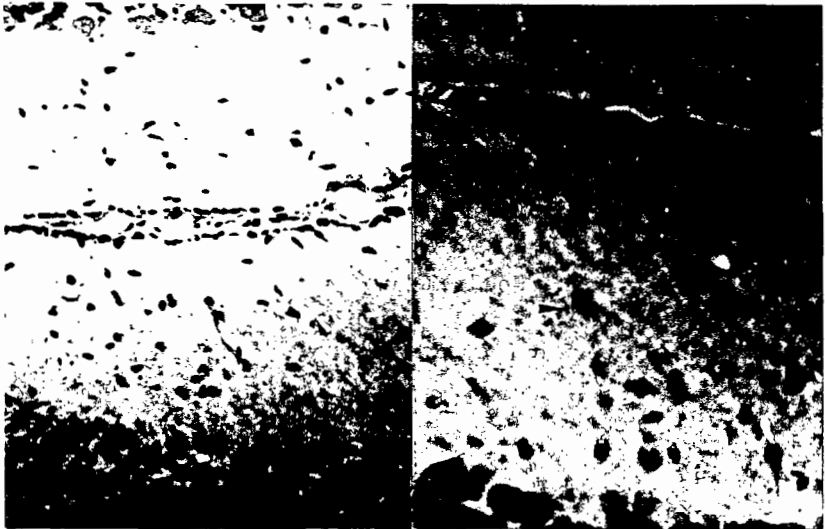
21 días de edad.



10x

20x

a) Testigo.



10x

20x

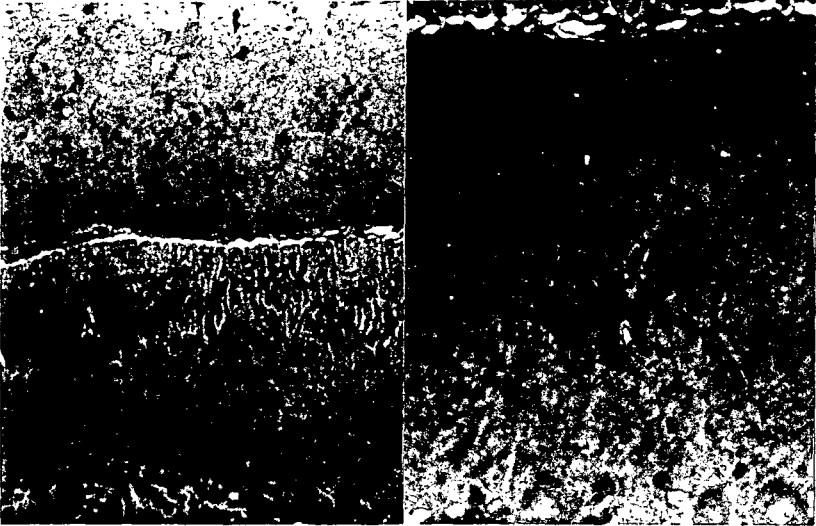
b) Experimental.

Fig.6.

Fig.7

a) y b) 28 días postnatales. En esta edad no encontramos ninguna célula granular externa en las crías testigo. La CM ha alcanzado su máximo espesor y observamos muy pocas células migratorias fusiformes en este estrato (flechas). La CCP se encuentra normal en estas crías. Sin embargo, en las crías tratadas con GES 1% persiste la CGE. El espesor de la CM es menor que el alcanzado por las crías testigo; a su vez, encontramos un gran número de células granulares en migración en este estrato (flechas).

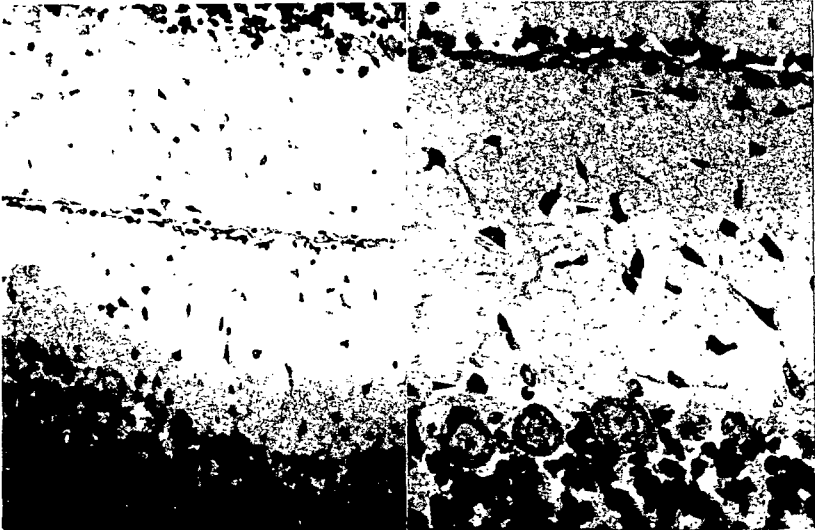
28 dias de edad.



10x

20x

a) Testigo.



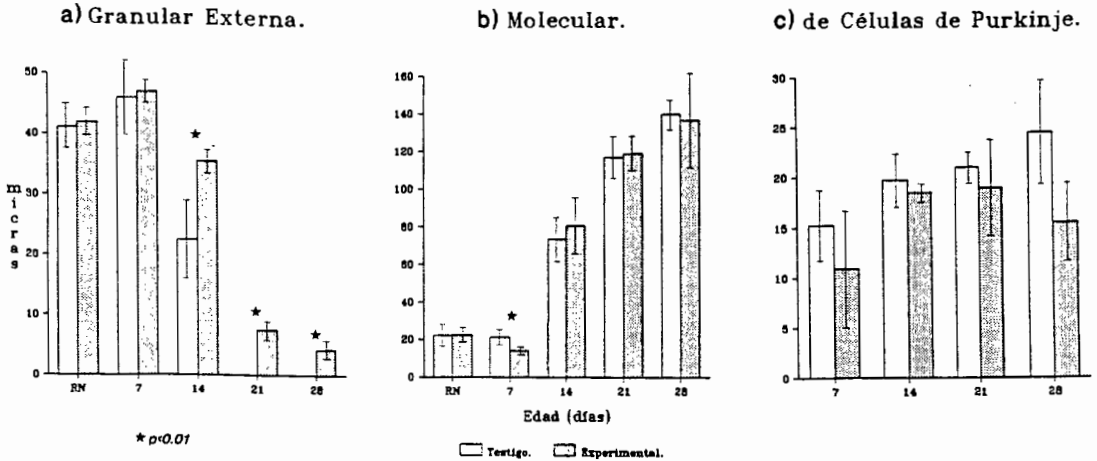
10x

20x

b) Experimental.

Fig.7.

Espesores de las capas



Gráfica 2. ESPOSOR DE LOS ESTRATOS CORTICALES CEREBELARES.

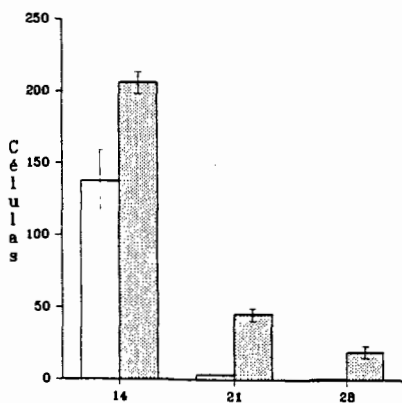
a) CGE. El espesor de la CGE aumenta levemente desde RN a 7d de manera muy similar en ambos grupos. Tal espesor disminuye de manera dramática en las crías testigo a los 14 días para posteriormente desaparecer a los 21 días y permanecer completamente ausente en el día 28. Sin embargo, en las crías tratadas con GES 1% este estrato disminuye en menor grado su espesor en el día 14. Aunque disminuye dramáticamente en el día 21 y 28, tal estrato persiste en estas crías. Las diferencias en los espesores de estos estratos son estadísticamente significativas en el día 14 ($p < 0.01$) y en los días 21 y 28 ($p < 0.001$). Tal espesor fue 2% (RN), 4% (7d) y 58% (14d) mayor en las crías experimentales que en las testigo.

b) CM. Este estrato se mantuvo muy similar desde el nacimiento a los 7d de edad a las crías testigo y posteriormente aumentó su espesor hasta los 28 días de edad postnatal sin que hubiera una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Sin embargo, a los 7 días de desarrollo, las crías tratadas con GES 1% tuvieron un espesor menor en este estrato con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.01$. En las crías experimentales, tal estrato tuvo un espesor 1% (RN) y 33% (7d) menor, 9% (14d) y 1% (21d) mayor y 3% menor (28 d) que las crías testigo.

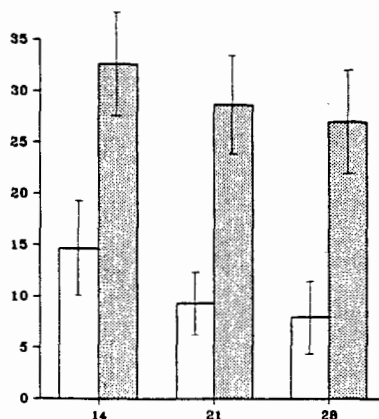
c) **CCP.** Los resultados que aquí se muestran corresponden a las medidas de diámetros tangenciales de los somas de las células de Purkinje. Tal diámetro tuvo un aumento desde el momento de el nacimiento hasta los 28 días de edad postnatal en las crías testigo. Sin embargo, en las crías tratadas con GES 1% estas células tuvieron un menor diámetro a los 7, 14 y 21 días (p NS) y en especial a los 28 días ($p < 0.05$), cuando sufrieron una retracción en sus somas. El espesor de estas células fue menor en las crías experimentales e un 29% (7d), 6% (14d), 9% (21d) y 37% (28d) respectivamente.

Número de células

a) premigratorias en CGE.



b) migratorias en CM.

 $p < 0.001$

□ Testigo. ■ Experimental.

Gráfica 3. CELULARIDAD EN LOS ESTRATOS CORTICALES CEREBELARES.

a) Células premigratorias en CGE. El número de células en la CGE disminuyó en ambos grupos a partir de los 14 días de edad postnatal. Las crías testigo presentaron un número casi nulo de esta estirpe celular a los 21 días y a los 28 una total ausencia de estas. A su vez, las crías tratadas con GES 1% mantuvieron un mayor número celular que las crías testigo tanto a los 14, 21 y 28 días de edad postnatal ($p < 0.001$). La diferencia de población celular fue 49% (14d), 371% (21d) y 2,828% (28d) mayor en las crías experimentales que en las testigo respectivamente.

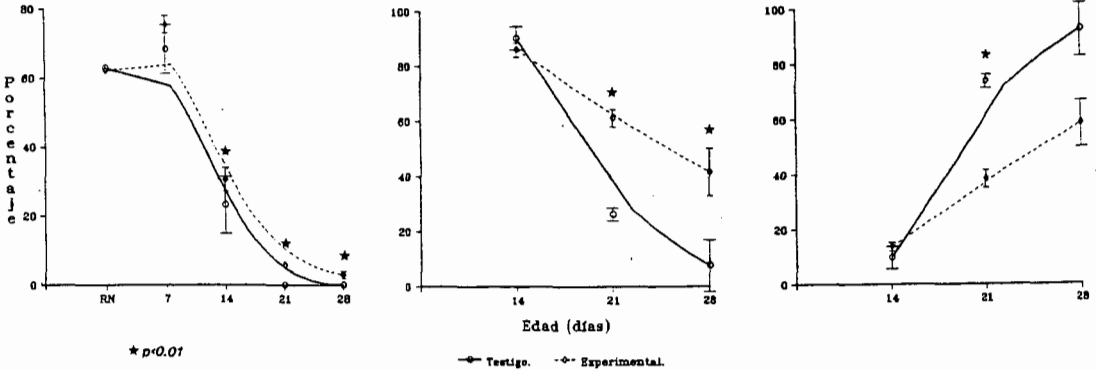
b) Células migratorias en CM. El número de células granulares migratorias en la CM tuvo una moderada disminución desde los 14 a los 28 días de edad en ambos grupos. Sin embargo, las crías tratadas con GES 1% mantuvieron un mayor número de estas células que las crías testigo con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ en todas las edades. Las crías tratadas con GES 1% tuvieron 50% (14d), 371% (21d) y 237% (28d) más células migratorias que las correspondientes testigo.

Proporción de

a) el espesor de CGE en CGE y CM.

b) células premigratorias en células de CGE y CM.

c) células migratorias en células de CGE y CM.



Gráfica 4. RELACION DE LOS ESPESORES DE LAS CAPAS CORTICALES.

a) **CGE en CGE y CM.** Esta gráfica representa el porcentaje que ocupa el espesor de la CGE en la suma de los espesores de la CGE y CM. Tal porcentaje fue el mismo en ambos grupos en el momento del nacimiento y tuvo un ligero aumento a los 7 días de edad para posteriormente descender de los 14 hasta los 28 días. En las crías testigo este porcentaje fue de 0% a los 21 y 28 días. Sin embargo, en las crías tratadas con GES 1% se mantuvo un ligero porcentaje a los 21 y 28 días de edad postnatal con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.01$ a los 14 y 28 días de edad y de $p < 0.001$ a los 21 días. Este estrato fue 10% (7d) y 31% (14d) superior en las crías experimentales.

b) **Células de CGE en el total de células en CGE y CM.** El porcentaje de células granulares premigratorias en las de CM y CGE disminuyó drásticamente a partir de el día 14 hasta niveles cercanos al cero a los 28 días de edad en las crías testigo. Sin embargo, en las crías experimentales este porcentaje se mantuvo 133% (21d) y 447% (28d) superior que las testigo con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$.

c) Células de CM en el total de células en CGE y CM. El porcentaje de las células migratorias en el total de células en la CGE y la CM aumentó de manera importante en las crías testigo de el día 14 al 28 de edad postnatal. Sin embargo, en las crías experimentales tal aumento fue inferior en un 47.68% (21d) y 36.91% (28d) con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$.

IX. DISCUSSION.

La razón principal de haber realizado nuestros experimentos en ratas y no en gatos se debió a que los eventos de morfogénesis del cerebelo del gato no son tan parecidos a los de los humanos como son los de la rata. También porque la rata es un modelo ideal para el estudio del desarrollo del sistema nervioso ya que es la especie más utilizada y mejor conocida en donde el estudio de un aspecto pueda generar datos fundamentales.

Otro motivo por el que se utilizó la rata como modelo en este trabajo fué conocer si el efecto de la carencia de taurina es el mismo en especies que biosintetizan este aminoácido al de especies que no lo biosintetizan.

En el gato la eliminación de taurina en la dieta da como resultado cambios bioquímico-morfológicos evidentes. Nos cuestionamos si esto también ocurre en la rata cuando de manera experimental se reduce su contenido de taurina.

En trabajos previos realizados por otros autores incluyendo los experimentos hechos en nuestro laboratorio se administró el GES 1% alrededor del quinto día antes del alumbramiento de ratas. Posteriormente, otros trabajos indicaron que la mayor remoción de taurina al administrar GES se presentó fundamentalmente a partir del día 20 de tratamiento. Por esta razón en el presente trabajo se administró el GES desde el momento de la fecundación para garantizar que al nacimiento de las crías, estas tanto como la madre estuvieran bajo el máximo efecto del GES para mantener los niveles más bajos de disponibilidad de taurina.

Un trabajo que apoya de manera crucial nuestro modelo es el realizado por Huxtable et al. en 1979 (63) en donde mantuvo una concentración 55% menor de taurina a partir del día 20 de ser administrada hasta el día 50 tanto de ratas gestantes como no gestantes. Nuestro diseño experimental encaja perfectamente con la fase de mayor actividad de remoción de taurina por el GES.

En el presente trabajo hubo una diferencia significativa en el aumento de peso corporal entre las crías tratadas con GES 1% y las testigo, con una mayor diferencia entre ambos grupos en los días 7 (38%), 14 (41%) y 21(38%). Sin embargo, otros autores que realizaron estudios bioquímicos similares al presente trabajo tanto desde la fecundación como los 5 días antes del alumbramiento (41,60,62,78) no encontraron ninguna diferencia significativa. Esto sugiere que la taurina pueda intervenir en algunos otros procesos metabólicos durante los eventos de desarrollo corporal de la rata.

La diferencia significativa en el aumento de peso encefálico entre ambos grupos fué más evidente los días 7(35%), 14 (21%) y 21 (24%) los cuales coinciden con las diferencias encontradas en el aumento de peso corporal.

En relación al peso cerebelar, los hallazgos más sobresalientes se presentaron en el día 7 de desarrollo postnatal, esto pudo deberse a que la privación de taurina pudo haber producido cambios en la proliferación de células granulares que determinaron una menor tasa de mitosis de la CGE (gráfica 2a); esto de acuerdo con los eventos de morfogénesis del cerebelo reportado por otros autores (10-12,116,117). Esto también pudo deberse a una menor población celular en la capa molecular (gráfica 2b) que posteriormente corresponda a células en canasta, estrelladas y de Golgi o a otros elementos de la sustancia blanca.

Los eventos morfológicos del cerebelo durante el desarrollo postnatal de las crías procedentes de las ratas testigo o tratadas con GES 1% son similares pero existe un retardo en la desaparición de las células de la CGE y por consiguiente en la consolidación de las diferentes capas que constituyen la corteza cerebelar madura. Estos datos concuerdan con el modelo de restricción de taurina en el gato donde ésta es esencial y cuya restricción tiene los mismos efectos sobre la morfogénesis. Mientras en animales testigo al día 21 ya no existen células de la CGE, en los animales tratados con GES en el día 28 todavía existe un estrato de células granulares remanente de 5 células aproximadamente. Estas evidencias morfológicas de retraso en la migración de células granulares coincide con los datos reportados por Akahori et al., Ejiri y Huxtable (8,9,41,60,63,64).

El fenómeno de migración de las células granulares externas fué retrasado en las ratas deficientes de taurina tanto en el tiempo de inicio (gráfica 3a) como en la velocidad (gráfica 3b).

Consideramos que la deficiencia de taurina repercute en el retraso del inicio de la migración celular que da como resultado una mayor permanencia de este tipo celular en la CGE en especial del día 14 al 21.

Por otra parte, las células que abandonan la CGE permanecieron por más tiempo en su trayecto por la capa molecular lo que sugiere que la taurina pudiera estar involucrada en la movilización de la célula granular a lo largo de la glía de Bergmann. Esto concuerda con la proporción de células premigratorias en el total de células de la CGE y CM (gráfica 4b) y con las células migratorias en el mismo total (gráfica 4c).

X. CONCLUSIONES.

La administración de un agente antagónico de la taurina (GES) con su consecuente remoción durante el desarrollo postnatal de ratas, tiene por consecuencia:

1. Una menor ganancia de peso corporal, encefálico y cerebelar.
2. Un mayor espesor de la CGE y persistencia de la misma en etapas avanzadas del desarrollo postnatal de la corteza cerebelar.
3. Un retraso en el inicio de la migración de un gran número de células granulares externas.
4. Una disminución en la velocidad de migración de las células granulares externas al través de la Capa Molecular.
5. Un retardo en el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar.

XI. A P E N D I C E S.

APENDICE A.
PREPARACION DE GES A PARTIR DE TAURINA (63).

Materiales:

Taurina	60 grs
Metil isotiopseudourea	100 grs
Hidróxido de Amonio concentrado	120 mls

Procedimiento:

Se mezcla la taurina la metil isotiopseudourea en el hidróxido de amonio. Se calienta la mezcla a 60°C y se mantiene a esa temperatura hasta que cese la fase de gas. Se enfría la mezcla y se deja que forme cristales. Se filtran los cristales formados y se recrystalizan tres veces mediante el uso de agua. Se producen 53 grs (55%).

**APENDICE B.
TECNICA DE PERFUSION INTRACARDIACA (42).**

Materiales:

Anestésico.

Equipo de disección.

Aparato de perfusión:

Jeringa desechable de 20 ml con aguja.

Manguera.

Solución Lavadora (ver materiales y metodología).

Solución Fijadora (ver materiales y metodología).

Procedimiento:

Se anestesia a la rata y se coloca en la tabla de disección. Se hacen las incisiones necesarias en piel, músculo y hueso de la caja torácica hasta exponer el corazón. Se introduce aguja de la jeringa del aparato de perfusión con la solución lavadora en el ventrículo izquierdo y se hace un corte en la aurícula derecha del animal. Se comienza a inyectar la solución lavadora (3-10 min aprox.) y una vez que salga limpia de sangre por la aurícula, se comienza a inyectar la solución fijadora (aprox. 5-15 min) hasta que el animal esté completamente fijado, momento en que se puede proceder a la disección del encéfalo.

APENDICE C.
TECNICA DE DESHIDRATACION, INFILTRACION E INCLUSION
EN RESINAS SEGUN LA TECNICA DE MONIC.

1. Postfijación y lavado: se dejan las muestras en tetróxido de Osmio-Buffer 1:1 por 45 mins.
2. Se lavan en Buffer 2 veces.
3. Alcohol al 50%.....2 cambios, enjuagar a 4°C 10 mins c/u.
4. Alcohol al 80%.....2 cambios, enjuagar a 4°C 10 mins c/u.
5. Alcohol al 95%.....2 cambios, 15 min c/u, enjuagar a 4°C.
6. Alcohol al 100%.....3 cambios, 20 mins c/u.
 - a) Tejido y alcohol a 4°C.
 - b) Tejido a T°A*, alcohol a 4°C.
 - c) Ambos a T°A.
7. Oxido de Propileno (OxP). Solo 2 cambios 10 mins c/u.
8. OxP:resina2:1.....30 mins (tapados y a T°A)
9. OxP:resina1:1.....60 mins (tapados y a T°A)
10. OxP:resina 1:2.....toda la noche al vacío destapados.
11. Resina nueva.....destapados 4 hrs al vacío.
12. Inclusión.....moldes o cápsulas.

Nota: Para hacer esto se necesita sacar antes el Oxido de Propileno para que cuando se use esté a T°A. No se debe calentar mucho porque es explosivo.

* T°A = Temperatura ambiente.

**APENDICE D.
PREPARACION DE AZUL DE TOLUIDINA.**

Materiales:

Borato de Sodio.....4 grs.
Azul de Toluidina.....0.5 grs.
Agua bidestilada y desionizada.....100 mls.

Procedimiento:

Se calienta el agua hasta que alcance 60°C y se retira de la platina, se agrega el Borato de Sodio y agita hasta que se disuelva. Una vez disuelto se le agrega el Azul de Toluidina y se calienta nuevamente hasta que alcance los 80°C y comience a hervir ligeramente. Se deja así por 15 mins cuidando que no se eleve la temperatura.

Se deja enfriar a temperatura ambiente , se filtra y se coloca en un frasco ambar o en uno recubierto con papel aluminio para resguardarlo de la luz. Puede ser usado 24 hrs después de su preparación.

APENDICE E.
CALCULO DEL FACTOR DE AMPLIACION EN LAS FOTOGRAFIAS.

Para obtener las medidas de los estratos corticales del cerebelo, fué necesario realizar una serie de conversiones de centímetros a micras, las que se presentan a continuación mediante un ejemplo:

- A) Primero se mide un cuerpo en la fotografía 4.9 cm
 B) Se mide el mismo cuerpo en el negativo 9.4 mm
 C) Se divide el valor de la foto con
 el del negativo 49 mm/9.4 mm = **5.2**
 El factor de ampliación es de **5.2**

Para saber las ampliaciones en las fotografías se multiplica:

- Objetivo 10x
 -Optovar 1.25
 -Factor de cámara 5.13 = **333.45**
 -Factor de ampliación 5.2

Si en la fotografía medimos un cuerpo de 7.5 mm:

$$7.5 \text{ mm} / 333.45 = 0.0224921 \text{ mm}$$

o si dividimos 7.5 mm/.33345 = 22.49 micras.

Así, todas las medidas tomadas en milímetros en fotografías al 10x, se dividieron entre .33345 y se obtuvo su valor en micras.

APENDICE F.
TABLAS DE DATOS DE LOS RESULTADOS.

1. Peso Corporal (gráfica 1a).

	RN		7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	6.55	0.32	17.3	1.64	34.5	0.28	47.5	2.29	72.6	1.4
Experim	5.36	0.05	10.6	0.7	20.1	0.28	29.3	1.5	49.7	3.5
p	<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001	

2. Peso Encefálico (gráfica 1b)

	RN		7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	0.22	.001	0.84	.106	1.32	.159	1.54	.059	1.57	.35
Experim	0.18	.005	0.54	.069	1.03	.011	1.17	.063	1.30	.11
p	<0.001		<0.001		<0.01		<0.001		NS	

3. Peso Cerebelar (gráfica 1c)

	RN		7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	.011	.001	.06	.004	.142	.01	.187	.032	.191	.01
Experim	.008	.001	.033	.013	.104	.015	.140	.007	.166	.01
p	<0.01		<0.01		<0.01		<0.02		<0.01	

4. Espesor de la CGE (gráfica 2a).

	RN		7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	41.0	3.76	45.9	6.06	22.4	6.48	0	0	0	0
Experim	41.8	2.1	43.9	1.73	35.4	1.73	7.49	1.5	4.24	1.5
p	NS		NS		<0.01		<0.001		<0.001	

5. Espesor de la CM (gráfica 2b).

	RN		7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	22.2	1.83	21.2	4.33	73.4	15.2	117	10.9	140	7.93
Experim	23.3	2.24	14.2	1.28	80.6	13.6	118	7.39	136	27.0
p	NS		<0.01		NS		NS		NS	

6. Espesor de la CCP (gráfica 2c).

	7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	15.24	3.38	19.74	2.63	20.99	1.5	24.48	5.26
Experim	10.90	5.82	18.49	0.86	18.99	4.82	15.5	3.77
p	NS		NS		NS		<0.05	

7. Células premigratorias en CGE (gráfica 3a).

	14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S
Testigo	138	21.1	3.33	1.52	0.66	1.15
Experim	206.66	6.5	45.66	3.51	19.33	3.51
p	<0.001		<0.001		<0.001	

8. Células migratorias en CM (gráfica 3b).

	14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S
Testigo	14.66	4.72	9.33	3.02	8	3.46
Experim	32.66	5.03	28.66	4.9	27	5.29
p	<0.001		<0.001		<0.001	

9. Espesor de CGE en CGE y CM (gráfica 4a).

	RN		7d		14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Testigo	62.8	0.37	68.3	6.79	23.8	8.4	0	0	0	0
Experim	65.2	1.74	75.5	2.17	3.97	3.3	5.88	0.81	3.17	1.68
p	<0.02		NS		<0.01		<0.001		<0.01	

10. Células premigratorias en células de CGE y CM (gráfica 4b).

	14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S
Testigo	90.15	3.91	17.46	2.34	5.55	9.61
Experim	86.34	2.08	61.61	2.83	41.94	8.74
p	NS		<0.001		<0.001	

11. Células migratorias en células de CGE y CM (gráfica 4c).

	14d		21d		28d	
	X	S	X	S	X	S
Testigo	9.84	3.91	71.53	18.79	94.44	9.62
Experim	13.64	2.08	38.38	2.83	58.05	8.73
p	NS		<0.01		<0.001	

XI. BIBLIOGRAFIA.

1. Agrawal H.C., Davis J.M. and Himwich W.A.(1966):*Postnatal changes in free amino acid pool of rabbit brain.*Brain Res 3:374-380.
2. Agrawal H.C., Davis J.M. and Himwich W.A.(1968):*Changes in some amino acids of guinea pig brain during postnatal ontogeny.* J.Neurochem.15:529-531.
3. Agrawal H.C., Davis J.M. and Himwich W.A.(1968): *Developmental changes in mouse brain: weight, water content and free amino acids.*J. Neurochem.15:917-923.
4. Agrawal H.C., Davis J.M. and Himwich W.A.(1968):*Maturational changes in amino acids in CNS of different mammalian species. In: Recent Advances in Biological Psychiatry*, edited by J. Wortis. New York,Plenum:258-265.
5. Agrawal H.C.,Davison A.N. and Kaczmarek L.K.(1971): *Subcellular distribution of taurine and cysteinesulphinate decarboxylase in developing rat brain.* Biochem.J. 122:759-763.
6. Agrawal H.C. and Himwich W.A.(1970):*Amino acids , proteins and monoamines of developing brain. In: Developmental neurobiology*, editrd by Himwich W.A.Springfield,IL:Thomas.287-310.
7. Akahori S, Ejiri KY, Sekiba K.(1986): *Taurine concentrations in Fetal,neonatal and pregnant rats.*Acta Med Okayama,40(2)93-101.
8. Akahori S, Ejiri KY, Kudo T. and Sekiba K.(1984):*Developmental changes in taurine and other sulfur containing amino acid concentrations in fetal and neonatal rats.*Acta.Obstet.Gynaecol.Japn 36:384-390.
9. Akahori S, Ejiri K.Y. and Sekiba K.(1986):*Taurine concentrations in fetal, neonatal and pregnant rats.*Acta Med.Okayama 40:93-101.
- 10.Altman, J. (1972): *Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I.The external germinal layer and the transitional molecular layer.*J.Comp.Neurol.145:353-398.
- 11.Altman,J. (1972):*Postnatal development of the cerebelar cortex in the rat. II.Phases in the maturation of Purkinje cells and of molecular layer.*J.Comp.Neurol.145:399-464.
- 12.Altman,J. (1972):*Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III.Maturation of the components of the granular layer.*J.Comp.Neurol.145:465-514.
- 13.Anderson P.A., Baker D.H., Corbin J.E. and Helper L.C.(1979):*Biochemical lesions associated with taurine deficiency in the cat.*J.Anim Sci.49:1227-1234.
- 14.Atlas M, Bahl JJ, Roeske W and Bressler (1984): *In vitro osmoregulation of taurine in fetal mouse hearts.* J.Mol.Cell Cardiol.16:311-320.
- 15.A'zary E., Saifer A., Schneck L. and Volk B.W.(1971):*The free amino acids of fetal brain in Tay Sach desease.*J.Neurochem.18:1369-1370.
- 16.Bachmann C., Nyhan W.L., Kulovich S. and Hornbeck M.E.(1975):*amino acods in the brain during fetal growth and the effects of prenatal hormonal and nutritional imbalance.*In:"Fetal and postnatal cellular growth. Hormones and nutrition, edited by Cheek D. B.,New York: Wiley:169-205.
- 17.Bankson D.D. and Russell R.M.(1987):*Protein energy malnutrition and taurine supplementation: effects on vitamin A nutritional status and electroretinogram of young rats.*J.Nutr.118:23-32.

18. Berson E.L., Hayes K.C., Rabin A.R., Schmidt S.Y. and Watson G. (1976): *Retinal degeneration in cat fed casein. II. Supplementation methionine, cysteine or taurine.* Invest Ophthalmol. 15:52-58.
19. Berson E.L., Watson G., Grasse K.L. and Szamier R.B. (1981): *retinal degeneration in cats fed casein. IV. The early receptor potential.* Invest. ophthalmol. Visual Sci. 21:344-351.
20. Berry M and Bradley P (1976): *The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat.* Brain Res. 112:1-35.
21. Bonhaus D.W., Pasantes-Morales H. and Huxtable R.J. (1985): *Actions of Guanidinoethane sulfonate on taurine concentration, retinal morphology and seizure threshold in the neonatal rat.* Neurochem. Int. 7:263-270.
22. Browder LW, Erickson CA, Jeffery WR (1991): Chapter 7; "Laying down the vertebrate body plan: The generation of Ectodermal Organ Rudiments" in *Developmental Biology.* Saunders College Publishing, USA. 242-290.
23. Burger I.H. and Barnett K.C. (1980): *Essenciality of taurine for the cat.* In: Proceedings of the Kal Kan Symposium for the treatment of Dog and Cat Diseases, edited by Wyatt R.L. Vernon C.A: Kal Kan:63-69.
24. Burger I.H. and Barnett K.C. (1982): *The taurine requirement of the adult cat.* J. Small Anim. Pract. 23:533-537.
25. Campistron G., Geffard M. and Bujijs R.M. (1986): *Immunological approach to the detection of taurine and immunocytochemical results.* J. Neurochem. 46:862-868.
26. Chanda R. and Himwich W.A. (1970): *Taurine levels in developing rabbit brain and other organs.* Dev Psychobiol. 3: 191-196.
27. Chan-Palay V., Palay S.L. and Wu J. (1982): *Sagittal cerebellar microbands of taurine neurons: immunocytochemical demonstration by using antibodies against the taurine-synthesizing enzyme cystein sulfonic acid descarboxylase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:4221-4225.
28. Chesney RW (1988): *Taurine: Is it required for infant nutrition?* J. Nutr. 118:6-10.
29. Chesney RW (1985): *Taurine: Its biological role and clinical implications.* In "Year Book Medical Chicago" edited by Barnes LA:1-42.
30. Chesney RW, Gusowski N and Dabbagh S (1987): *Studies on renal adaptation to altered dietary amino acid intake: reduced renal cortex taurine content increase the V_{max} of taurine of uptake by Brush border membrane vesicles.* Pediatr. Nephrol. 1:9-15.
31. Chusid JG (1987): *El Cerebelo, en "Neuroanatomía correlativa y Neurología Funcional".* Ed. El Manual Moderno, México. pp.62-69.
32. Cowan WM (1979): *The development of the brain.* Scientific American. 241,3:69-81.
33. Curtis H. (1986). *Integration and control IV: the brain, in "Biology".* Worth Publishers, Inc. New York. 896-916.
34. Cutler R and Dudzinski DS (1974): *Regional changes in amino acid content in developing rat brain.* J. Neurochem. 23:1005-1009.

35. Datta SC (1988): *Reevaluation of taurine levels and distribution of cysteic acid decarboxylase in developing human fetal brain regions.* J. Neurochem. 50: 999-1002.
36. Datta SC and Mukhrjee KL (1983): *Changes in free amino acid levels in developing human fetal brain regions.* J. Neurochem. 40:1150-1154.
37. Davis JM and Himwich WA (1975): *Amino acids and proteins of developing mammalian brain.* In: "Biochemistry of the Developing Brain, edited by Himwich WA. New York, dekker:55-110.
38. De la Rosa J and Stipanuk MH (1984): *Effect of Guanidinoethan-sulphonate administration on taurine levels in rat dams and their pups.* Nutr. Res. Int. 30:1121-1125.
39. De la Rosa J and Stipanuk MH (1985): *Evidence for a rate-limiting role of cysteinesulfinate decarboxilase activity in taurine biosynthesis in vivo.* Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem.: 81:565-571.
40. De Blas AL and Cherwinski HM (1985): *The development of the Bergmann fiber palisades in the cerebellum of the normal rat and in the Weaver mouse.* Brain Res. 342:234-241.
41. Ejiri K, Akahori S, Kudo K, Sekiba K, Ubuka T (1987): *Effect of guanidinoethylsulfonate on taurine concentrations and fetal growth in pregnant rats.* Biol. Neonate. 51;234-240.
42. Feria-Velasco A., Karnovsky MJ. (1970): *Optima preservación ultraestructural del sistema nervioso central por perfusión intravascular con glutaraldehído.* Arch Invest Med (Méx) 1:201-220.
43. Garcia-Segura LM and Rakic P (1985): *Differential distribution of intramembranous particles in the plasmalemma of the migrating cerebellar granule cells.* Dev. Brain res. 23:145-149.
44. Geisert EE and Stewart AM (1991): *Changing interactions between astrocytes and neurons during CNS maturation.* Dev. Biol. 143:335-345.
45. Gerritsen T and Waisman HA (1968): *The free aminoacids of brain and liver during fetal life of Macaca mulatta.* Proc. Soc. Expe. Biol. Med. 129:542-546.
46. Gombos G, Ghandour MS, Vincendon G, Reeber A and Zanetta JP (1978): *Maturation of Neurotransmission, in "Neurochemistry".* Saint-Vincent, USA: 10-22.
47. Hagberg H, Andersson P, Kjellmer I, Thiringer K and Thordstein M (1987): *Extracellular overflow of glutamate, aspartate, GABA and taurine in the cortex and basal ganglia of fetal lambs during hypoxia-ischemia.* Neurosci. Lett. 78:311-317.
48. Hardison WGM, Wood GA and Proffitt JH. (1977): *Quantification of taurine synthesis in the intact rat and cat liver.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155:55-58.
49. Hayes KC. (1985): *Taurine requirements in primates.* Nutr Rev. 43:65-70.
50. Hayes KC. (1988): *Taurine nutrition.* Nutr. Res. Rev. 1:99-113.
51. Hayes KC. (1988): *Vitamin-like molecules.* In: "Modern Nutrition in health and Disease", editrd by Shils M. and Young V. Philadelphia PA: Lea & Febiger: 464-470.

52. Hayes KC, Rabin AR and Berson EL.(1975):*An ultrastructural study of nutritionally induced and reversed retinal degeneration in cats.*Am.J.Pathol.:505-524.
53. Hayes KC, Stephan ZF and Sturman JA (1980):*Growth depression in taurine-depleted infant monkeys.*J.Nutr.110:2058-2064.
54. Hayes KC and Trautwein EA (1989):*Taurine deficiency syndrome in cats.*Clin.Nutr.19:403-413.
55. Heinonen K.(1975):*Effects of hypothyroidism and thyroxine substitution on the metabolism of L-methionine,L-cystathionine and taurine in developing rats brain.*Acta Endocrinol.80:487-500.
56. Hruska R, Pajen A, Bressler R, Yamamura HI (1978): *Taurine: sodium-dependent, high affinity transport into rat brain synaptosomes.* Molec.Pharmacol.14:77-85.
57. Hudson D, Vernadakis BA and Timiras PS.(1970):*Regional changes in amino acid concentration in the developing rat and the effects of neonatal administration of estradiol.*Brain Res.23:213-222.
58. Huether G and Lajtha A.(1991):*Changes in free amino acid concentrations in serum, brain and CSF throughout embryogenesis.*Neurochem Res.16:145-150.
59. Huxtable RJ.(1976): *Metabolism and function of taurine in the heart.* In:"Taurine" edited by Huxtable RJ and Barbeau A. New York, Raven:99-119.
60. Huxtable RJ.(1992): *Physiological actions of taurine.* Physiol.Rev.72:101-163.
61. Huxtable RJ.(1981): *Sources and turnover rates of taurine in nursing and weaned rat pups.*J.Nutr.111:1275-1286.
62. Huxtable RJ, Sebring LA.(1986): *Towards a unifying theory for the actions of Taurine.*TIPS.7:481-485.
63. Huxtable RJ, Laird II HE and Lippincott SE.(1979):*The transport of Taurine in the heart and rapid depletion of tissue Taurine content by Guanidinoethyl sulfonate.*J.Pharmacol.exp. ther.211,465-471.
64. Huxtable RJ and Lippincott SE (1983):*Relative contribution of the mother, the nurse and endogenous synthesis to the taurine content of the new born and suckling rat.*Ann.Nutr.Metab.27:107-116.
65. Huxtable RJ and Sebring LA (1986): *Towards a unifying theory for the actions of taurine.* TIPS.12:481-485.
66. Ida SK, Kuriyama K, Tomida Y and Kimura H (1987): *Antisera against taurine: quantitative characterization of the anti-body specificity and its application to immunohistochemical study in the rat brain.*J.Neurosci.Res.18:626-631.
67. Imaki H, Moretz RC, Wisniewski HM and Sturman JA (1986): *Feline maternal taurine deficiency: effects on retina and tapetum of the offspring.*Dev.Neurosci.8:160-181.
68. Jacobson SG, Kemp CM, Vorrat F, Chaitin MH and Faulkner DJ (1987): *Rhodopsin topography and rod-mediated function in cats with the retinal degeneration of taurine deficiency.*Exp.Eye Res. 45:481-490.

69. Jacobsen JG and Smith LH (1963): *Comparison of decarboxylation of cysteine sulphinic acid- ^{14}C and cysteic acid- ^{14}C by human, dog and rat liver and brain.* Nature Lond.2:575-577.
70. Jacobsen JG, Thomas LL and Smith LH (1964): *Properties and distribution of mammalian L-cystein sulfinat carboxylases.* Biochem.Biophys.Acta 85:1036-116.
71. Jones DP, Miller LA and Chesney RW (1990): *Adaptive regulation of taurine transport in two continuous renal epithelial cell lines.* Kidney Int.38:219-226.
72. Kaczmarek LK, Agrawal HC and Davison ND (1970): *Biochemical studies of taurine in the developmental rat brain.* (Abstract) Biochem.J.119:45p.
73. Kaczmarek LK, Agrawal HC and Davison ND (1971): *The biochemistry of taurine in developing rat brain in inherited disorders of Sulfur Metabolism,* edited by Carson NAJ and Raine DN London: Churchill Livingstone, 63-69.
74. Karasawa N, Yoshida M, Sakai M, Teramura M and Nagatsu I (1989): *Immunocytochemical studies of taurine- and GABA-like immunoreactive structures in rat cerebellum.* Biog.Amines 3:233-240.
75. Knopf K, Sturman JA, Armstrong M and Hayes KC (1978): *Taurine, an essential nutrient for the cat.* J.Nutr.108:773-778.
76. Korobkin RK and Cutler WP (1977): *Maturation changes of amino acid concentration in cerebrospinal fluid of the rat.* Brain Res.119:181-187.
77. Kontro P, Marnela KM and Oja SS (1984): *GABA, taurine and hipotaurine in developing mouse brain.* Acta Physiol.Scand Suppl. 537:71-71.
78. Lajtha A and Toth J (1973): *Perinatal changes in the free amino acid pool of the brain in mice.* Brain Res.55:238-241.
79. Lake N (1983): *Taurine depletion in lactating rats: effects on developing pups.* Neurochem.Res.8:881-887.
80. Law RO (1989): *Effects of pregnancy on the contents of water, taurine and total amino nitrogen in rat cerebral cortex.* J.Neurochem.53:300-302.
81. Lefauconnier JM, Portmer C and Chatagner F (1976): *Free amino acids and related substances in human glia tumors and in fetal brain: comparison with normal adult brain.* Brain Res.117:105-113.
82. Levi G and Morisi G (1971): *Free amino acids and related compounds in chick brain during development.* Brain Res.26:131-140.
83. Llinás RR (1975): *The Cortex of the cerebellum.* Scientific American. January:56-71.
84. Lu P (1991): *Distribution of taurine-like immunoreactivity in cerebellum of kittens from taurine-supplemented and taurine deficient mothers.* Int.J.Dev.Neurosci.9:621-629.
85. Lu P, Imaki H, Shek J, Schuller-Levis GB and Sturman JA (1990): *Taurine distribution in kitten brain from females fed a diet with or without taurine: a biochemical and immunocytochemical study.* (Abstract).FASEB J.4: A799.
86. Lu P and Sturman JA (1991): *Distribution of taurine, GABA and glutamate in developing cat cerebellum.* Soc.Neurosci.Abstr. 17:1506.
87. Macaione S, Tucci G and Digiorgio RM (1975): *taurine distribution in rat tissues during development.* Ital J.Biochem. Engl.Ed.24: 162-174.

- 88.Madsen S, Ottersen OP and Storm-Mathisen (1985): *Immunocytochemical visualization of taurine: neural localization in the rat cerebellum*. Neurosci. Lett.60:255-260.
- 89.Magnusson KR, Mald JE, Clements JR WU J-Y, Larson AA and Beitz J (1988): *Colocalization of taurine- and cysteine sulfonic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the cerebellum of the rat with monoclonal antibodies against taurine*. J.Neurosci.: 4551-4564.
- 90.Malloy MH, Rassin DK, Gaull GE and Heird WC (1981): *Development of taurine metabolism in beagle pups: effects of taurine-free total prenatal nutrition*. Biol.Neonate 40:1-8.
- 91.Manter JT, Gilman S and Newman WS (1989): *The Cerebellum in "Manter and Gat's Essentials of Clinical Neuroanatomy and Neurophysiology"*.FA Davis Company.Philadelphia.139-160.
- 92.Marnela KM and Kontro P (1984): *Free amino acids and the uptake and binding of taurine in the central nervous system of rats treated with guanidinoethanesulphonate*. Neurosci.12:323-328.
- 93.Morris JG, Rogers QR and Pacioretty LM (1990): *Taurine: an essential nutrient for cats*. J. Small Anim.Pract.31:502-509.
- 94.Moore KL.(1989): Chapter 18.*The Nervous System in "The Developing Human"*.WB Saunders Company.Philadelphia.364-399.
- 95.Novac CR, Damarest RJ.(1975): *The Cerebellum in "The human nervous system"*. Mc Graw Hill Book Co.,USA.223-234.
- 96.Novotny MJ, Hogan PM, Paley DM and Adams HR (1991): *Systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle induced by dietary taurine deficiency in cats*. Am.J.Physiol.255:121-127.
- 97.Oja SS and Piha RS (1966): *Changes in the concentration of free amino acids in the rat brain during postnatal development*.Life Sci.5:865-870.
- 98.Oja SS, UUsitalo Aj, Vahvelainen M and Piha RS (1968): *Changes in cerebral and hepatic amino acids in the rat and guinea pig during development*. Brain Res.11:655-661.
- 99.Okumura S, Otsuki S and Oyama T (1959): *Studies on the free amino acids and related compounds in the brain of fish amphibia, reptile, aves and mammal by ion exchange chromatography*. J.Biochem.46:207-212.
- 100.Okumura S, Otsuki S and Kameyama A (1960): *Studies on free amino acids in human brain*. J.Biochem.47:315-320.
- 101.Ottersen OP (1988): *Quantitative assessment of taurine-like immunoreactivity in different cell types and processes in rat cerebellum: an electron microscopic study based on a postembedding immunogold labelling procedure*. Anat.Embryol.178: 407-421.
- 102.Ottersen OP Madsen S, Storm-Mathisen J, Somogyi P, Scopsi L and Larson L-I (1988): *Immunocytochemical evidence suggests that taurine is colocalized with GABA in the Purkinje cell terminals, but the stellate cell terminals predominantly contain GABA: a light- and electronmicroscopic study of the rat cerebellum*. Exp.Brain Res.72:407-416.

103. Palackal T, Moretz R, Wisniewski H and Sturman J (1986): *Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation.* J. Neurosci. Res. 15:223-239.
104. Palackal T, Moretz R, Wisniewski H and Sturman J (1988): *Ultrastructural abnormalities in the visual cortex of kittens from taurine-deficient mothers.* Brain Dysfunct. 1:71- 89.
105. Palade GE. (1952): *A study of fixation for electron microscopy.* J Exp Med. 95:285.
106. Palo J and Saifer A (1968): *Free amino acids in Tay-Sachs and normal human brain gray matter.* Clin. Chim. Acta 22:327-334.
107. Pasantes-Morales H (1985): *Taurine function in excitable tissues: the retina as a model.* In "Retinal transmitters and modulators: Models for the brain" edited by Morgan WW. Boca Raton, FL: CRC, vol II:33-62.
108. Pasantes-Morales H and Cruz C (1985): *Taurine: a physiological stabilizer of photoreceptor membranes.* In: "Taurine: biological actions and clinical perspectives" edited by Oja SS, Ahtee L, Kontro P and Paasonen MK. New York: Liss:219-231.
109. Pasantes-Morales H, Mapes C, Tapia R and Mandel P (1976): *Properties of soluble and particulate cysteine sulfinatase decarboxylase of the adult and the developing rat brain.* Brain Res. 107:579-589.
110. Pasantes-Morales H, Quesada O, Cárabez A, Huxtable RJ. (1983): *Effects of taurine transport antagonist, guanidinoethylsulfonate and β -alanine on the morphology of rat retina.* J Neurosci Res; 9:135-143.
111. Pastor-Anglada M, Lopez-Tejero D and Remesar X (1987): *Variations in free amino acids in tissues of rats from birth to puberty.* Ann. Nutr. Metab. 31:211-218.
112. Piha RS and Raina H (1975): *Prenatal changes in free amino acid pool of calf brain (Abstract).* Proc. Int. Soc. Neurochem. 5:441.
113. Pion PD, Kittleson MD, Rogers QR and Morris JG (1975): *Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy.* Science Wash. DC 237:764-768.
114. Pion PD, Kittleson MD, Rogers QR and Morris JG (1990): *Taurine deficiency myocardial failure in domestic cat.* In: "Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology and Cardiology" edited by Pasantes-Morales H, Martin DL, Shain W and Martin del Rio R. New York: Wiley-Liss:423-430.
115. Pion PD, Sturman JA, Rogers QR, Kittleson MD, Hayes KC and Morris JG (1988): *Feeding diets that lower plasma taurine (TAU) concentrations causes reduced myocardial mechanical function in cats (Abstract).* FASEB J. 2:A1617.
116. Rackic P. (1983): *Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electromicroscopic study in Macacus rhesus.* J Comp Neuro: 141:283-312.
117. Rackic P. (1990): *Principles of neural cell Migration.* Experientia. 46:882-891.
118. Rana SK, Sanders TBA. (1986): *Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegetarians compared with omnivores.* Br J Nutr. 56:17-27.

119. Rassin DK, Sturman JA and Gaull GE (1977): *Taurine in milk: species variation (Abstract)*. *Pediatr. Res.* 11:463.
120. Rassin DK, Sturman JA and Gaull GE (1978): *Taurine and other free amino acids in milk of man and other mammals*. *Early Hum. Dev.* 2:1-13.
121. Roberts E, Frankel S and Harman PJ (1950): *Amino acids in nervous tissue*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74:383-387.
122. Roberts E, Lowe IP, Guth L and Jelinek B (1958): *Distribution of β -aminobutyric acid and other amino acids in nervous tissue of various species*. *J. Exp. Zool.* 138:313-328.
123. Roffler-Tarlov S and Turey M (1982): *The content of amino acids in developing cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei of granule cell deficient mutant mice*. *Brain Res.* 247:65-73.
124. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. (1963): *Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation*. *J Cell Biol.* 17:19.
125. Schmidt SY, Berson EL, Hayes KC. (1976): *Retinal degeneration in cats fed caseine. I. Taurine Deficiency*. *Invest Ophthalmol.* 15: 47-57.
126. Schuller-Levis G, Metha PD, Rudelli R and Sturman J (1990): *Immunologic consequences of taurine deficiency in cats*. *J. Leukocyte Biol.* 47:321-331.
127. Schuller-Levis GB and Sturman JA (1990): *Evaluation of immunity in taurine-deficient cats*. In: "*Taurine: Functional Neurochemistry, physiology and Cardiology*" edited by Pasantes-Morales H. New York: Wiley-Liss:431-438.
128. Saffer JE and Kocsis JJ (1981): *Taurine mobilizing effects of beta alanine and other inhibitors of taurine transport*. *Life Sci.* 28:2727-2736.
129. Smith DE and Downs I (1978): *Postnatal development of the granule cell in the kitten cerebellum*. *Am. J. Anat.* 151:527-537.
130. Somjen GG (1986): *El Cerebelo, en "Neurofisiología"*. Ed. Panamericana, Buenos Aires. pp.391-418.
131. Stratton DB (1984): *Cerebelo, en "Neurofisiología"*. Ed. Limusa, México. pp.309-326.
132. Sturman JA. (1981): *Cysteinesulfonic acid descarboxylase activity in the mammalian nervous system: absence from axons*. *J. Neurochem.* 36:304-306.
133. Sturman JA. (1986): *Nutritional taurine and central nervous system development*. *Ann. NY Acad. Sci.* 477:196-213.
134. Sturman JA. (1981): *Origin of taurine in developing rat brain*. *Dev. Brain Res.* 2:111-128.
135. Sturman JA. (1988): *Taurine in development*. *J Nutr.* 118:1169-76.
136. Sturman JA. (1993): *Taurine in development*. *Physiol. Rev.* 73: 119-147.
137. Sturman JA. (1979): *Taurine in developing rat brain: changes in blood-brain barrier*. *J. Neurochem.* 32:811-816.
138. Sturman JA. (1979): *Taurine in the developing rabbit visual system: changes in concentration and axonal transport including a comparison with axonally transported proteins*. *J. Neurobiol.* 10: 221-237.
139. Sturman JA. (1983): *Taurine pool sizes in the rat: effects of vitamin B6 deficiency and high taurine diet*. *J. Nutr.* 103:1566-1580.

140. Sturman JA, Gargano AD, Messing JM and Imaki H (1986): *Feline maternal taurine deficiency: effect on mother and offspring*. J.Nutr.116:655-667.
141. Sturman JA and Gaull GE (1975): *Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey*. J.Neurochem.25:831-835.
142. Sturman JA, Lin YY, Higuchi T and Fellman JH (1985): *N- acetylneuramin lactose sulfate: a newly identified nutrient in milk*. Pediatr.Res.19:216-219.
143. Sturman JA and Messing JM (1991): *Dietary taurine content and feline reproduction and outcome*. J.Nutr.121:1195-1203.
144. Sturman JA and Messing JM (1991): *High dietary taurine effects on feline tissue taurine concentrations and reproductive performance*. J.Nutr.122:82-88.
145. Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM: *Postnatal taurine deficiency in the kitten results in a persistence of the cerebellar external granule cell layer: correction by taurine feeding*. J Neurosci Res;13:521-528.
146. Sturman JA, Moretz RC, French JH and Wisniewski HM.(1985): *Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the external granule cell layer*. J Neurosci Res;13:405-416.
147. Sturman JA, Palackal T, Imaki H, Moretz RC, French J and Wisniewski HM (1987): *Nutritional taurine deficiency and feline pregnancy and outcome*.In: "The Biology of taurine" edited by Huxtable RJ, Franconi F and Giotti A: New York,Plenum:113-124.
148. Sturman JA, Rassin DK and Gaull GE (1989): *Taurine in development: is it essential in the neonate? (Abstract)*. Pediatr.Res.10:415.
149. Sturman JA, Rassin DK and Gaull GE (1976): *Taurine in developing rat brain: transfer of [³⁵S] taurine to pups via the milk*. Pediatr.Res.11:28-33.
150. Sturman JA, Rassin DK and Gaull GE (1977): *Taurine in developing rat brain: maternal-fetal transfer of [³⁵S] taurine and its fate in the neonate*. J.Neurochem.28:31-39.
151. Sturman JA, Rassin DK and Gaull GE (1977): *Taurine in development*. Life Sci.21:1-22.
152. Sturman JA, Rassin DK and Gaull GE (1978): *Taurine in the development of the central nervous system*. In:"Taurine and neurological disorders" edited by Barbeau A and Huxtable RJ. New York, Raven: 49-71.
153. Sturman JA, Rassin DK, Gaull GE and Cote LJ (1980): *Taurine in developing rhesus monkey brain*. J.Neurochem.35:304-310.
154. Sturman JA, Wen GY, Wisniewski HM, Neuringer MD.(1984): *Retinal regeneration in primates raised on a syntetic human infant formula*. Int J Dev Neurosci;2:121-129.
155. Sturman JA, Wen GY, Wisniewski HM, Niemann WH and Hayes KC (1982): *Taurine and tapetum structure*.In:"Taurine in nutrition and Neurology" edited by Huxtable RJ and Pasantes-Morales H. New York, Plenum:65-78.
156. Thoemke F and Huether G (1984): *Breeding rats on amino acid imbalanced diets for three consecutive generations affects the concentrations of putative amino acids transmitters in the developing brain*. Int.J.Dev.Neurosci.2:567-574.

157. Timiras PS, Hudson DB and Iklund S (1973): *changes in central nervous system free amino acids with development and aging*. Prog. Brain Res. 40:267-275.
158. Trenkner E (1990): *The role of taurine and glutamate during early postnatal cerebellar development of normal and weaver mutant mice*. Adv. Exp. Med. Biol. 268:239-244
159. Trenkner E (1991): *The role of taurine in the survival and function of cerebellar cells in cultures of early postnatal cat*. J Dev. Neurosci. 9:77-88.
160. Trenkner E (1987): *Neuron-glia interaction controls cerebellar granule cell maturation with glutamate-aurine interplay*. Soc. Neurosci. Abstr. 13:115.
161. Trenkner E (1987): *The role of taurine and glutamate during early postnatal cerebellar development*. In: "Excitatory Amino Acids and Neuronal Plasticity" edited by Ben-Ari Y. New York, Plenum:239-244.
162. Trenkner E and Sturman JA (1991): *The role of taurine in the survival and function of cerebellar cells in cultures of early postnatal cat*. Int. J. Dev. Neurosci. 9:77-88.
163. Volpe JJ and Laster L (1970): *Trans-sulphuration in primate brain: regional distribution of cystathionine synthase, cystathionine and taurine in the brain of rhesus monkey at various stages of development*. J. Neurochem. 17:425-437.
164. Walz W (1989): *Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment*. Prog. Neurobiol. 33:309-333.
165. Wen GY, Sturman JA, Wisniewski HM. (1979): *Tapetum disorganization in taurine depleted cats*. Invest Ophthalmol Vis Sci; 18:1201-1206.
166. Wolff NA, Perlman DF and Goldstein L (1986): *Ionic requirements of peritubular taurine transport in Fundulus kidney*. Am. J. Physiol. 250:984-990.
167. Worden J and Stipanuk MH (1985): *A comparison by species, age and sex of cysteinesulfinate decarboxylase activity and taurine concentration in liver and brain of animals*. Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. 82:233-239.
168. Yan-lun Chou. (1977): *Cap 10: Distribuciones CHI cuadrado, F y t de student en "Análisis estadístico"*. Editorial Interamericana. México. 282-284.
169. Yoneda Y and Kuriyama K (1978): *A comparison of microdistributions of taurine and cysteine sulphinate decarboxylase activity with those of GABA and L-glutamate decarboxylase activity in rat spinal cord and thalamus*. J. Neurochem. 30:821-825.
170. Yoshida M, Teramura M, Karasawa N, Sakai M and Nagatsu I (1987): *Immunohistochemistry of taurine and GABA in serial brain sections of the rat*. Biog. Amines. 4:135-144.
171. Ziyadeh FN, Feldman GM, Booz GW and Kleinzeller A (1988): *Taurine and cell volume maintenance in the shark rectal gland: cellular fluxes and kinetics*. Biochim. Biophys. Acta. 943:43-52.