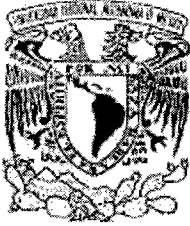


00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

*PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FACILITACIÓN  
DE LA MUERTE NEURONAL EXCITOTÓXICA DURANTE LA  
INHIBICIÓN GLICOLÍTICA*

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

JANA AYLIM MEJÍA TOIBER

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

MÉXICO, DF.

NOVIEMBRE, 2005

m. 352190



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/0598/05

ASUNTO: Asignación de Sinodales

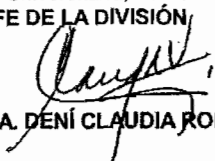
**DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO**  
Presente.

Por este conducto me permito comunicarle como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) **JANA AYLIM MEJÍA TOIBER**, quién desarrolló el Trabajo de Tesis titulado "Participación del estrés oxidativo en la facilitación de la muerte neuronal excitotóxica durante la inhibición glicolítica.", que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 26 de septiembre del año en curso, asignó a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado tiene los méritos para obtener el grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**:

PRESIDENTE	DR.	JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL	DR.	ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ
SECRETARIO	DRA.	LOURDES MASSIEU TRIGO
SUPLENTE	DRA.	GABRIELA MORALI DE LA BRENA
SUPLENTE	DRA.	MILAGROS MÉNDEZ-UBACH

En espera de su pronta respuesta, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÉ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D. F. 27 de septiembre del 2005  
JEFE DE LA DIVISIÓN

  
DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS

DCRVASRigr\*

FACULTAD DE CIENCIAS



DIV. EST. POSGRADO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jana Aylim Mejía Toiber  
FECHA: 24 Nov 05  
FIRMA: Jana A. Toiber

**Este trabajo se realizó con el apoyo financiero, de CONACYT al proyecto con clave 40306-M, y de PAPIIT (IN222503).**

**Adicionalmente, este trabajo se realizó con la beca que me fue otorgada de CONACYT (182421) y con la beca DGEP.**

**Finalmente agradezco al apoyo y asesoría, del siguiente del comité tutorial:**

**Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo**

**Dra. Milagros Méndez Ubach**

**Dr. Rolando Hernández Muñoz**

---

## AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, Martha y Hugo por su apoyo constante y cariño. A mi padre que es capaz, a la fecha, de responder cualquier pregunta, de cualquier tema. A mi mamá por sus sabios consejos.

A mis hermanos, Jayim Pabel y Hugo Saíd, porque he contado con su apoyo incondicional en todo momento.

A Jorge Posadas, es sorprendente lo que se puede lograr cuando dos personas se aman. Te estaba esperando.....

A Rosita Mejía, a Elida V. M., Paty B. M., y Edgar M., Shoshy y Esther T. por el interés en todo este proceso, por mostrarme su interés y apoyo.

Pamela, por su cariño y amistad. Eres la hermana que necesitaba tener, te quiero mucho.

Martha y Giovanni por aceptarme y quererme así como estoy, llena de defectos.

A Miki, por los años de amistad

Arturo Valle, gracias por todo, eres muy importante para mí.

A mis colegas que han tenido buen oído y corazón para mí, a Gaby Orozco, Cesar Casasola, Nadia Robles, Frida Loria, Raúl M. Del Campo, Jahir, Edy, Rayo, y Alejandra Ruiz.

A Psinapsis, con quienes he pasado momentos académico-afectivos imborrables. Zeidy, Corinne, Fabiola, Angie, Paty Trejo, Paty Cruz, Arminda, Natalia.

A mis compañeros de laboratorio: Ana, Alberto, Octavio, Karla, Perla, Mari, y los anexos, Oscar Galicia y Silvana, a CECI y a los chavos del instituto: Gaby Mora, Gaby Vera, Luis, Miguel, Adrián, Rogelio, Luis y a Benito, por esos momentos de apoyo, a todos, ¡muchas gracias!

---

A los sinodales, el Dr. Pedraza, la Dra. Morali, la Dra. Milagros Méndez y el Dr. Rolando Hernández, por el tiempo invertido en la lectura y desarrollo de este trabajo y su amabilidad en las correcciones de la tesis.

A Teresa Montiel por su asesoría técnica y por que todos los dolores de cabeza que le cause, finalmente tuvieron un producto, que es esta tesis.

Un muy especial agradecimiento a la Dra. Massieu, quien invirtió horas de trabajo en mi formación y en todo el desarrollo de este proyecto, quién me ha dado esos años, llenos de enseñanzas que no se olvidan, porque son los primeros.

---

RESUMEN .....	7
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	8
1. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA .....	10
2. EXCITOTOXICIDAD .....	16
3. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO .....	19
3.1 Cuerpos cetónicos y su papel como sustratos alternativos a la glucosa en el cerebro .....	22
4. ESTRÉS OXIDATIVO .....	27
4.1 Efecto de la vitamina E en la muerte neuronal .....	30
<i>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i> .....	31
<i>II. HIPÓTESIS</i> .....	31
<i>III. OBJETIVOS</i> .....	31
1.0 Objetivo General .....	31
2.0 Objetivos Particulares .....	32
<i>IV. METODOLOGÍA</i> .....	32
1.0 Animales y Condiciones Generales .....	32
2.0 Materiales .....	33
3.0 Tratamientos .....	33
4.0 Cirugía .....	34
5.0 Histología .....	35
6.0 Determinación de la actividad de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa .....	35
7.0 Determinación de los niveles de ATP .....	37
8.0 Determinación de la lipoperoxidación .....	38
9.0 Análisis estadístico .....	39
<i>V. RESULTADOS</i> .....	39
1.0 Observaciones macroscópicas .....	39
2.0 Actividad de la enzima GADPH .....	39
3.0 Observaciones histológicas y volumen de lesión .....	42
4.0 Niveles de ATP .....	48
5.0 Lipoperoxidación .....	49
<i>VI. DISCUSIÓN</i> .....	53
<i>VII. CONCLUSIONES</i> .....	60
<i>VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</i> .....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>3-NP</b>	ácido 3-nitropropiónico
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4- propionato
<b>AVC</b>	accidentes vasculares cerebrales
<b>BHB</b>	$\beta$ - hidroxibutirato
<b>CC</b>	cuerpos cetónicos
<b>EAAT</b>	transportador de aminoácidos excitadores
<b>ERO</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GADPH</b>	gliceraldehído 3–fosfato deshidrogenasa
<b>GLAST</b>	transportador de glutamato/aspartato
<b>GLT-1</b>	transportador de glutamato 1
<b>GLU</b>	glutamato
<b>i.p</b>	intraperitoneal
<b>i.v</b>	intravenoso
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
<b>IOA</b>	yodoacetato
<b>MGlur</b>	receptores metabotrópicos de glutamato
<b>MK-801</b>	maleato de dizocilpina
<b>MPP+</b>	1-metil-4-fenilpiridina
<b>MPT</b>	poro de transición de permeabilidad mitocondrial
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PCr</b>	fosfocreatina
<b>SNC</b>	sistema nervioso central



## RESUMEN

La muerte neuronal excitotóxica se ha asociado con patologías como la isquemia cerebral y con algunas enfermedades neurodegenerativas como las del Huntington, Alzheimer y Parkinson. Este tipo de muerte neuronal ocurre debido a la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos e involucra la producción de especies reactivas de oxígeno. Se conoce que la falla en el metabolismo energético es un factor que facilita la muerte neuronal excitotóxica. En el presente trabajo, se demostró que el tratamiento crónico con el inhibidor glucolítico, yodoacetato (IOA), inhibe en una forma progresiva y parcial a la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en un 45% de su actividad en el estriado de la rata, lo cual sugiere una alteración metabólica. Por otra parte, se demostró que el daño mediado por el glutamato en el estriado de la rata se incrementa al doble cuando las ratas son pretratadas por tres días con el IOA. Además, esta lesión se previno en un 75% con el tratamiento con MK-801, un antagonista de los receptores glutamatérgicos, lo cual sugiere que la activación de los receptores de tipo NMDA está involucrada de manera importante en este tipo de muerte. También se demostró que la muerte neuronal en dichas condiciones es prevenida por sustratos metabólicos como el  $\beta$ -hidroxibutirato, un cuerpo cetónico que disminuye en un 62% el volumen de lesión. Por otra parte, la administración de vitamina E disminuye en un 58% el volumen de lesión, sugiriendo la participación del estrés oxidativo. La inyección de glutamato ( $1 \mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ) en el estriado produce 3 h después de su administración un incremento de los niveles de malondialdehído, considerado como un índice de lipoperoxidación, aunque éste decae a lo largo del tiempo. Esto sugiere la presencia de daño membranal por estrés oxidativo. Además, encontramos que la exacerbación de la muerte excitotóxica durante la inhibición glucolítica está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno después de la inyección de glutamato, ya que se detectó un incremento en la lipoperoxidación desde las 3h que se mantiene durante las siguientes 24 h. Finalmente, la lipoperoxidación puede ser prevenida por la administración de  $\beta$ -hidroxibutirato ( $500 \mu\text{mol}$ , i.v.) y de vitamina E ( $100 \text{ mg/kg/día}$  X 7 días). Los resultados sugieren que la facilitación de la muerte excitotóxica inducida por la alteración en el metabolismo energético involucra el estrés oxidativo, y que el mantenimiento del equilibrio energético puede prevenirlo.

## INTRODUCCIÓN

El cerebro es un órgano que exige una alta demanda de glucosa y oxígeno para mantener el funcionamiento celular adecuado (Clarke y Sokoloff, 1999). Es necesario aproximadamente un 20% del consumo total de oxígeno corporal para mantener tan sólo 1.3 kg de peso cerebral.

Padecimientos como los accidentes cerebrales vasculares (AVC), ponen en riesgo la sobrevivencia celular como resultado del suministro deficiente de oxígeno y glucosa al cerebro. La isquemia cerebral ocurre por la interrupción de manera abrupta del flujo sanguíneo cerebral de una arteria; el más frecuente de estos trastornos es la isquemia cerebral focal. Esta interrupción puede ser causada por la oclusión de una arteria cerebral, frecuentemente de la arteria cerebral media, de manera permanente o transitoria a causa de un émbolo o trombosis local (Dirnagl *et al.*, 1999) (Fig. 1).

La viabilidad del tejido irrigado por dicha arteria queda amenazada, distinguiéndose en éste, el foco y la penumbra isquémica. En el foco isquémico la irrigación sanguínea se suspende completamente, ya que el suministro sanguíneo en esta zona depende exclusivamente de la arteria ocluida. Por otro lado, el tejido que rodea al foco isquémico, conocido como penumbra isquémica, se diferencia del anterior por contar con irrigación de arterias colaterales, por lo que su metabolismo energético se encuentra parcialmente preservado (Dirnagl *et al.*, 1999). En el primero, las células mueren en minutos, debido al cese total de flujo sanguíneo, mientras que la integridad celular en la zona de penumbra puede reestablecerse si se aplica oportunamente algún tratamiento. De lo contrario, ésta podría convertirse en tejido infartado (Dirnagl *et al.*, 1999).

Los AVC son la primera causa de incapacidad en los países industrializados, y representan el 10% del número total de muertes. Además, son la tercera causa de muerte en el mundo, razón por la cual generan altos costos sociales y económicos. En nuestro país los accidentes vasculares cerebrales son la sexta causa de muerte de acuerdo al INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2001).

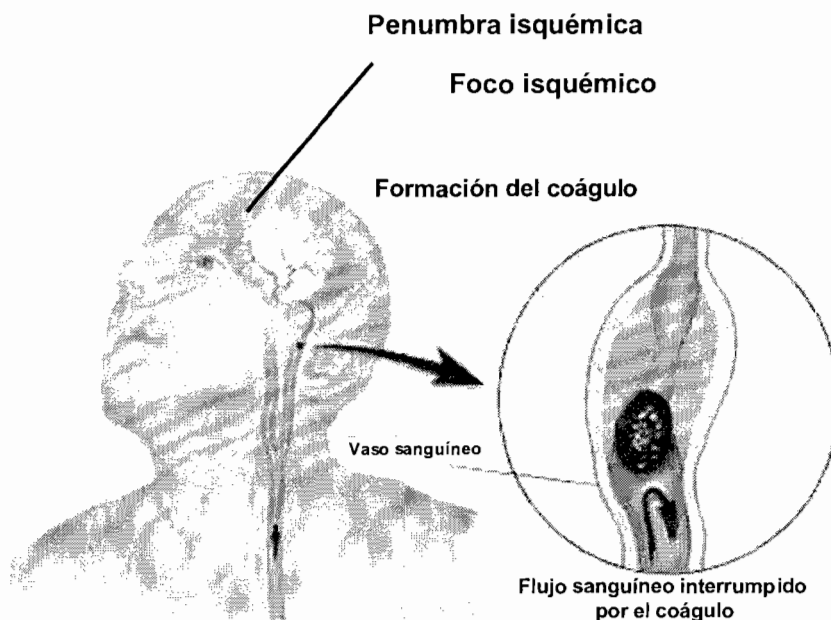


Fig. 1. Isquemia cerebral focal. Esta alteración neurológica ocurre de manera abrupta por la oclusión de una arteria, interrumpiendo el flujo sanguíneo cerebral; la oclusión puede deberse a la formación de un coágulo. En el tejido afectado se puede distinguir el foco y la penumbra isquémica. En el foco isquémico el flujo sanguíneo se interrumpe completamente; en tanto que, la penumbra isquémica cuenta con irrigación de arterias colaterales.

Las secuelas que sufren del 20 al 30% de los sobrevivientes a este tipo de desórdenes neurológicos los incapacitan para realizar sus actividades cotidianas. A manera preventiva, se han identificado los factores de riesgo asociados con la aparición de los AVC, como son la arteroesclerosis, la hipertensión, la obesidad, los niveles altos de colesterol y el consumo de tabaco o alcohol. Sin embargo, una vez presentado el trastorno, es fundamental reducir el tiempo en que la persona recibe atención médica para disminuir las secuelas derivadas del daño celular. En la actualidad existen pocas estrategias terapéuticas capaces de detener el proceso neurodegenerativo desencadenado durante un episodio isquémico. En primera instancia, se ha aprobado el uso de activadores de plasminógeno, que disgregan el coágulo formado y restauran el flujo sanguíneo cerebral (Lo *et al.*, 2003). Por otro lado, se han probado compuestos que previenen la

neurodegeneración al interferir con algunos mecanismos de daño inducidos por la isquemia, como son los bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la hipotermia entre otros (Hara *et al.*, 1993), aunque los resultados en los pacientes no son totalmente favorables.

Existe evidencia de que la muerte neuronal asociada a la isquemia cerebral ocurre en gran medida a través de un proceso excitotóxico, el cual se produce por la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos. Se han descrito varios factores relacionados con este proceso neurodegenerativo, como son: (1) la elevación en los niveles de glutamato (GLU) extracelular, y como consecuencia, la activación de sus receptores, dando lugar a la pérdida de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y a la activación de diversos procesos que contribuyen al daño celular (ver adelante), (2) la alteración en el metabolismo energético, y (3) los dos eventos anteriores pueden desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno.

Debido a la importancia que se le ha dado al GLU en la muerte neuronal, se describirá brevemente la neurotransmisión glutamatérgica, y en los siguientes capítulos se describirá la participación del metabolismo energético y de las especies reactivas de oxígeno en la muerte neuronal excitotóxica. Finalmente, se describirán los hallazgos acerca de la utilización de los cuerpos cetónicos como sustratos energéticos en el cerebro, y de la vitamina E, como antioxidante, en la prevención

de la muerte neuronal de tipo excitotóxica en condiciones de deficiencia energética.

## **1. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA**

En 1897 Sherrington acuñó por vez primera el término “sinapsis” para referirse al sitio especializado en la intercomunicación neuronal. En ésta, se puede diferenciar el componente presináptico, encargado de transmitir la información, y el componente encargado de recibirla, llamado postsinapsis (Holz y Fisher, 1999).

La comunicación sináptica de tipo químico se realiza a través de sustancias neurotransmisoras, entre las que se encuentran los aminoácidos excitadores,

como el aspartato y el GLU. Este último se considera como el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC). Las propiedades excitadoras del GLU fueron descritas por Curtis y cols. en 1959, al observar su efecto despolarizante en neuronas de la médula espinal de gatos.

El GLU como muchos otros neurotransmisores se almacena en vesículas localizadas en la presinapsis. Éste es liberado al espacio sináptico cuando al llegar el potencial de acción a la terminal nerviosa, y cambiar el potencial membranar, se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de este catión al interior celular. Una vez dentro, el  $\text{Ca}^{2+}$  provoca la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, permitiendo la liberación del neurotransmisor por exocitosis (Fig. 2) (Dingledine y McBain, 1999). Las concentraciones de GLU en el espacio sináptico fluctúan entre 2-5  $\mu\text{mol/l}$ , pero pueden llegar a alcanzar los 50-100  $\mu\text{mol/l}$  después de la despolarización celular (Daikhin *et al.*, 2000).

En el espacio sináptico, el GLU estimula receptores anclados en la membrana postsináptica. Estos comprenden dos grandes grupos: los ionotrópicos y los metabotrópicos (Fig. 2). Los receptores ionotrópicos son por sí mismos un canal permeable a iones, y se encuentran conformados por cinco subunidades distintas, cada una de las cuales presenta tres segmentos transmembranales, y el segundo que no cruza la membrana, pero sí se introduce en ésta (Dingledine y McBain, 1999).

Los receptores se han clasificado de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y sus nombres concuerdan con los agonistas que los activan. Así encontramos a los que muestran afinidad por el N-metil-D-aspartato (NMDA) y los que no muestran esta afinidad, llamados no-NMDA, pero que son sensibles al  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4-propionato (AMPA) y al kainato. Todos ellos son activados por GLU, que es el ligando endógeno.

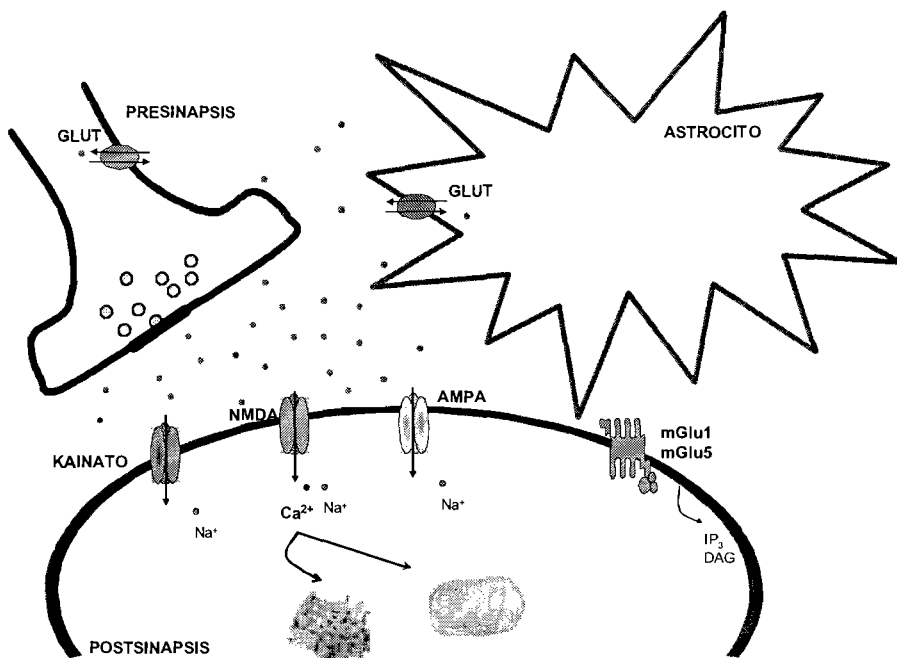


Fig. 2. Neurotransmisión glutamatérgica. El GLU es liberado por exocitosis de la presinapsis. En el espacio sináptico el GLU activa receptores ionotrópicos de tipo NMDA que permiten el paso del  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, a los AMPA/kainato que permiten el paso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y a los receptores de tipo metabotrópico (por ejemplo, el mGlu 1, mGlu 5) que activan cascadas de segundos mensajeros, como el  $\text{IP}_3$  y el DAG. Los transportadores de GLU (GLUT) finalizan la neurotransmisión al capturar a este aminoácido en el interior del astrocito o directamente en la presinapsis para su posterior reciclamiento. El incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es regulado por el retículo endoplásmico y por la mitocondria.

Los receptores AMPA-kainato se activan rápidamente (1-4 msec) ante la presencia del GLU y permanecen abiertos por un periodo corto de tiempo (2-14 msec). Una vez activado el receptor, los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y en algunos casos el  $\text{Ca}^{2+}$ , pueden introducirse a través del canal hasta el interior celular, esto último dependiendo de las subunidades que compongan al receptor (Greene y Greenamyre, 1996). Los receptores de tipo no-NMDA muestran una conductancia total de 7-30pS. En contraparte, los receptores de tipo NMDA permanecen abiertos durante más tiempo (100-300 msec) y se activan más lentamente ya que este receptor contiene en su canal un ión  $\text{Mg}^{2+}$  que sólo es liberado como resultado de la despolarización de la membrana. Aunado a la dependencia de voltaje de la

liberación del ión  $Mg^{2+}$ , es fundamental la presencia del coagonista, glicina, de las poliaminas y del  $Zn^{2+}$  para que su activación se lleve a cabo. Esto indica que la activación de este receptor se encuentra altamente regulada (Greene y Greenamyre, 1996). La diferencia fundamental entre este tipo de receptores y los receptores no-NMDA es su alta permeabilidad al ión  $Ca^{2+}$ , que puede llegar a ser hasta 70 veces mayor que la de los receptores no-NMDA (Mayer *et al.*, 1989), y que además muestran una conductancia total de alrededor de 45-50 pS (Michaelis, 1998).

Cabe mencionar que el incremento de  $Ca^{2+}$  citosólico después de la activación de los receptores glutamatérgicos es regulado rápidamente por el retículo endoplásmico (Paschen y Doutheil, 2000) y por la mitocondria, los cuales tienen la capacidad de capturar este catión (Vandecasteele *et al.*, 2001) (Fig. 2).

Por otro lado, los receptores glutamatérgicos metabotrópicos tienen siete dominios transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G que activan cascadas de segundos mensajeros. En la actualidad se han identificado tres grupos (Bittigau e Ikonomidou, 1997).

Los mGluR1 y mGluR5 forman parte del Grupo I; éstos activan a la fosfolipasa C aumentando la concentración de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y del 1,2-diacilglicerol (DAG), al hidrolizar fosfolípidos presentes en la membrana como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ). El  $IP_3$ , a través de la activación de su receptor en el retículo endoplásmico, induce la liberación de  $Ca^{2+}$  de este organelo. El DAG a su vez activa a la proteína cinasa C, que fosforila proteínas presentes en la membrana (Bittigau e Ikonomidou, 1997).

Los mGluR2 y los mGluR3, pertenecen al Grupo II y se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa y de esta forma reducen la cantidad de AMPc intracelular al igual que los mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8 que forman parte del Grupo III (Bittigau e Ikonomidou, 1997).

---

Por otra parte, el sistema de recaptura del GLU regula las concentraciones de este aminoácido en el espacio sináptico finalizando con la neurotransmisión (Anderson y Swanson, 2000). Este sistema se encuentra conformado por transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$ . Hasta ahora se conocen cinco subtipos de transportadores de GLU (GLUT) clasificados por su distribución en el SNC y su localización en las células (Fig. 2). Los de tipo GLAST, denominados EAAT1 en el humano, se distribuyen en regiones de todo el cerebro, y se localizan principalmente en astrocitos. Por su parte, los de tipo GLT-1, se denominan como EAAT2 en el humano, se encuentran en su mayoría localizados en astrocitos, aunque también se han encontrado en neuronas (Anderson y Swanson, 2000). Los EAAC, denominados EAAT3 en el humano, se localizan en neuronas (Kanai, 1997). Los EAAT4 se presentan en las células de Purkinje del cerebelo y por último los EAAT5 se localizan en las células de la retina (Balcar, 2002).

Como se mencionó, los transportadores dependen para su funcionamiento del mantenimiento del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  que utilizan como fuerza motriz para transportar al interior celular cada molécula de GLU, con dos o tres iones de  $\text{Na}^+$ , y en contraparte un ion de  $\text{K}^+$  es transportado al espacio sináptico (Kanai, 1997).

La célula reutiliza al neurotransmisor, a través del ciclo glutamato-glutamina. Esto ocurre cuando el GLU que entra a los astrocitos es convertido en glutamina por la vía de la glutamina sintetasa, o bien es exportado a los vasos sanguíneos interrumpiendo el ciclo. Ya que ocurre la conversión a glutamina, se libera y es capturada por la neurona presináptica. Finalmente, la glutamina capturada se hidroliza a GLU y amonio por acción de la glutaminasa (GS) dependiente de fosfato y así finaliza el ciclo (Magistretti, 1999).

Por otro lado, es conocida la capacidad de las células de abastecer sus necesidades energéticas a través del GLU. Cuando el GLU entra a los astrocitos, la aspartato aminotransferasa (AST) transfiere un  $\alpha$ -amino del GLU al oxalacetato formando  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG) y aspartato (Magistretti, 1999). El  $\alpha$ KG formado es un sustrato del ciclo de Krebs, que puede finalmente generar energía.



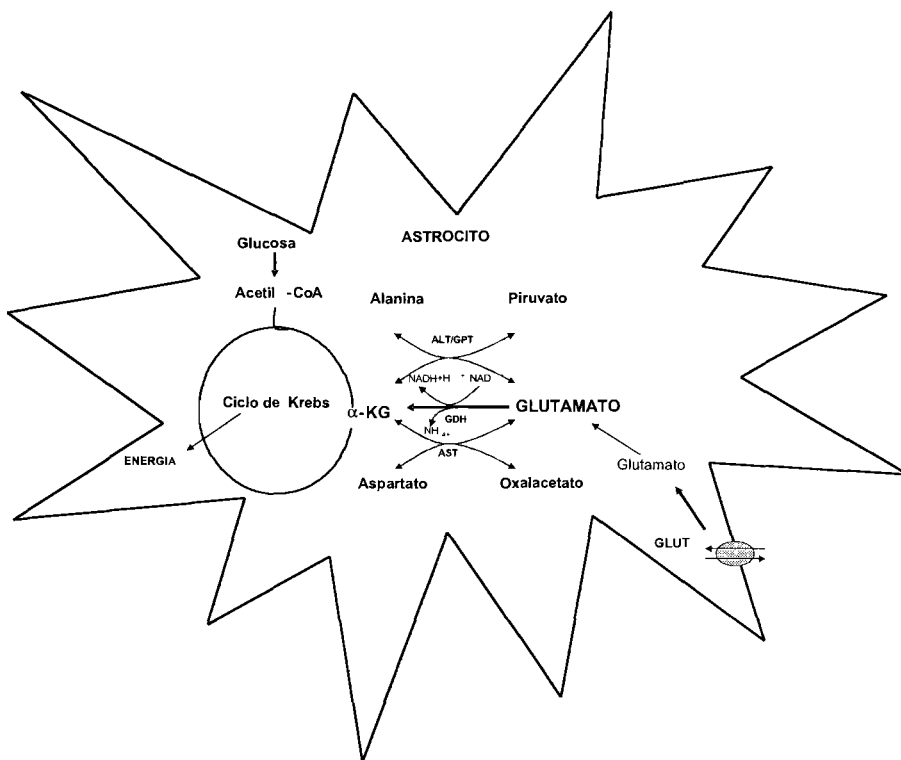


Fig. 3. Metabolismo del GLU en los astrocitos. El GLU puede ser utilizado como sustrato metabólico para abastecer las necesidades energéticas celulares. Cuando el GLU entra directamente a los astrocitos, a través de sus transportadores (GLUT), la aspartato aminotransferasa (AST) transfiere un  $\alpha$ -amino del GLU al oxalacetato para formando  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG) y aspartato. El  $\alpha$ KG formado es un sustrato del ciclo de Krebs que produce energía. Adicionalmente, el GLU puede convertirse directamente en  $\alpha$ KG a través de una reacción de desaminación catalizada por la GLU deshidrogenasa (GDH). Finalmente el GLU puede convertirse indirectamente en  $\alpha$ KG al transferirse un  $\alpha$ -amino al piruvato, formando alanina, esta reacción es catalizada por la alanina aminotransferasa (ALT).

En los astrocitos existen otras dos vías para metabolizar al GLU. En la primera, el GLU se convierte directamente en  $\alpha$ KG a través de una desaminación catalizada por la GLU deshidrogenasa (GDH). Para que esta reacción se lleve a cabo se requiere de  $\text{NAD}^+$ . Finalmente, el GLU puede indirectamente convertirse en  $\alpha$ KG

cuando la alanina aminotransferasa (ALT) transfiere el  $\alpha$ -amino del GLU al piruvato, formando alanina y  $\alpha$ KG (Magistretti, 1999) (Fig. 3).

El GLU puede sintetizarse a través de la reacción que requiere de la aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato por acción de GDH la cual utiliza NADH (Magistretti, 1999).

## 2. EXCITOTOXICIDAD

El GLU es el aminoácido excitador más ampliamente distribuido en el SNC, y se encuentra implicado en funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria, y paradójicamente en condiciones patológicas como la epilepsia, la isquemia y la hipoglucemia (Dugan y Choi, 199).

El GLU fue en la antigüedad utilizado como saborizante de alimentos y se le consideró como el quinto sabor básico llamado "umami". Además, diversos productos comestibles como los tomates, el pescado y productos lácteos lo contienen. Sin embargo, su consumo se ha relacionado con síntomas como debilidad general, taquicardia y migraña, que engloban lo que se conoce como el síndrome del "restaurante Chino". Cabe mencionar que existen diversos reportes con resultados discrepantes, por lo que la relación causa-efecto del consumo de GLU y la aparición del síndrome del "restaurante Chino" es controversial (Geha *et al.*, 2000).

Por otro lado, la neurotoxicidad en los adultos, generada por un consumo excesivo de GLU en los alimentos es improbable, ya que el cerebro se encuentra protegido por la barrera hematoencefálica del aporte de dicho aminoácido. Sin embargo desde 1957, Lucas y Newhouse reportaron por vez primera la propiedad tóxica del GLU en células de la retina (Olney, 1969). Posteriormente, Olney (1969)

observó neurodegeneración en ratas neonatas después de la administración de GLU, en regiones cerebrales donde la barrera hematoencefálica todavía no estaba formada. Dadas las propiedades excitadoras y tóxicas del GLU y sus análogos se acuñó el término excitotoxicidad, y se define clásicamente como la neurodegeneración producida por la estimulación excesiva de los receptores postsinápticos glutamatérgicos.

Un ejemplo de esto es el caso de la isquemia y de la hipoglucemia, en donde se ha observado que la concentración de GLU y aspartato, en el cerebro, aumenta de manera importante en el espacio extracelular (Benveniste *et al.*, 1984, Sandberg *et al.*, 1985), llegando a alcanzar de 35 a 350  $\mu\text{M}$  durante el episodio isquémico (Obrenovitch *et al.*, 1993). Este incremento puede deberse a (1) una liberación excesiva de GLU por exocitosis (Dawson *et al.*, 2000), (2) la alteración de su sistema de recaptura, mediada por la actividad en reversa de sus transportadores (Phillis *et al.*, 2000), y recientemente se ha sugerido que podría ser a través de (3) la activación de canales sensibles a volumen (Seki *et al.*, 1999).

El curso temporal de la excitotoxicidad comprende dos fases. La primera se manifiesta por el hinchamiento celular minutos después de la exposición al GLU, que ocurre como resultado de la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  acompañados de agua, que pasan a través de los receptores AMPA y que finalmente pueden llevar a la muerte de la célula por lisis. Este hinchamiento de las neuronas es más marcado en los cuerpos celulares y en las dendritas (Choi, 1992). La segunda fase de este fenómeno incluye cascadas de eventos iniciadas por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores NMDA (Choi, 1992), las cuales se resumen en la Fig. 4. La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida por la activación de los receptores a NMDA de manera prolongada, activa proteasas como la calpaína, que degradan proteínas estructurales asociadas a microtúbulos y neurofilamentos, contribuyendo a la desintegración celular (Mcintosh *et al.*, 1997). También activa fosfolipasas capaces de romper la membrana celular y endonucleasas que dañan la estructura del DNA; por otro lado, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  también puede generar especies reactivas de oxígeno (Fig. 4).

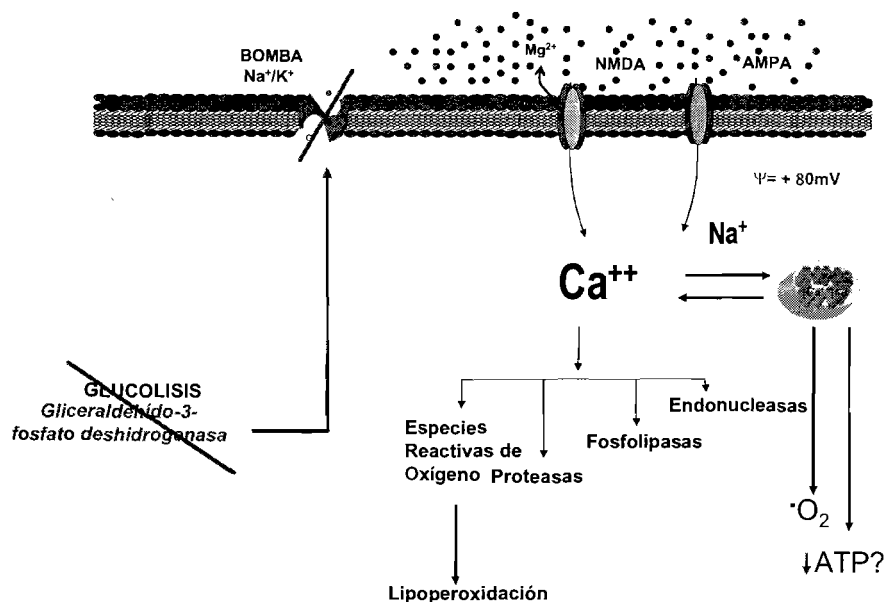


Fig. 4. Neurotransmisión glutamatérgica en condiciones de deficiencia energética. El descenso en la actividad de la bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , debido a la disminución en los niveles de ATP inducida por la inhibición glucolítica, lleva a la pérdida del gradiente iónico transmembranal, esto a su vez, produce la despolarización de la neurona presináptica liberándose más GLU al espacio sináptico. Por otra parte, la estimulación de los receptores de AMPA y kainato contribuye a la activación sostenida de receptores de NMDA, ya que se induce la liberación del  $\text{Mg}^+$  que se encuentra bloqueando al receptor después de la despolarización. Finalmente la estimulación sostenida de los receptores NMDA provoca la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; esta sobrecarga activa proteasas, fosfolipasas y endonucleasas, que degradan proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos respectivamente, y aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). La mitocondria, al sobrecargarse de  $\text{Ca}^{2+}$  puede contribuir a la pérdida de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , a la formación de ERO y a la disminución de los niveles de ATP.

La muerte neuronal, como se describirá más adelante, se facilita en condiciones de deficiencia energética, cómo podría ser la causada por la inhibición de la glucólisis.

Se sabe que el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  puede promover la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares, como es el retículo endoplásmico. Además, la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede dañar otros organelos como la mitocondria, y como resultado disminuir la producción de ATP. Por otra parte, el poro de transición de permeabilidad de la mitocondria (MPT) se abre como consecuencia

de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , y a través de éste podría liberarse  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior, o el citocromo c, que promueve la inducción de la apoptosis (Paschen y Doutheil, 2000). Además, el MPT desequilibra el potencial electroquímico, llevando al colapso del potencial de la membrana mitocondrial (Siesjö *et al.*, 1999). Por último, el daño mitocondrial impide que el  $\text{Ca}^{2+}$  sea recapturado del citosol a dicho organelo, contribuyendo al mantenimiento elevado de los niveles de dicho ión.

Se ha sugerido que el receptor de tipo NMDA es el principal receptor de GLU relacionado con el daño neuronal por excitotoxicidad, ya que bloqueadores de este receptor, como el MK-801 previenen la muerte neuronal *in vitro* en su totalidad (Choi, 1988). A pesar de su eficacia, este antagonista no puede ser utilizado como herramienta terapéutica, ya que al administrarse, incluso a dosis bajas, puede causar alteraciones psicomiméticas (Gagliardi, 2000), e incluso degeneración en regiones discretas del cerebro (Olney, 1989).

Con lo anteriormente descrito, se concluye que la activación de los receptores de GLU, es un factor indispensable para desencadenar la muerte neuronal de tipo excitotóxica; esto es importante, ya que en el presente estudio se utilizó una dosis tóxica de GLU administrada directamente en el estriado de la rata.

## 2. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

Estudios pioneros señalan que un estado energético deficiente en la célula incrementa la vulnerabilidad neuronal al efecto tóxico del GLU (Novelli, 1988). En estas condiciones, la disminución en la actividad de la bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , que depende de ATP, provoca la despolarización de las células y por lo tanto una mayor liberación de GLU de la presinapsis, lo cual prolonga el mantenimiento de GLU en el espacio extracelular. Por otra parte, en la postsinapsis los receptores de tipo NMDA pierden su bloqueo por el  $\text{Mg}^{2+}$  debido a la despolarización, lo cual facilita su activación, aún a concentraciones bajas de GLU, así induciendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 4).

En estudios previos, se han utilizado inhibidores del metabolismo energético como el IOA, un inhibidor glucolítico, y el 3-NP que inhibe el ciclo de Krebs y la

cadena de transporte de electrones, y en ambos casos se promueve la toxicidad del GLU (Greene y Greenamyre, 1996; Zeevalk y Nicklas, 1992; Sánchez-Carbente y Massieu, 1999; Massieu *et al.*, 2000). Un estudio *in vitro* muestra que cuando la glucosa es sustituida por la 2-desoxiglucosa, un sustrato no metabolizable, en presencia del GLU, las células incrementan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera irreversible y este incremento coincide con el colapso mitocondrial (Vergun *et al.*, 2003). Esto sugiere que el GLU en condiciones de deficiencia energética altera la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, contribuyendo a la pérdida de la homeostasis celular, que finalmente lleva a la célula a la muerte.

Por otro lado, se ha hipotetizado que en algunos padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad del Huntington, la de Alzheimer y la de Parkinson existe muerte de tipo excitotóxico. Estos padecimientos también se relacionan con fallas en el metabolismo energético, inducidas principalmente por el daño mitocondrial, ya que se han encontrado disminuciones en la actividad de los distintos complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE). En el caso de la Corea de Huntington y del Parkinson, esta disminución se ha observado en los ganglios basales, regiones especialmente involucradas en estas enfermedades.

Los estudios bioquímicos en tejidos post-mortem de pacientes con Huntington revelan una disminución de la actividad de la CTE de los complejos II y III en el núcleo caudado y también una disminución en la actividad del complejo IV. Por otra parte, estudios en pacientes que padecieron la enfermedad de Parkinson han detectado decrementos de hasta un 40% en la actividad del complejo I de la CTE en la sustancia nigra. Finalmente, se ha encontrado una disminución en la actividad de complejo IV de la CTE en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Beal, 2000).

El IOA es un inhibidor que bloquea la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerol fosfato, lo cual impide que se lleve a cabo la primera reacción de la glucólisis que conserva energía en forma de NADH. Se conoce que el IOA es capaz de lesionar al estriado al ser inyectado en esta área, donde también puede

observarse astrogliosis (Matthews *et al.*, 1997). Además, si se administra intrahipocampalmente aumenta los niveles extracelulares de GLU, taurina y en especial de aspartato (Massieu *et al.*, 2000). Otros estudios han mostrado que puede aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo (Matthews *et al.*, 1997), y un estudio *in vitro* sugiere que el IOA puede promover el funcionamiento inverso del transportador de GLU (Gemba *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha observado que la neurotoxicidad del IOA en un modelo *ex vivo* en retina, puede deberse a la activación de los receptores de tipo NMDA, ya que el tratamiento con el MK-801, un antagonista de estos receptores, previene completamente el daño neuronal. Sin embargo, en esta preparación, el efecto tóxico del IOA no correlaciona con la elevación en los niveles extracelulares de GLU y aspartato (Zeevalk y Nicklas, 1991). Además, cuando en dicho modelo las preparaciones son expuestas a un medio con  $Mg^{2+}$ , la toxicidad del IOA se ve disminuida. Estos hallazgos sugieren que durante la inhibición glucolítica la membrana celular se despolariza, promoviendo la liberación de  $Mg^{2+}$  que normalmente bloquea al receptor NMDA, facilitando su activación (Zeevalk y Nicklas, 1992). De aquí que se ha propuesto que el IOA induce muerte neuronal a través de un mecanismo excitotóxico.

En el modelo utilizado por Matthews *et al.* (1997) se administró una dosis de 50 nmolas de IOA en forma directa al estriado y la lesión que produjo abarcó una gran parte del estriado, mostrando pérdida neuronal y astrogliosis. Además se encontró un 35 % de inhibición aproximadamente, en la actividad de la enzima GADPH. Es importante mencionar que en dicho modelo la remoción de las entradas glutamatérgicas reduce de manera significativa las lesiones en el estriado, lo cual refuerza la idea de la participación de un mecanismo excitotóxico en la muerte mediada por IOA.

Además de que el IOA al ser administrado directamente en el cerebro, produce muerte excitotóxica, su administración sistémica en la rata, si bien no produce daño neuronal, sí facilita los efectos tóxicos del glutamato. En estudios previos del laboratorio se demostró que la administración sistémica de 25 mg de IOA por 4 días aumenta la vulnerabilidad al daño mediado por GLU (Massieu *et al.*, 2000).

Los mecanismos asociados a dicha facilitación no se conocen del todo pero estudios de nuestro laboratorio indican que la falla progresiva en los sistemas de recaptura de GLU podría estar involucrada en este proceso (datos no publicados). En el presente trabajo, hemos estudiado la posible participación del estrés oxidativo en la facilitación de la muerte excitotóxica inducida *in vivo* en condiciones de inhibición glucolítica crónica (ver más adelante)

Los estudios arriba mencionados en su conjunto evidencian una clara relación entre el estado energético celular y la toxicidad del GLU, la cual participa en la muerte isquémica y la hipoglucémica dada la falla energética abrupta. Además la excitotoxicidad representa un componente de la muerte neuronal asociada a algunas enfermedades neurodegenerativas debido a la disfunción mitocondrial ligada a éstas.

### **3.1 Cuerpos cetónicos y su papel como sustratos alternativos a la glucosa en el cerebro**

En condiciones fisiológicas, el cerebro adulto utiliza como fuente principal de energía a la glucosa; sin embargo, cuando se agota la disponibilidad de este sustrato, como ocurre durante el ayuno, comienzan a sintetizarse los cuerpos cetónicos (CC) (Owen *et al.*, 1967, Gjedde y Crone, 1975) a partir de ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo (Guzmán y Blázquez, 2001). Los CC también pueden incrementarse en la sangre durante la administración de dietas ricas en ácidos grasos, después de la realización de ejercicio, en etapas tardías del embarazo, y durante la lactancia (Nehlig, 1996), o bien en condiciones patológicas como la diabetes, la hipoglucemia (Robinson y Williamson, 1980) y la hipoxia (Kirsch y D'Alecy, 1984).

Los CC son el acetoacetato, el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) y la acetona, pero sólo se mencionarán los dos primeros, ya que la acetona es excretada a través de los pulmones y la orina, por lo que no es importante en el metabolismo celular. Estos compuestos pueden actuar como fuentes oxidativas, como precursores



lipogénicos (Patel y Owen, 1976, 1977) y como reguladores del metabolismo en el SNC, en las condiciones antes mencionadas.

Los cuerpos cetónicos pasan de la circulación sanguínea al tejido y de ahí a las células. Entren a la mitocondria en donde son oxidados o al citoplasma en donde se utilizan en la lipogénesis (Robinson y Williamson, 1980). La cetogénesis (Fig. 5) se produce principalmente en los hepatocitos y recientemente se ha sugerido que ésta también puede ocurrir en astrocitos (Guzmán y Blázquez, 2001).

Los cuerpos cetónicos se transportan desde el hígado a otros tejidos, incluyendo el cerebro, en donde entran en la mitocondria y son oxidados a través del ciclo de Krebs a acetil-CoA (Fig. 5) (Lehninger, 1994). Para que los CC entren al SNC deben cruzar la barrera hematoencefálica y aunque son hidrofílicos, su transporte funciona por difusión pasiva y por un proceso de transporte facilitado (Gjedde y Crone, 1975). Este último está mediado por los transportadores de ácidos monocarboxílicos que también transportan lactato, piruvato y ácidos grasos de cadena corta.

A pesar de que estos transportadores se encuentran expresados prominentemente en los vasos sanguíneos, también se han localizado en los astrocitos y en las neuronas, permitiendo la salida y entrada de dichos sustratos a través de las células (Pellerin *et al.*, 2005).

Los niveles basales de  $\beta$ -hidroxibutirato en el cerebro de rata son de 0.06-0.1 mmol/l (Yudkoff *et al.*, 2001). Este es el más abundante, ya que del total de la concentración sanguínea de cuerpos cetónicos, el 70% es  $\beta$ -hidroxibutirato (Pollay y Stevens, 1980). Los CC pueden pasar al líquido cefalorraquídeo a través del plexo coroideo para distribuirse a otras estructuras (Hawkins *et al.*, 1986).

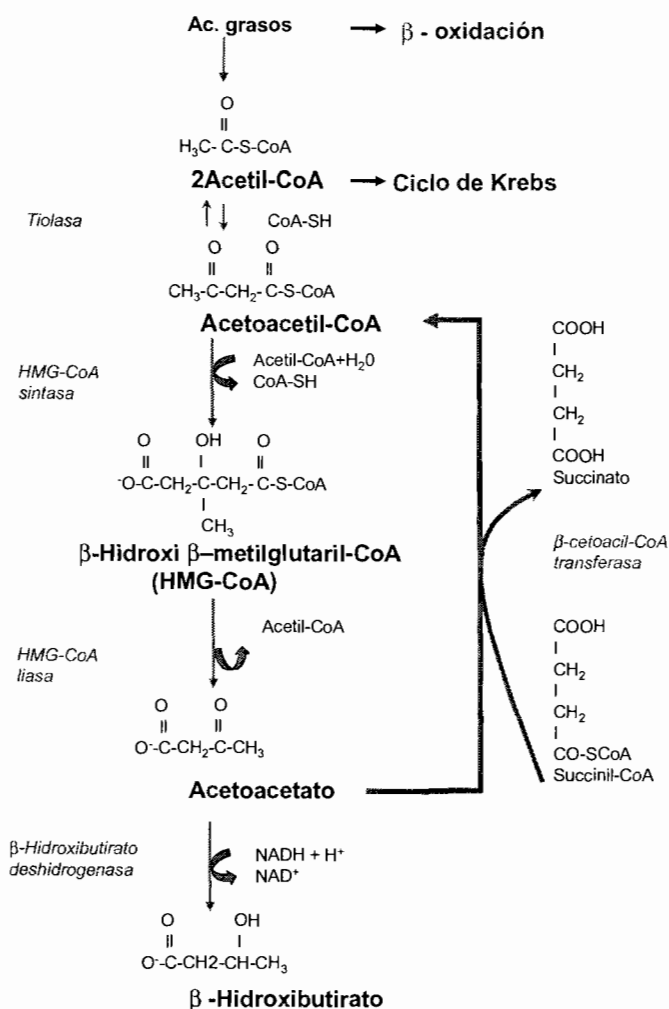


Fig. 5. Síntesis y oxidación de los cuerpos cetónicos, el acetoacetato y el  $\beta$ -hidroxiacetato. La síntesis de los CC ocurre cuando las concentraciones de acetil-CoA son elevadas, entonces 2 moles de acetil-CoA, a través de la reacción catalizada por la tiolasa dan lugar al acetoacetil-CoA. La acetoacetil-CoA puede reaccionar a su vez con un tercer mol de acetil-CoA para dar  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutarilCoA (HMG-CoA), catalizada por la HMG-CoA sintasa. En las mitocondrias, la HMG-CoA, a través de la acción de la HMG-CoA liasa, produce acetoacetato y acetil-CoA. El acetoacetato se reduce de manera dependiente de NADH por la  $\beta$ -hidroxiacetato deshidrogenasa para dar lugar al  $\beta$ -hidroxiacetato, o bien, en cantidades muy pequeñas, por descarboxilación espontánea da lugar a acetona. La oxidación de los CC comienza cuando el  $\beta$ -hidroxiacetato se convierte en acetoacetato a través de una deshidrogenación, posteriormente el acetoacetato se convierte directamente en acetoacetil-CoA, por la transferencia de la CoA de la succinil-CoA, esto resulta en la obtención de dos moléculas de acetil CoA. La acetil CoA puede ser utilizada como sustrato del ciclo de Krebs.

Se conoce que la utilización de los CC en el cerebro se incrementa cuando su concentración arterial aumenta, y ésto es independiente del estado nutricional del sujeto (Hawkins *et al.*, 1971; Kammula, 1976). Sin embargo, se ha sugerido que en condiciones de ayuno se da una sobrerregulación de los transportadores de los CC, lo cual permite una mayor permeabilidad al cerebro (Pan *et al.*, 2001).

La dieta cetogénica se ha utilizado por décadas para controlar las crisis epilépticas en niños. Las personas que se mantienen en este tipo de dietas, llegan a alcanzar una concentración hasta de 5 mmol/l en sangre de  $\beta$ -hidroxibutirato (Yudkoff *et al.*, 2001) y como resultado de la restricción en la ingesta de glucosa en la dieta, los niveles bajos de glucosa en la sangre promueven la oxidación de CC en el cerebro para obtener energía.

Aunque la causa de la eficacia terapéutica de la dieta cetogénica en el control de las crisis epilépticas aún se desconoce, se ha demostrado que estados cetogénicos disminuyen la frecuencia y la severidad de las crisis epilépticas (Yudkoff *et al.*, 2004), sin efectos secundarios en la conducta y sin aumento de peso (Bough *et al.*, 2000, Hori *et al.*, 1997). Además, se ha sugerido que modifican la bioquímica cerebral; por ejemplo, producen una disminución en la concentración de aspartato, y un aumento en la síntesis de GABA (Yudkoff *et al.*, 2001). Esto ocurre ya que la oxidación de los CC forma acetil-CoA que entra al ciclo de Krebs consumiendo oxaloacetato y de esta manera la formación de aspartato queda limitada. Asimismo, estudios *in vitro* señalan que los CC aumentan las concentraciones de GLU, de GABA y de glutamina (Daikhim y Yudkoff, 1998). Al incrementar la disponibilidad de GLU se induce un incremento en la síntesis de GABA, a través de la GLU descarboxilasa, al igual que la conversión de glutamina en GLU aumentaría indirectamente la concentración del neurotransmisor inhibitor, a través de la descarboxilación del GLU (Yudkoff *et al.*, 2004). A partir de estos estudios, se ha sugerido que durante la dieta cetogénica el incremento en la actividad de la GLU descarboxilasa, en detrimento de la actividad de la aspartato aminotransferasa que sintetiza aspartato, podría estar favoreciendo el control de las crisis reduciendo la excitabilidad neuronal. Además,

la síntesis de GABA, el principal neurotransmisor inhibitor del cerebro, favorece aún más el efecto antiepiléptico de los CC.

Otros estudios indican que los CC pueden aumentar la captura de aminoácidos neutros, como la leucina, a través de la vía de contra-transporte de glutamina almacenada en los astrocitos. Esto aumentaría la glutamina transportada fuera del sistema nervioso, evitando así la formación de nuevo de GLU y evitando su posible efecto tóxico (Yudkoff *et al.*, 2001).

Por otro lado, la dieta cetogénica produce acidosis, que disminuye la sensibilidad de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, contrarrestando la hiperexcitabilidad característica durante las crisis epilépticas.

Por su parte, Bough y cols. (2000) sugieren que es la restricción calórica y no la cetonemia, lo que aumenta la resistencia a las crisis epilépticas. Por otra parte, los estudios de Veech y cols. (2001) apuntan hacia una mejora en la eficiencia metabólica cerebral durante la dieta cetogénica, lo cual puede explicar su efectividad.

Estudios en humanos a través de técnicas de imagenología, demostraron que en pacientes tratados con dietas cetogénicas existe un incremento en PCr/ $\gamma$ -ATP en el cerebro (Pan *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha probado que el BHB, en sustitución de la glucosa, es capaz de preservar los niveles de ATP y de PCr, en rebanadas de hipocampo de ratas inmaduras (Wada *et al.*, 1997). Además, el BHB en un modelo *in vitro* de hipoxia, mantiene el potencial mitocondrial y reduce la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 3 (Masuda *et al.*, 2005). En otros estudios se demostró que el BHB puede mantener la integridad morfológica, así como la actividad sináptica de las células en condiciones de inhibición glucolítica (Izumi *et al.*, 1998).

Se ha mostrado un aumento en el tiempo de sobrevivencia de ratones, cuando son tratados con BHB, en modelos de hipoxia y anoxia. Además, se ha observado una disminución en el contenido de agua cerebral y de  $\text{Na}^+$  intracelular en condiciones de isquemia cerebral global, en ratas tratadas con BHB, lo cual contribuye a disminuir el edema cerebral. Además, en este caso el BHB disminuye

los niveles de lactato y restaura los niveles de ATP, lo cual sugiere que puede ser usado como sustrato energético (Suzuki *et al.*, 2001, 2002).

De acuerdo a lo anterior, es posible que los CC al utilizarse como fuente alternativa de la glucosa, puedan limitar el daño neuronal y por lo tanto reducir el tamaño del infarto isquémico y la mortalidad, lo cual sugiere que estos compuestos podrían utilizarse para contrarrestar las alteraciones que presentan los pacientes después de un episodio isquémico. Por otro lado, los cuerpos cetónicos se han utilizado como neuroprotectores en cultivos celulares tratados con MPP+ y con el fragmento activo de la proteína  $\beta$ -amiloide, cuya presencia se ha implicado en la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, respectivamente (Kashiwaya *et al.*, 2000). Además, en un modelo *in vivo* de Parkinson, el BHB (2.6 mmol/kg X 7 días) previene la muerte causada por la administración de MPTP, y en el cerebro dicho efecto correlaciona con un incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial y con un aumento en los niveles de ATP (Tieu *et al.*, 2003). En estas estructuras se estima que el BHB, alcanza una concentración en la sangre de 0.9mM, he incrementa las concentraciones de succinato, cuando el complejo I mitocondrial está inhibido.

En un estudio previo (Mejía, 2003), encontramos que el BHB previene la muerte neuronal inducida por GLU en ratas tratadas con el inhibidor glucolítico, IOA. Además, se encontró que el BHB puede prevenir la disminución en los niveles de ATP en el estriado inducida por el tratamiento con IOA, sugiriendo su participación como sustrato metabólico mitocondrial. En este trabajo, se estudió el efecto del BHB sobre la muerte neuronal y la lipoperoxidación inducidas por glutamato, en condicione de inhibición glucolítica.

### 3. ESTRÉS OXIDATIVO

Se conoce que un factor importante para el daño celular es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno, algunas de ellas son el peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ), el superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $\cdot$ OH), el óxido nítrico ( $\cdot$ ON) y

el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), las cuales pueden contribuir a la generación de un estado de estrés oxidativo (Atlante *et al.*, 2001). A continuación describiré las ERO que podrían generarse directamente durante el proceso de muerte de tipo excitotóxico. (1) El  $\cdot\text{ON}$  es un radical libre formado a partir de la reacción de la sintasa del óxido nítrico con la L-arginina; para la activación de ésta enzima es fundamental la presencia del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. La formación del  $\cdot\text{ON}$  puede desencadenar la formación de otras ERO al reaccionar con el radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y formar  $\text{ONOO}^{\cdot}$ , el cual puede oxidar grupos tiol. Por otra parte, (2) la formación del radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  también se relaciona con la presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  ya que este ión activa a la xantina oxidasa que produce  $\text{O}_2^{\cdot-}$  al oxidar a la xantina. Aunque por sí mismo el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  no es tan dañino, puede dar lugar a la formación de especies más reactivas, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); esta reacción es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). Si bien el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se considera tóxico sólo a muy altas concentraciones puede convertirse, en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (ó  $\text{Cu}^{1+}$ ) a través de la reacción de Fenton, en una molécula altamente reactiva, conocida como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Por su parte, el  $\cdot\text{OH}$  reacciona con diversas macromoléculas como el DNA, los fosfolípidos, las proteínas y los carbohidratos (Halliwell, 1992). Inclusive puede reaccionar con lípidos y desencadenar la lipoperoxidación, la cual se inicia por la extracción de un hidrógeno de la cadena del ácido graso generando un radical peroxilo. Éste a su vez puede extraer otro  $\text{H}^+$  y formar otro radical libre propagando y amplificando la reacción. Los carbonilos son un producto común de la descomposición de lípidos por radicales. Los aldehídos, que son un tipo de carbonilos, incluyen al malondialdehído y al 4-hidroxinonenal. Se conoce que la lipoperoxidación altera la fluidez y la permeabilidad de la membrana, contribuyendo al daño celular (Fig. 6).

La otra fuente de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sería la fuga de electrones de la cadena transportadora mitocondrial, debido a la sobrecarga de calcio, después de la estimulación prolongada de los receptores glutamatérgicos.

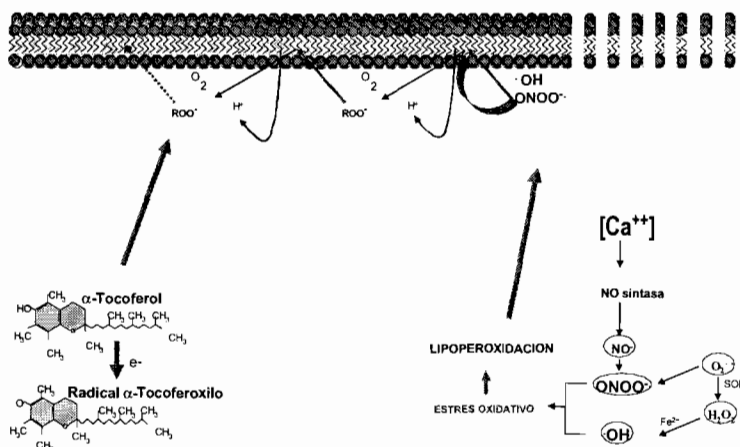


Fig. 6. Proceso de lipoperoxidación desencadenado por la formación de ERO. El incremento en la generación de ERO desencadena un estado de estrés oxidativo, que entre otras cosas, puede alterar la integridad de la membrana a través de la lipoperoxidación. Esto ocurre cuando, por ejemplo, el  $\cdot\text{OH}$  y/o el  $\text{ONOO}\cdot$  remueven un átomo de  $\text{H}\cdot$  de la cadena de ácidos grasos, generando un radical peróxido que por sí mismo puede reaccionar con otros ácidos grasos y remover otro  $\text{H}\cdot$ , formando un peróxido de lípido, y así sucesivamente, puede perpetuarse la reacción. El  $\alpha$ -tocoferol funciona como un compuesto antioxidante, cuando le dona un  $e^-$  al radical peróxido formando al radical  $\alpha$ -tocoferoxilo, que tiene poca reactividad, terminando así con la cadena oxidativa de daño membranar.

Se ha propuesto que la neurodegeneración observada en la isquemia cerebral se relaciona con la producción de radicales libres y el desencadenamiento de la lipoperoxidación (Warner *et al.*, 2004).

Por otra parte, un estudio con enfermos de Parkinson y de Alzheimer muestra alteraciones en la maquinaria de defensa celular antioxidante (Beal, 2000) y diversos estudios han mostrado productos de oxidación de lípidos, proteínas o DNA en tejido post mortem de pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Beal, 2000).

Por esta razón, se ha sugerido el uso de antioxidantes con el fin de detener o evitar el estrés oxidativo y contribuir a prevenir el daño celular observado en la isquemia cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas.

En este estudio se pretende conocer la participación del estrés oxidativo durante la excitotoxicidad inducida en condiciones de inhibición glucolítica, a través de la evaluación de la lipoperoxidación de la membrana celular en el estriado y su posible disminución después del tratamiento con vitamina E.

#### 4.1 Efecto de la vitamina E en la muerte neuronal

La vitamina E, es un compuesto liposoluble, que cuenta con ocho isoformas distintas clasificadas en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferol y en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol. Los prefijos difieren entre sí únicamente por la disposición de sus metilos alrededor del anillo de benceno.

Las diversas isoformas de la vitamina E se localizan en depósitos de grasa y en las membranas celulares. Sin embargo, el  $\alpha$ -tocoferol es la forma predominante en los tejidos y en la circulación sanguínea (Wang y Quinn, 1999).

Frecuentemente se ha caracterizado al  $\alpha$ -tocoferol como antioxidante, ya que es conocida su capacidad para funcionar como atrapador de radicales libres y por detener la lipoperoxidación. El  $\alpha$ -tocoferol puede transferir un hidrógeno al radical peroxilo, formando compuestos menos reactivos. También se conoce que el  $\alpha$ -tocoferol puede reaccionar con otros radicales como el peroxinitrito, el dióxido de nitrógeno, el superóxido y el óxido nítrico (Osakada *et al.*, 2003) (Fig. 6).

En un modelo de isquemia cerebral se demostró que la administración de  $\alpha$ -tocoferol inhibe la formación de malondialdehído, considerado como un indicador del estado de lipoperoxidación, durante el restablecimiento del flujo sanguíneo, es decir en la reperusión (Villalobos *et al.*, 1994). Además, la administración del  $\alpha$ -tocoferol promueve la recuperación de los niveles de ATP durante la reperusión (Yamamoto *et al.*, 1983). Un estudio reciente muestra que la administración del  $\alpha$ -tocotrienol, pero también el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\gamma$ -tocoferol, reducen el volumen del infarto en un modelo de isquemia cerebral (Mishima *et al.*, 2003).

Trabajos *in vitro* de nuestro laboratorio demostraron que la vitamina E es capaz de proteger a cultivos celulares contra la muerte excitotóxica durante la inhibición mitocondrial o glucolítica (García y Massieu, 2001; Massieu *et al.*, 2003b). También se ha demostrado que la vitamina E reduce el número de células apoptóticas en el hipocampo durante la reperusión (Tagami *et al.*, 1999).



## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a los estudios mencionados con anterioridad, conocemos que la muerte excitotóxica mediada por GLU se facilita durante la inhibición glucolítica. Los mecanismos responsables de dicha facilitación no se han dilucidado completamente. En este trabajo, nos propusimos estudiar si el estrés oxidativo puede estar involucrado en este proceso, monitoreando los niveles de lipoperoxidación en el estriado, después de la administración de GLU en ratas intactas y ratas tratadas con el inhibidor glucolítico, el IOA. A su vez se estudió el efecto de la vitamina E sobre la lipoperoxidación y la sobrevivencia neuronal. En este estudio también investigamos si suplementando el metabolismo mitocondrial con BHB, se puede prevenir la muerte neuronal y disminuir los niveles de lipoperoxidación. Con este propósito, se trató por tres días a las ratas con IOA y después de la última administración se inyectó GLU en el estriado. Se evaluó el volumen de lesión y la lipoperoxidación en ratas sometidas a tratamientos con vitamina E y BHB como se describe adelante.

## II. HIPOTESIS

La muerte celular excitotóxica inducida durante la inhibición glucolítica *in vivo*, está relacionada con la lipoperoxidación y con los niveles de ATP. Por lo tanto, la vitamina E y el BHB podrán prevenir la muerte neuronal y la lipoperoxidación.

## III. OBJETIVOS

### 1.0 Objetivo General

Conocer si la muerte neuronal excitotóxica durante la inhibición glucolítica, se asocia con el aumento en la lipoperoxidación y la disminución en los niveles de ATP.

## 2.0 Objetivos Particulares

1) Evaluar el grado de inhibición de la enzima GADPH en el estriado de las ratas durante el tratamiento con IOA.

En ratas tratadas por tres días con IOA e inyectadas intraestriatalmente con GLU se estudiará lo siguiente:

2) El curso temporal de la muerte neuronal (3, 6, y 24 horas) después del tratamiento.

3) El efecto del antagonista de los receptores a GLU, el MK-801, del  $\beta$ -hidroxibutirato y de la vitamina E sobre el daño producido en el estriado.

4) Los niveles de ATP en el estriado de ratas a diferentes tiempos (3 y 6 horas), después del tratamiento.

5) Los niveles de lípidos peroxidados en el estriado de las ratas a diferentes tiempos (3, 6, y 24 horas), después del tratamiento.

6) El efecto del  $\beta$ -hidroxibutirato y la vitamina E sobre la lipoperoxidación.

## IV. METODOLOGIA

### 1.0 Animales y condiciones generales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y con el ciclo fijo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Los animales contaron con alimento y agua *ad libitum*.

## 2.0 Materiales

Se utilizaron los siguientes fármacos: el yodoacetato (sal de sodio), el ácido L-glutámico (sal monosódica) y el (+)- $\alpha$ -tocoferol se obtuvieron de Sigma, el 3-hidroxi butirato (sal de sodio) se obtuvo de Aldrich y el  $\text{FeSO}_4$  se obtuvo de Baker. El IOA, el ácido L-glutámico, el 3-hidroxi butirato (BHB) y el  $\text{FeSO}_4$  se disolvieron en un amortiguador de fosfatos (10 mM), con un pH= 7.3. El (+)- $\alpha$ -tocoferol se disolvió en aceite comercial de cártamo.

## 3.0 Tratamientos

El modelo consistió en la administración de una inyección intraperitoneal (i.p) diaria de IOA de 15 mg/kg durante 3 días. Una hora después de la última administración de IOA los animales recibieron una inyección intraestriatal de GLU (1  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ). Otro grupo de animales se trató durante tres días con IOA (i.p) y con el vehículo (amortiguador de fosfatos 10 mM, en un volumen de 1  $\mu\text{l}$ ) en el estriado. Un grupo adicional de animales fue tratado por tres días con amortiguador de fosfatos i.p e inyectado intraestriatalmente con GLU (1  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ).

Para evaluar los efectos del BHB, del MK-801 y de la vitamina E, se utilizaron distintos protocolos. En el caso del grupo tratado con BHB, se dejaron transcurrir 45 min después de la tercera dosis de IOA, se anestesió a la rata con halotano y se le realizó una incisión en la cola con el objeto de introducir en la vena lateral una aguja conectada a un catéter. Esta se encontraba acoplada a una jeringa de insulina de 1 ml montada en una bomba de microinfusión, la cual administró una solución 1 M de BHB a un flujo de 33  $\mu\text{l} \times \text{min}$  durante 15 min, en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$ , recibiendo cada rata 500  $\mu\text{mol}$  totales.

En otro grupo de animales se administró una dosis de MK-801 (2 mg/kg i.p.) 30 minutos antes de la infusión de GLU para evaluar su efecto protector en ratas previamente tratadas con o sin IOA.

Finalmente, se evaluó el efecto de la vitamina E, la cual se administró i.p durante 7 días a una dosis de 100 mg/kg/día. Al día 4 del tratamiento con vitamina

E, se inició el tratamiento con el IOA (15 mg/kg X 3 días), el cual fue administrado 4 horas antes de cada inyección con vitamina E.

La inyección intraestriatal del GLU se realizó una hora después de la última inyección de IOA, como previamente se describió. Las ratas se sacrificaron 24 h después, para la realización del análisis histológico.

Un grupo de animales se inyectó con IOA en el estriado (50 nmol/ $\mu$ l) con el fin de analizar la lesión tisular inducida por la inhibición aguda de la glucólisis.

Los protocolos de administración de MK-801, BHB y vitamina E se han utilizado previamente en nuestro laboratorio en otros modelos de daño (Massieu *et al.*, 2000; Massieu *et al.*, 2003a)

#### 4.0 Cirugía

Para la cirugía, las ratas se anestesiaron con halotano al 2%, en una mezcla de O<sub>2</sub> 95% / CO<sub>2</sub> 5%. Una vez anestesiadas se montaron en un aparato estereotáxico, y se fijaron de los espacios interaurales y con la barra dental en la posición -3.3. Durante la cirugía, la anestesia se mantuvo al 1.5%. El cráneo se expuso al cortar la piel con un bisturí. Las coordenadas correspondientes al estriado se obtuvieron del atlas de Paxinos y Watson (1986); anteroposterior +0.7mm, lateral +2.8mm y ventral - 4 mm a partir de la duramadre. Una vez localizado el sitio, se trepanó el cráneo con un taladro haciendo un orificio de 1-2 mm, y se infundió GLU (1  $\mu$ mol) unilateralmente en un volumen total de 1  $\mu$ l a un flujo constante de 0.5  $\mu$ l/min. Después de 2 minutos de terminada la inyección, se retiró la aguja. La inyección se realizó con una aguja Hamilton de calibre 27 colocada en la torre del estereotáxico conectada por medio de un catéter a una jeringa Unimetrics puesta en una bomba de microinfusión. Posteriormente se suturó la piel.

En el caso de la inyección intraestriatal de IOA se utilizaron las mismas coordenadas y la metodología antes descrita.

## 5.0 Histología

Después de transcurridas 3, 6 o 24 horas de la infusión del GLU, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p) con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se perfundió a la rata intracardiamente con 250 ml de solución salina al 0.9% seguida de 250 ml de solución fijadora de formaldehído al 5% disuelto en amortiguador de fosfatos (0.1 M), pH 7.3. Después de extraídos los cerebros, se suspendieron durante 24 horas en la misma solución fijadora. Se transfirieron a sacarosa al 20% por 24 horas, y posteriormente a sacarosa al 30% otras 24 horas. La sacarosa se disolvió en amortiguador de fosfatos (10 mM), pH=7.3. Se realizaron cortes histológicos consecutivos de 40  $\mu\text{m}$  de todo el estriado por medio de un criostato.

Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo. El área de lesión se determinó manualmente en las imágenes capturadas a través de un sistema de análisis de imágenes (Macintosh NIH Image 1.6). Se define como área lesionada el tejido donde se observan núcleos picnóticos, y donde están presentes pocas o ninguna célula.

El área de lesión se delimitó en cada corte con la ayuda de un microscopio, desde el primer corte lesionado hasta el último. El volumen de lesión se calculó a partir de la sumatoria de las áreas lesionadas de cada corte, multiplicadas por el número de cortes medidos y por el grosor de éstos.

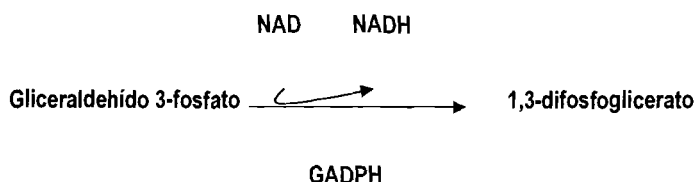
En el caso de los tratamientos con IOA intraestriatal (50 nmol/ $\mu\text{l}$ ), las ratas se sacrificaron 1, 2 y 3 horas después de la infusión con el inhibidor glucolítico.

Se extrajo el cerebro y se obtuvieron los cortes para cuantificar el volumen de lesión de la manera descrita.

## 6.0 Determinación de la actividad de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Para la determinación de la actividad de la GADPH se utilizó una modificación de la técnica espectrofotométrica reportada por IKemoto y cols.

(2003). Esta se basa en la detección del incremento en la producción del NADH a partir de NAD resultante de la reacción que utiliza como sustrato al gliceraldehído 3-fosfato para convertirlo en 1,3-difosfoglicerato a través de la enzima GADPH. El ensayo se basa en la cuantificación de la absorbencia a 340 nm obtenida en los primeros 15 seg. La reacción es la siguiente:



Diferentes grupos de ratas se sacrificaron 1 h después de recibir 1, 2, o 3 inyecciones diarias de IOA, y un grupo adicional se sacrificó 24 h después de la 3ra administración. El estriado se extrajo y se suspendió en 10 volúmenes de Tris-HCl (0.1 M) y se homogenizó. Como control positivo de la inhibición de la actividad de la GADPH por el IOA, éste se inyectó directamente en el estriado de la rata a una dosis de 50 nmol/ $\mu$ l. Posteriormente se extrajo el cerebro de la bóveda craneal, se disecó en frío el cuerpo estriado y se homogenizó como se describió antes.

Para cuantificar la actividad de la GADPH se preparó una solución que contiene amortiguador Tris- HCl (0.1 M), arsenato de  $\text{Na}^+$  (1.7 mM), gliceraldehído 3-fosfato (0.23 mM), fluoruro de  $\text{Na}^+$  (20 mM),  $\text{NAD}^+$  (0.83 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM) y 200  $\mu$ g de proteína determinadas previamente por el método de Bradford.

## 7.0 Determinación de los niveles de ATP

Para la determinación de los niveles de ATP se utilizó una técnica luminométrica por medio de la reacción de la luciferina-luciferasa. El ensayo se basa en el requerimiento de ATP de la luciferasa para producir luz. La reacción es la siguiente:



Las ratas se anestesiaron y se fijaron en un estereotáxico 30 min después de recibir la inyección intraestriatal de GLU. Posteriormente, se hizo una ventana en el cráneo de la rata, de forma que el cerebro quedó expuesto, y con un embudo se vertió nitrógeno líquido hasta que el cerebro quedó totalmente congelado. Después se decapitó a la rata y se extrajo el cerebro de la bóveda craneal. Posteriormente se disecó el cuerpo estriado en un cuarto frío a 4°C. El tejido se pesó en una balanza analítica, se homogenizó en ácido perclórico (0.4 M), y se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y éste se neutralizó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M) agregando el 9% del volumen de ácido perclórico. Se volvió a centrifugar en una microcentrífuga por un minuto, para precipitar las sales. Se recolectó el sobrenadante y éste se utilizó para cuantificar los niveles de ATP. El tejido del lado contralateral de las ratas tratadas con vehículo (i.p) e inyectadas con GLU en el estriado, se usó para la determinación de los valores control de ATP. Los niveles de ATP no difirieron de los cuantificados en el estriado de ratas intactas sin tratamiento alguno

Para cuantificar los niveles de ATP se preparó un amortiguador de reacción siguiendo las instrucciones del kit de determinación de ATP (Molecular Probes). Este amortiguador contiene la enzima luciferasa, luciferina (10 mM) y DTT (0.1 M).

A los tubos del luminómetro se les agregó 5  $\mu\text{l}$  de la muestra del tejido diluida (1:4) con  $\text{H}_2\text{O}$ , y se colocaron dentro del luminómetro. Posteriormente se les agregó 300  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción. El luminómetro registra los milivoltios producidos por la reacción de la enzima luciferasa y la concentración de ATP se calcula con la ayuda de una curva patrón de ATP realizada el mismo día. Para la curva patrón se agregó 200  $\mu\text{l}$  de una solución estándar de ATP de diferentes concentraciones (15, 31, 62 y 125 pmol) y posteriormente el luminómetro inyectó 300  $\mu\text{l}$  del amortiguador de reacción.

## 8.0 Determinación de la lipoperoxidación

Para la determinación del estado de lipoperoxidación se utilizó una técnica espectrofotométrica tomada de Gluck y cols. (2000). Esta técnica se basa en la detección del malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación, a través de su reacción con el ácido tiobarbitúrico.

Después de 3, 6 y 24 horas de la administración de GLU se decapitó a la rata, se extrajo el cerebro de la bóveda craneal y se disecó el estriado de la rata. El tejido disecado se homogenizó con 400  $\mu\text{l}$  KCl (1.15%) / azida de sodio (0.4 mM). Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  para determinar proteínas por el método de Bradford. El resto del tejido se incubó a 37°C durante 15 min. Para precipitar proteínas se les agregó 400  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético, posteriormente se agitaron las muestras y se centrifugaron a 10 000 r.p.m durante 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se les agregó 400  $\mu\text{l}$  de ácido tiobarbitúrico (0.8%); inmediatamente después las muestras fueron incubadas durante 20 minutos a 50°C. El espectrofotómetro registró el producto rosáceo a una absorbencia de 532 nm. Para la curva patrón se agregaron diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 nmolas) de Bis-dimetil acetal malonaldehído. Como controles positivos de lipoperoxidación se inyectó  $\text{FeSO}_4$  (20 nmol/ $\mu\text{l}$ ) directamente en el estriado, y con fines comparativos se inyectó de manera aguda el IOA (50 nmol/ $\mu\text{l}$ ) en el estriado.



## **9.0 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en cada condición, se sometieron a una prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para saber si hay efecto de los tratamientos, y una prueba posthoc de Fisher para las comparaciones múltiples. Los niveles de lipoperoxidación observados en las ratas tratadas y no-tratadas con vitamina E se compararon con un prueba de t de Student.

# **V. RESULTADOS**

## **1.0 Observaciones macroscópicas**

Las ratas que fueron tratadas con el IOA mostraron una reducción en el peso de aproximadamente un 10%, que se hizo evidente el último día de tratamiento. También estas ratas mostraron inflamación gástrica.

## **2.0 Actividad de la enzima GADPH**

El primer objetivo consistió en evaluar la capacidad del IOA (15 mg/kg), de inhibir a la enzima gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GADPH). Para responder lo anterior decidimos estudiar el curso temporal de los cambios en la actividad de la enzima después de 1, 2 o 3 días de tratamiento con el IOA. Como puede observarse el IOA, es capaz de disminuir progresivamente la GADPH en el estriado de la rata. La actividad de la enzima decae significativamente desde el primer día de tratamiento hasta alcanzar un 45.1 % de inhibición a los 3 días de tratamiento con el inhibidor glucolítico.

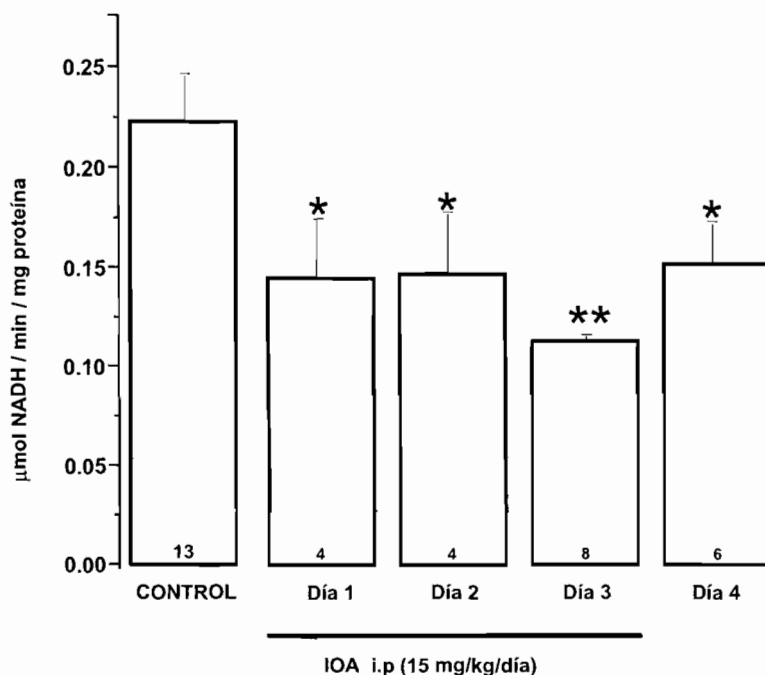


Fig. 7. La actividad de la enzima GADPH con el tratamiento de IOA. Esta se monitoreó a través de la producción de NADH en homogenados del estriado de ratas tratadas con IOA (15 mg/kg/día). Los animales fueron sacrificados 1 hora después de cada inyección diaria y 24 horas después de la última inyección. La actividad de la GADPH desciende gradualmente y se recupera parcialmente 24 horas después del tratamiento. Los números dentro de las barras indican la cantidad de animales utilizado en cada condición. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo control, \*\*  $p < 0.0005$  en comparación con el grupo control.

La actividad enzimática se determinó 1 hora después de la inyección i.p. de IOA. A pesar de que la actividad de la GADPH, muestra una tendencia a restablecerse, se mantiene por debajo de su actividad normal 24 horas después de haber suspendido el tratamiento crónico con IOA (Fig. 7).

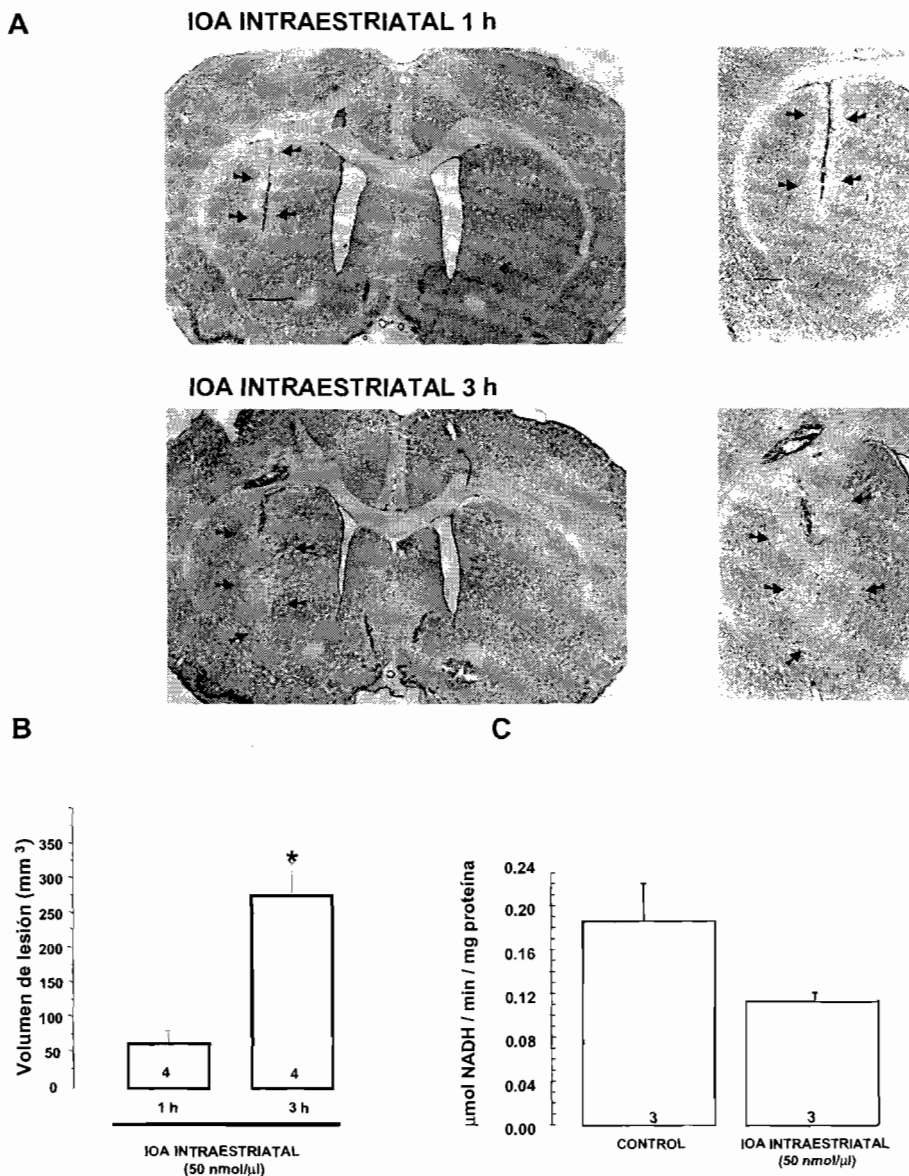


Fig. 8. Efecto de la inyección intraestriatal de IOA (50 nmol/ $\mu$ l) sobre el volumen de lesión y la actividad de la GADPH. (A) Microfotografías representativas de la lesión después de la administración intraestriatal del IOA. (B) Volumen de lesión 1 y 3 horas después de la inyección de IOA. (C) Actividad de la GADPH determinada 1 h después de la inyección intraestriatal de IOA. Los números dentro de las barras indican la cantidad de ratas utilizadas en cada condición.  $p < 0.05$  en comparación con el grupo analizado 1 h después de la administración de IOA.

Las fotos en los paneles del lado derecho muestran un aumento del estradiol ipsilateral a la inyección. La barra del panel derecho = 500  $\mu$ m y la del panel izquierdo = 1 mm.

Este resultado permitió establecer que tres días de tratamiento con IOA son un protocolo adecuado para inducir una alteración glucolítica moderada pero continua, que además por sí misma no produce daño neuronal visible en el análisis histológico, como posteriormente se explicará.

Como control positivo de inhibición de la GADPH, la actividad de la misma fue determinada después de la inyección intraestriatal de 50 nmol/ $\mu$ l de IOA. Se determinó la extensión de la lesión 1 hora y 3 horas después de recibir la inyección de IOA intraestriatal, con la finalidad de escoger un tiempo en el cual la muerte celular producida por el inhibidor no fuera el factor responsable de los cambios en la actividad de la GADPH. En la Fig. 8 B se observa la cuantificación del volumen de lesión, la cual progresa rápidamente a lo largo del tiempo, mostrando un promedio de 64 mm<sup>3</sup> una hora después de recibir la inyección de IOA y de 277 mm<sup>3</sup>, es decir cuatro veces mayor, tan sólo dos horas después.

Esta progresión en la lesión resulta evidente al observar las microfotografías que se muestran en la Fig. 8 A, donde se observa que alrededor del trayecto de la aguja, el tejido es más pálido debido a la despoblación celular. Estos resultados ayudaron a determinar que una hora después de la inyección aguda de IOA, es el tiempo ideal para medir la actividad de la enzima GADPH. Como muestra la Fig. 8 C la actividad de la enzima GADPH disminuye en un 39% una hora después de haber inyectado el IOA directamente en el estriado de la rata.

### **3.0 Observaciones histológicas y volumen de lesión**

Otro de los objetivos del presente proyecto fue el de establecer el curso temporal de la muerte (Figs. 9 y 10), con el fin de definir los tiempos en los cuales era favorable medir los niveles de ATP y de lipoperoxidación, sin que la muerte neuronal afectara los resultados.

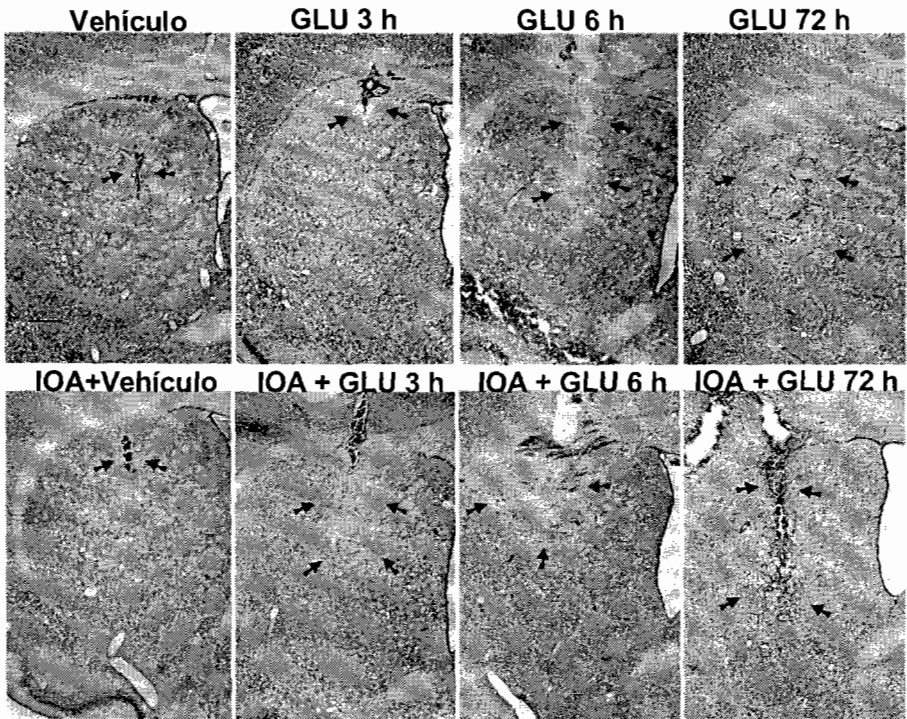


Fig. 9. Microfotografías de cortes coronales de estriado de las ratas sometidas a los distintos tratamientos y sacrificadas a diferentes tiempos. A las 3 h la lesión producida por el GLU en las ratas tratadas con vehículo es pequeña y similar a la de las ratas tratada con IOA e inyectadas con vehículo. En las ratas que recibieron el tratamiento crónico con IOA, la lesión inducida por el GLU se incrementa y ésta es visible desde las 6 h. A las 72 horas se observa la formación de la cicatriz en el tejido donde se encontraba la lesión. Barra= 500  $\mu$ m.

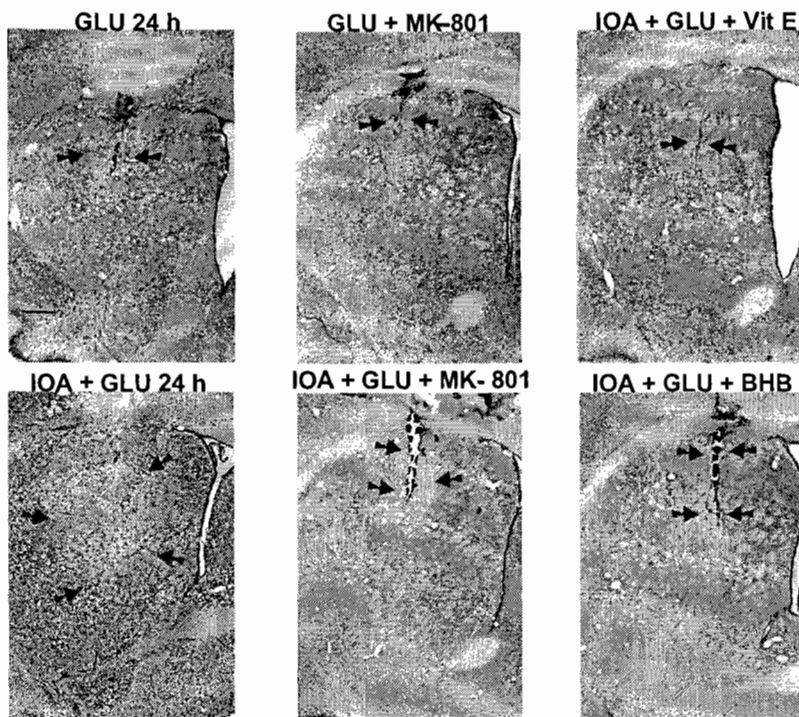


Fig. 10. Microfotografías de cortes coronales de estriado de las ratas sometidas a los distintos tratamientos. La lesión producida por el GLU en las ratas tratadas con vehículo es pequeña y similar a la de las ratas tratadas con IOA e inyectadas con vehículo. En las ratas que recibieron el tratamiento crónico con IOA, la lesión inducida por el GLU se incrementa significativamente a las 24 h. En las ratas tratadas con el MK-801, el BHB y la vitamina E, las lesiones son más reducidas. Barra= 500  $\mu$ m.

Como vehículo para estos experimentos, se inyectó amortiguador de fosfatos (10 mM) intraestriamente, y como se esperaba la infusión no causó mayor lesión que la producida por el trayecto hecho por la aguja (Fig. 9).

El daño celular ocurre de manera rápida; desde las 3 h puede observarse un encogimiento del volumen celular. Sin embargo, la pérdida celular comienza a observarse a partir de las 6 h (Fig. 9).

El volumen de la lesión alcanza su máximo a las 24 h (Fig. 10), ya que a tiempos posteriores, ésta no continúa extendiéndose. A las 72 h se observa la presencia de una cicatriz que podría corresponder a la presencia de células gliales (Fig. 9).

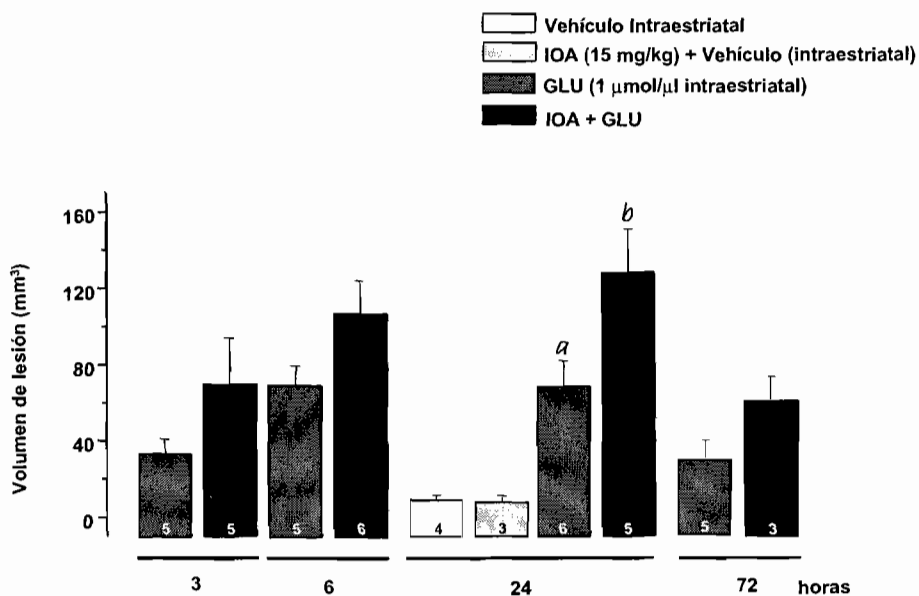


Fig. 11. Volumen de lesión ( $\text{mm}^3$ ) a las 3, 6, 24 y 72 h después de la inyección intraestriatal de GLU (1  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ) en ratas tratadas con IOA (15 mg/kg i.p. X 3 días), y en ratas control tratadas únicamente con GLU. El grupo indicado como vehículo muestra las ratas que recibieron una inyección intraestriatal con el amortiguador de fosfatos. El grupo de ratas indicado como IOA recibió el vehículo intraestriatal y el tratamiento crónico con el IOA. Las ratas tratadas por tres días con el IOA e inyectadas intraestriamente con GLU presentan volúmenes de lesión mayores que las ratas tratadas únicamente con GLU.  $a = p < 0.03$  en comparación con vehículo intraestriatal,  $b = p < 0.01$  en comparación con el grupo control inyectado con GLU.

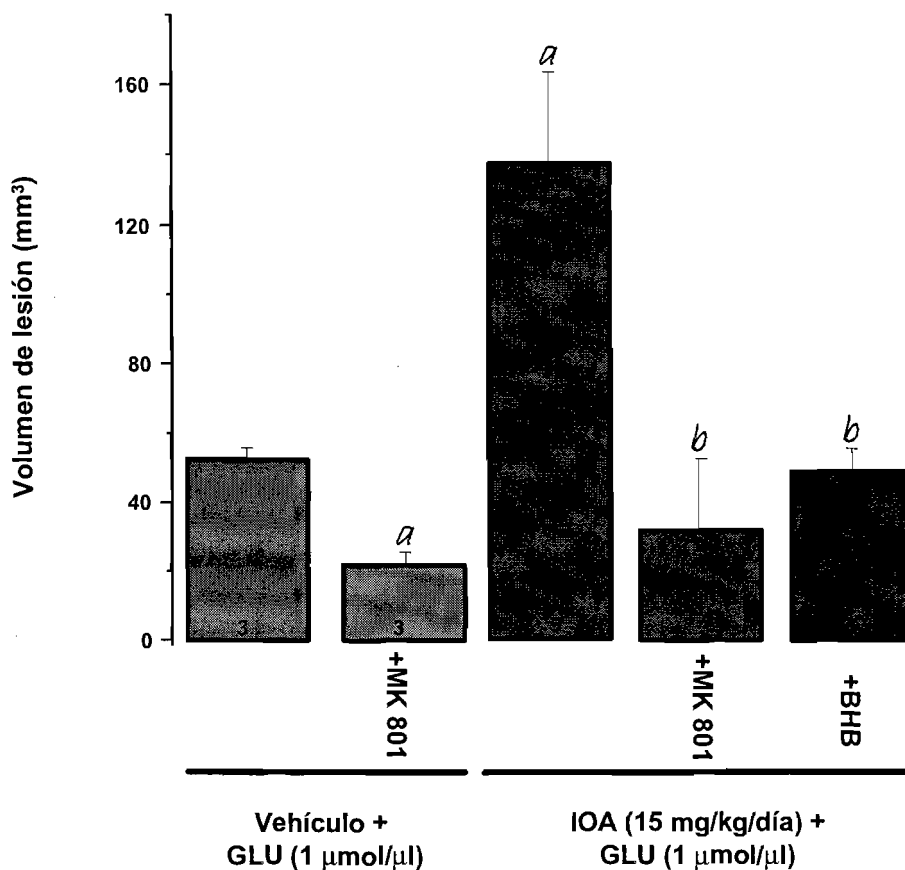


Fig. 12. Efecto neuroprotector del MK-801 y del  $\beta$ -hidroxibutirato sobre el daño neuronal evaluado 24 h después de la inyección de GLU (1  $\mu$ mol/ $\mu$ l) en ratas tratadas con IOA (15 mg/kg/día), o bien en ratas control no tratadas con IOA (vehículo + GLU). Las ratas tratadas con el MK-801 y con el  $\beta$ -hidroxibutirato presentaron volúmenes de lesión significativamente menores. El número al interior en cada barra indica la cantidad de ratas utilizadas en cada condición. *a* <0.05 en comparación con el grupo de vehículo + GLU. *b* <0.01 en comparación con el grupo de IOA+GLU.

Se cuantificó el volumen de lesión a las 3, 6 y 24 horas después de la administración de GLU en el estriado de ratas tratadas por tres días con IOA (15 mg/kg i.p.) y de ratas control (Fig. 11).



La lesión tiene una extensión de  $9 \text{ mm}^3$  cuando las ratas son inyectadas intraestriatalmente con vehículo y con amortiguador de fosfatos (10mM) i.p. Se determinó un volumen de lesión de  $8 \text{ mm}^3$  en las ratas tratadas por tres días con IOA e intraestriatalmente con vehículo (Fig. 11). A diferencia de las ratas tratadas intraestriatalmente con el vehículo, las ratas que recibieron una inyección de GLU ( $1 \mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ) mostraron una lesión entre  $50\text{-}70 \text{ mm}^3$  evaluada a las 24 h (Fig. 11 y 12).

Como se ha observado en trabajos previos del laboratorio, la lesión producida en el estriado a las 24 h después de la administración de GLU ( $1 \mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ) se exagera cuando las ratas son tratadas con IOA (Mejía, 2003). En el curso temporal de la muerte puede observarse el mismo fenómeno de facilitación tóxica desde las 3 y 6 h, después de la inyección de GLU, tiempo durante el cual la GADPH está inhibida (Figs. 9 y 11). El efecto facilitador del IOA alcanza a ser significativo a las 24 h cuando se compara con las ratas que sólo recibieron la inyección de GLU. A este tiempo la lesión es dos veces mayor que la producida por GLU en las ratas control, aunque no continúa progresando durante los siguientes dos días (Figs. 10 y 11).

Por otra parte, se probó el efecto protector del MK-801 (i.p.), un antagonista de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y del  $\beta$ -hidroxibutirato (i.v.), un cuerpo cetónico. Como puede observarse en la Figs. 10 y 12, el volumen de lesión se redujo significativamente en las ratas tratadas con dichos compuestos. Adicionalmente, el tratamiento con la vitamina E (i.p) mostró una reducción en el volumen de lesión (Figs. 10 y 16 A).

El MK-801 previno la muerte asociada a la administración tóxica del GLU, mostrando una reducción, estadísticamente significativa, en el volumen de lesión de  $52 \text{ mm}^3$  a  $21 \text{ mm}^3$ , lo que corresponde a un 59%. Adicionalmente, este compuesto mostró ser el más eficiente para prevenir el daño inducido por GLU en las ratas tratadas con IOA, ya que se obtuvo una disminución estadísticamente significativa del 75% en la extensión de la lesión con dicho tratamiento (Fig. 12).

De manera similar, se observó que las ratas tratadas con el inhibidor glucolítico y con el GLU que recibieron el tratamiento con BHB, redujeron el tamaño de sus lesiones en un 62%. Esta lesión corresponde a  $48 \text{ mm}^3$  y es similar en dimensión a la observada en las ratas control tratadas con GLU (Fig. 12). Finalmente, la Fig. 16 indica que el tratamiento con la vitamina E redujo en un 58% el volumen de lesión.

#### 4.0 Niveles de ATP

En la Fig. 13 se muestran los niveles de ATP estriatales en ratas tratadas con el inhibidor glucolítico 3 y 6 horas después de la administración del GLU.

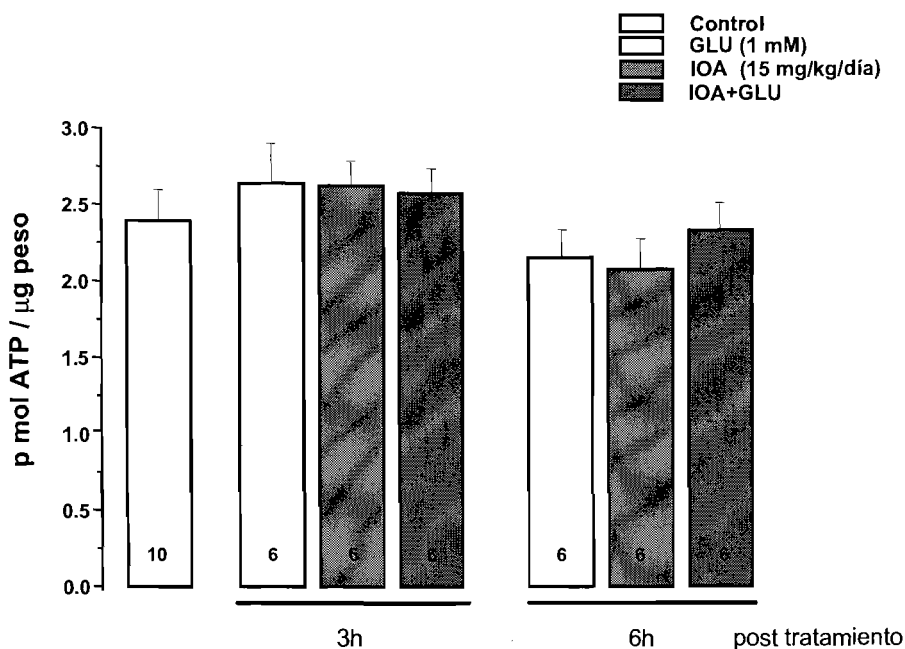


Fig. 13. Niveles de ATP en el estriado ipsilateral (IOA+GLU) y contralateral (IOA) de las ratas tratadas con el IOA 3 y 6 horas después de la administración del GLU. También se cuantificaron los niveles de ATP del estriado ipsilateral (GLU) y contralateral (control) de las ratas inyectadas únicamente con GLU.

Se cuantificaron los niveles de ATP en el hemisferio contralateral de las ratas tratadas con IOA y de las ratas intactas inyectadas únicamente con GLU, y se indican como IOA y control, respectivamente en la Fig. 13. Como se observa en esta figura, los niveles de ATP 6 horas después de concluir el tratamiento crónico con el IOA disminuyeron en un 13 %, aunque esta disminución no es significativa estadísticamente. En el caso de las ratas que recibieron la infusión de GLU en el estriado, se muestra también una ligera disminución no significativa del 10 % en los niveles de ATP a las 6 horas. Finalmente cuando se combinó la inyección intraestriatal de GLU con el tratamiento sistémico de IOA los niveles de ATP no mostraron cambios con respecto al control.

## 5.0 Lipoperoxidación

Finalmente se probó si la lipoperoxidación, como un indicador de estrés oxidativo, está implicada en el presente modelo de daño excitotóxico. Los niveles de lipoperoxidación, determinados en el estriado de la rata, incrementaron de manera significativa a las 3 horas después de la inyección del GLU, y se restablecieron a las 6 y 24 horas (Figs. 14 y 15).

Por otra parte, la lipoperoxidación se incrementó de manera sostenida de las 3 h hasta las 24 h cuando las ratas que recibieron la inyección con GLU fueron pretratadas con el IOA (Fig. 14 y 15). Esto sugiere que el tratamiento con el inhibidor glucolítico promueve el mantenimiento de niveles elevados de lipoperoxidación.

Como ya se mencionó, los niveles de lipoperoxidación a las 24 h se encontraron incrementados de manera significativa en un 27% en las ratas tratadas con IOA y con GLU intraestriatal. Este incremento se redujo de manera significativa en un 57% en las ratas tratadas con BHB. (Fig. 15). De manera similar, dicho incremento se previno cuando las ratas fueron tratadas con el antioxidante, vitamina E (100 mg/kg) durante 7 días, mostrando una disminución del 40% (Fig. 16 B).

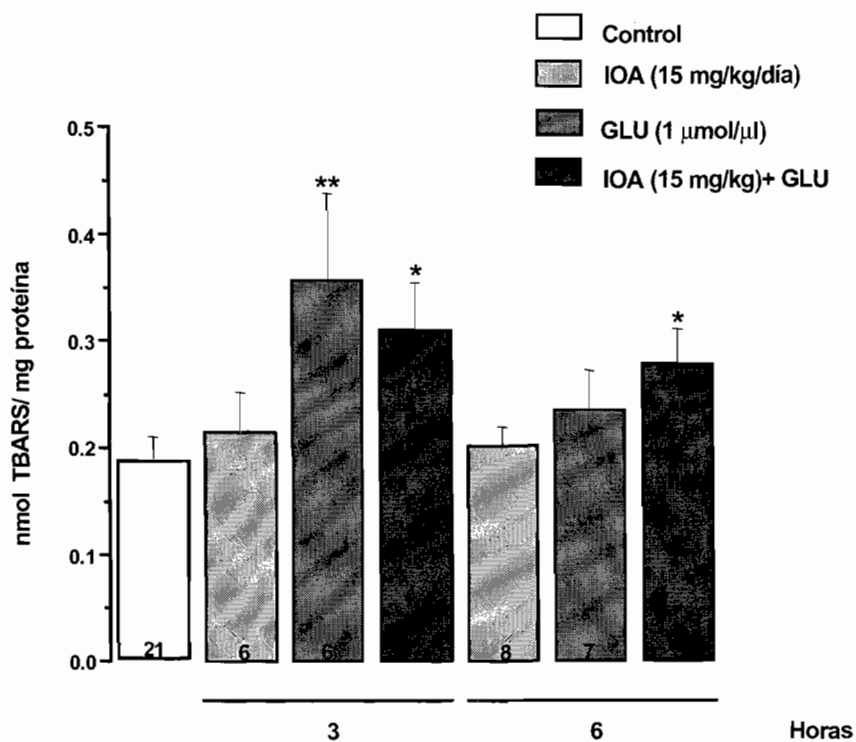


Fig. 14. Niveles de lipoperoxidación determinada a las 3 y 6 h después de la inyección intraestriatal de glu, en ratas tratadas por tres días con IOA, o bien en ratas control. También se cuantificó la lipoperoxidación en el hemisferio contralateral de estas ratas (IOA y control, respectivamente). Los números dentro de las barras indican la cantidad de ratas utilizadas en cada condición. \* $p < .05$  en comparación con el grupo control. \*\* $p < .001$  en comparación con el grupo control.

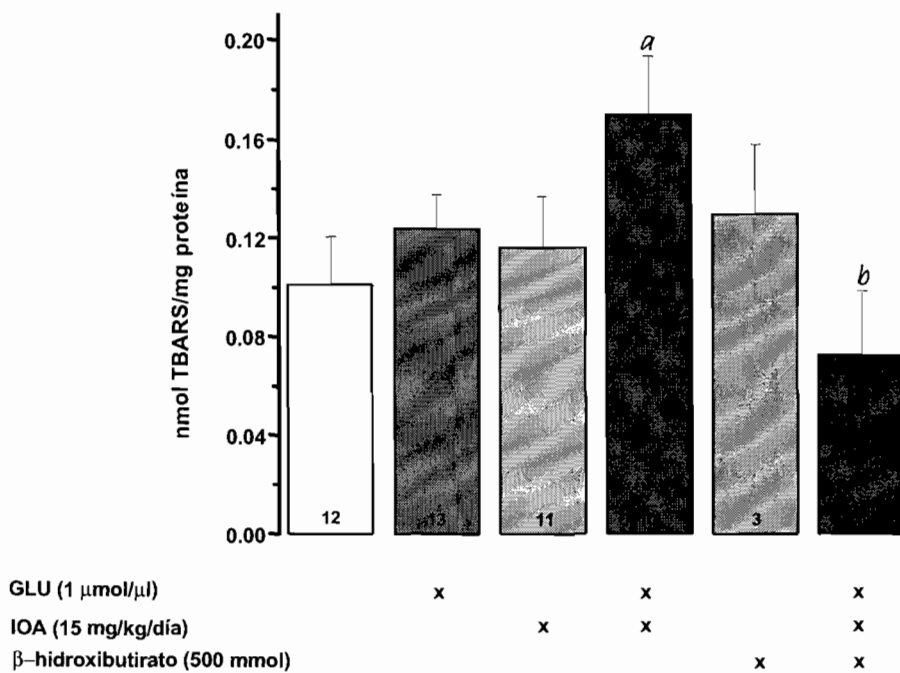


Fig. 15. Efecto del BHB sobre los niveles de lipoperoxidación determinados a las 24 h, en ratas tratadas por tres días con IOA después de ser inyectadas con GLU intraestriatal. Las ratas tratadas con BHB presentan una disminución en los niveles de lipoperoxidación. El número al interior de cada barra muestra la cantidad de ratas utilizadas en cada condición. *a*  $p < .01$  en comparación con el grupo de GLU. *b*  $p < .01$  en comparación con el grupo de IOA + GLU.

Como un control positivo del incremento en la lipoperoxidación, se inyectó de manera aguda en el estriado de las ratas sulfato ferroso (20 nmol/ $\mu$ l), y con fines comparativos IOA (50 nmol/ $\mu$ l) en un dosis tóxica. Los resultados indican que el IOA intraestriatal produjo un incremento del 35 % en los niveles de lipoperoxidación respecto a los niveles basales (Tabla 1), 1 h después de su administración, tiempo en el que la enzima GADPH se encontró inhibida en un 39% (Fig. 8 C).

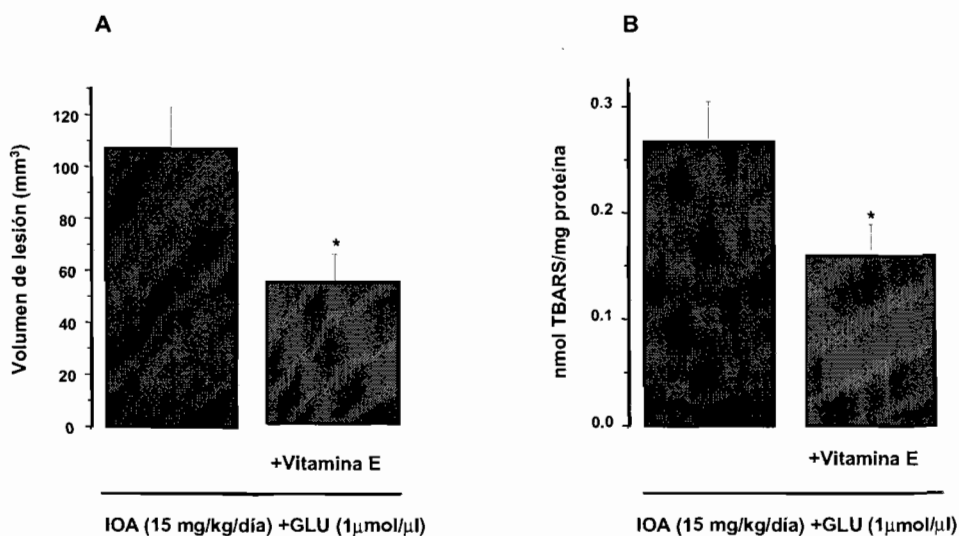


Fig. 16. Efecto de la vitamina E sobre el volumen de lesión (A) y los niveles de lipoperoxidación (B) determinados a las 24 h, en ratas tratadas por tres días con IOA y con GLU intraestriatal. Las ratas tratadas con vitamina E presentan una disminución en los niveles de lipoperoxidación. El número al interior de cada barra muestra la cantidad de ratas utilizadas en cada condición. Se utilizó una prueba estadística de t de student para analizar el efecto de la vitamina E. \* $p < .05$  en comparación con el grupo control.

Tabla 1

---

**Niveles de lipoperoxidación en el estriado de las ratas tratadas y las ratas control  
(nmol TBARS/mg proteína)**

---

<b>Control</b>	<b>(6)</b>	<b>0.063±0.014</b>
<b>IOA intraestriatal (50 nmol/μl)</b>	<b>(6)</b>	<b>0.097±0.032*</b>
<b>FeSO<sub>4</sub> (20 nmol/μl)</b>	<b>(2)</b>	<b>1.194±0.281</b>

---

Los niveles de lipoperoxidación fueron determinados 1 h después de la inyección intraestriatal de FeSO<sub>4</sub> ó IOA. \*p<0.05 en comparación con los niveles control. El número entre paréntesis indica la cantidad de ratas tratadas en cada condición.

Sin embargo, el mayor incremento en los niveles de lipoperoxidación se alcanzó con el sulfato ferroso (Tabla 1), un compuesto que facilita la lipoperoxidación al inducir la reacción de Fenton que produce el radical hidroxilo (Fig. 6).

## VI. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la participación del metabolismo glucolítico en la muerte neuronal excitotóxica. Como se esperaba, el tratamiento durante tres días con IOA (15 mg/kg) disminuyó la actividad de la enzima GADPH, lo cual sugiere una alteración metabólica derivada de dicha inhibición. La actividad de la GADPH se inhibe progresivamente a lo largo del tratamiento, encontrando una inhibición máxima (45%) una hora después de última inyección de IOA. Es posible que la síntesis *de novo* de la GADPH esté mediando la recuperación de la actividad de la enzima que se observa a las 24 h.

El IOA es un compuesto alcalino que inhibe el sitio activo de la GADPH de manera irreversible. La reacción que normalmente lleva a cabo la enzima en la glucólisis, convierte al gliceraldehído 3- fosfato en gliceraldehído 1, 3 difosfoglicerato y forma de NADH. De aquí que la inhibición de dicha reacción bloquea la producción de piruvato, que participa como sustrato energético en el ciclo de Krebs, y la producción de NADH. Se sabe que cada glucosa oxidada por la vía aeróbica genera 38 moléculas de ATP, mientras que la vía anaeróbica contribuye, a través de la glucólisis, con tan sólo 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa metabolizada. A pesar de que el aporte energético de la vía anaeróbica es menor al de la vía aeróbica, existen estudios que sugieren que el ATP glucolítico es utilizado para mantener el funcionamiento de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La falla en esta bomba como consecuencia, por ejemplo, de la alteración en el metabolismo glucolítico, podría favorecer la pérdida del gradiente de  $\text{Na}^+$ , produciendo la despolarización de las neuronas. Secundario a este efecto se podría favorecer la liberación de aminoácidos excitadores o bien favorecer la activación del receptor de tipo NMDA, ya que su activación depende de un cambio de voltaje.

Previamente se había mostrado la capacidad del IOA de inhibir la actividad de la enzima con una administración directa en el estriado de la rata (Mattheus *et al.*, 1997), y en este trabajo se reprodujo dicho resultado, encontrando una inhibición del 40% en la actividad de la GADPH, 1 h después de la inyección intraestriatal de IOA. El tratamiento sistémico que utilizamos en este estudio fue modificado del previamente reportado por Massieu *et al* (2000) que consistió en una administración de 25 mg/kg durante cuatro días. En este estudio la dosis se redujo a 15 mg/kg con el fin de reducir el efecto sistémico en las ratas, y la mortalidad de las mismas. Además, este es el primer estudio que indica que la actividad de la enzima GADPH en el estriado puede ser inhibida con el tratamiento sistémico de IOA. Estudios previos en nuestro laboratorio indican que el mismo tratamiento sistémico puede inhibir la actividad de la enzima en el hipocampo en un 48%, lo cual sugiere que el efecto inhibitor del IOA se encuentra generalizado en todo el cerebro.



Por otra parte, de acuerdo a la observación histológica del tejido, la citoarquitectura del estriado de las ratas tratadas únicamente con IOA no muestra ninguna alteración evidente a pesar de que la enzima llega a inhibirse hasta en un 45 %. Esto indica que por sí mismo, el IOA administrado de manera sistémica durante tres días es capaz de alterar el metabolismo glucolítico, pero esto no produce de manera directa la muerte de las neuronas; simplemente la facilita ante un reto excitotóxico.

Por otro lado, se quiso comparar el efecto del IOA (15 mg/kg, i.p) administrado durante tres días con el tratamiento agudo (50 nmol/ $\mu$ l), el cual consistió en inyectar el inhibidor de forma directa en el estriado de la rata. Como se pudo observar en la Fig. 8 C la inhibición enzimática que se alcanza es similar (39%) en ambos tratamientos (45% al tercer día y 39% 1 h después de la administración intraestriatal). Sin embargo, la administración aguda produce una lesión prominente en el estriado. Podría especularse, que la diferencia en el daño producido por ambos tratamientos, se debe a que en el primero se inhibe gradualmente la actividad de la enzima, y con el tratamiento agudo la enzima se inhibe súbitamente, lo que impide que se activen mecanismos compensatorios, como por ejemplo la maquinaria antioxidante, que contrarresten la formación de especies reactivas de oxígeno. Además, el yodoacetato pudo alcanzar una concentración mayor al ser inyectado intraestriatalmente que al administrarse en forma sistémica. En un estudio previo Matthews (1997) mostró que el IOA (50 nmol/ $\mu$ l) inyectado de forma directa en el estriado de la rata incrementa la producción del radical hidroxilo. Además los radicales libres pueden a su vez dañar aún más la actividad de la GADPH (Chan y Bielski, 1980; Lind *et al.*, 1998).

Por otro lado, en este trabajo se descarta la posibilidad de que el tratamiento crónico con el IOA genere por sí mismo especies reactivas de oxígeno que produzcan lipoperoxidación, ya que los resultados indican que en las ratas tratadas con el IOA, los niveles de lipoperoxidación se mantienen similares a los de las ratas control a lo largo del tiempo. Sin embargo no descartan la posible producción de especies de oxígeno o de nitrógeno aunque no se genere daño a lípidos.

Conocer la participación del metabolismo glucolítico, y en especial de la enzima GAPDH en la muerte neuronal excitotóxica es importante, ya que en diversos estados patológicos existe una disminución en el metabolismo energético. En la isquemia cerebral en la penumbra existe una disminución en el metabolismo a consecuencia de la disminución del aporte de oxígeno y glucosa. En la hipoglucemia aguda, la reducción abrupta de la oxidación de la glucosa en el cerebro está asociada con daño excitotóxico (Sandberg, 1986).

Por otro lado, se encontró que la GAPDH interactúa con la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide, proteína asociada con la enfermedad de Alzheimer (Schulze *et al.*, 1993), y con la Huntingtina, proteína asociada con la enfermedad de Huntington, en la región rica en glutaminas (Burke *et al.*, 1996). Un estudio sugiere que la interacción de estas proteínas con la enzima GAPDH produce un decremento en su actividad (Mazzola y Sirover, 2001), lo cual sugiere que un mecanismo de muerte por excitotoxicidad secundaria podría estar asociado a las enfermedades de Alzheimer y de Huntington.

Por otra parte, se ha establecido como una de las causas principales de la muerte neuronal excitotóxica, un aumento en la liberación de GLU, una alteración en su remoción extracelular, o la activación prolongada de sus receptores. Estudios confirman esta asociación, ya que durante la isquemia cerebral y la hipoglucemia, los niveles de GLU se incrementan de manera significativa (Benveniste *et al.*; 1984, Sandberg *et al.*; 1986). Además, la muerte en dichos modelos es prevenida por el uso de antagonistas glutamatérgicos del receptor de tipo NMDA, lo cual reafirma la relación entre la activación de dicho receptor y la muerte neuronal. En el presente estudio se utilizó una dosis tóxica de GLU (1  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ), que como puede observarse en las Figs. 9 y 10 progresa a lo largo del tiempo. Los resultados sugieren que el efecto tóxico del GLU puede estar relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno, ya que dicho aminoácido incrementa de manera significativa los niveles de lipoperoxidación en el estriado 3 h después de su administración. Aunque dicho efecto es transitorio, el daño membranal es un factor que puede contribuir a la neurodegeneración observada. El mecanismo de muerte neuronal excitotóxica se caracteriza por la

activación de los receptores de tipo NMDA; ésto a su vez desencadena la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol lo que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (Lafon-Cazal *et al.*, 1993), ya sea por la activación de la xantina oxidasa, de la ON sintasa, o debido al daño mitocondrial. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  induce la activación de endonucleasas y fosfolipasas, contribuyendo a la muerte. En este estudio se evaluó únicamente la presencia de lipoperoxidación, pero es posible que la presencia de radicales libres afecte otros elementos distintos a la membrana celular, como son las proteínas o el DNA.

A pesar de que el incremento en los niveles de GLU es un factor indispensable para que se desencadene la muerte neuronal excitotóxica, es fundamental la presencia de un segundo factor, la alteración metabólica (Zeevalk y Nicklas, 1991; Greene y Greenamyre, 1996; Sánchez-Carbente y Massieu, 1999; Massieu *et al.*, 2000). Creemos que al manipular estas dos variables estamos mimetizando procesos de muerte neuronal asociadas con el daño excitotóxico, como es el caso de la hipoglucemia y de la isquemia cerebral. Como puede observarse en las Figs. 9 y 10, la presencia de una inhibición metabólica exagera el volumen de lesión al doble en relación a la lesión inducida solo por GLU. Esta facilitación del daño resulta evidente desde las tres horas, aunque es a las 24 horas donde ésta resulta significativa. Este incremento en el volumen de lesión podría deberse a que, por un lado, el IOA al favorecer la despolarización celular, permite la activación del receptor de tipo NMDA, la cual se mantiene debido a la presencia de niveles altos de GLU en el espacio extracelular. Estudios de nuestro laboratorio indican que los niveles extracelulares de GLU y aspartato aumentan progresivamente en el hipocampo de la rata durante el tratamiento sistémico de IOA (Camacho *et al.*, en preparación). La exacerbación de la muerte excitotóxica confirma resultados previos que muestran que la alteración en el metabolismo glucolítico y/o mitocondrial exagera la muerte producida por el GLU o por inhibidores de su recaptura (Zeevalk y Nicklas, 1992, Greene y Greenamyre, 1996, Sánchez-Carbente y Massieu, 1999, Massieu *et al.*, 2000). Los resultados de este trabajo sugieren una relación entre la muerte neuronal y el incremento sostenido en los niveles de lipoperoxidación, ya que éstos se mantienen elevados de manera

significativa desde las 3 hasta las 24 h después de que el GLU es inyectado en ratas previamente tratadas con el inhibidor glucolítico. Como previamente se ha mencionado, el ión  $\text{Ca}^{2+}$  activa de forma directa a la sintasa del óxido nítrico que forma  $\cdot\text{ON}$ , y a la xantina oxidasa que produce  $\cdot\text{O}_2^-$  (Atlante *et al.*, 2001). Estos radicales libres, pueden a su vez producir otros radicales libres que generen un estado de estrés oxidativo, cuya manifestación sea, por ejemplo el daño membranal a través de un proceso de lipoperoxidación (Warner *et al.*, 2004). Es posible que en condiciones de deficiencia energética, la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por el GLU, ocurra de manera descontrolada y que su incremento no pueda ser compensado con la maquinaria antioxidante celular. Los resultados obtenidos refuerzan esta hipótesis, ya que el tratamiento con vitamina E, un antioxidante, puede prevenir de manera parcial la muerte neuronal producida por GLU en ratas tratadas con IOA, y reducir los niveles de lipoperoxidación. Esto sugiere que la vitamina E preserva la integridad membranal, y favorece la sobrevivencia de las neuronas. Por otro lado, los resultados reafirman que el tratamiento con vitamina E puede funcionar como un fármaco antioxidante durante la muerte neuronal de tipo excitotóxica como previamente se ha demostrado (Mishima *et al.*, 2003; García y Massieu, 2001; Massieu *et al.*, 2003 b).

Es importante destacar que los resultados confirman que la muerte neuronal excitotóxica durante la inhibición glucolítica esta mediada principalmente por la activación de los receptores de tipo NMDA, ya que el tratamiento con el MK-801 previene en un 75% la muerte observada. Esta neuroprotección puede deberse a que el fármaco utilizado es un antagonista de los receptores de tipo NMDA, que bloquea los eventos intracelulares que se desencadenan después de su activación.

Por otro lado, las microfotografías a las 72 h en la Fig. 9 y 11 muestran que en el tejido lesionado de las ratas inyectadas con GLU y previamente tratadas con el inhibidor glucolítico, se observa la repoblación celular de la zona dañada. Es posible que dicho proceso de cicatrización, que también se observa a las 48 h (datos no mostrados), se deba a la migración o a la proliferación de células gliales

que se encuentren fagocitando los restos de las células muertas y ayudando a formar la cicatriz.

Es importante recalcar que aunque los niveles de ATP en las ratas tratadas únicamente con GLU no disminuyen de manera significativa, si muestran una tendencia a disminuir 6 h después de su administración. Se conoce que dosis altas de GLU pueden disparar vías cuyo resultado final sea el daño mitocondrial y como consecuencia ocurra una falla energética celular. En nuestras condiciones experimentales, no fue posible observar una disminución mayor en los niveles de ATP, probablemente debido a que se hizo la disección del estriado completo mientras que la lesión se circunscribe a la región medial dorsal del estriado. Esto favorece que los niveles de ATP reales correspondientes a la región lesionada sean enmascarados.

Por otra parte, el tratamiento con el cuerpo cetónico, el BHB, previno el aumento de los niveles de lipoperoxidación monitoreados a las 24 h. En un estudio preliminar se comprobó que el BHB es capaz de incrementar los niveles de ATP cuando las ratas son tratadas con el IOA, sugiriendo que el BHB es capaz de restablecer el estado energético en un tiempo temprano, después del tratamiento (Mejía, 2003). El restablecimiento del equilibrio energético podría estar manteniendo funciones que prevengan el incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, que desencadenen la lipoperoxidación, ya que el cuerpo cetónico logró disminuir los niveles de malondialdehído. El BHB puede convertirse en acetil-CoA y fungir como sustrato energético en el ciclo de Krebs. Adicionalmente durante el metabolismo del BHB se produce un NADH más al convertirse en acetoacetato, otro cuerpo cetónico.

Estudios previos confirman la capacidad del BHB de funcionar como neuroprotector en un modelo de hipoxia (Wada *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2001, 2002) o durante la inhibición glucolítica (Izumi *et al.*, 1998). Paralelamente, el BHB se ha utilizado como neuroprotector en un modelo *in vitro* de neurodegeneración inducida por el fragmento activo de la proteína  $\beta$ -amiloide o por el MPP+ relacionada con la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, respectivamente (Kashiwaya *et al.*, 2000). Un estudio *in vivo* indica que en un modelo de daño

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

inducido por la toxina MPTP, relacionada con la enfermedad de Parkinson, el BHB es capaz de incrementar los niveles de ATP y de restablecer el consumo de oxígeno mitocondrial (Tieu *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha reportado que durante el metabolismo de los cuerpos cetónicos se favorece la oxidación de la coenzima Q, la cual es considerada como una de las principales generadoras de radicales libres en la mitocondria. Esto ocurre de la siguiente forma: durante la fosforilación oxidativa la semiquinona  $Q_{10}$  reacciona con el oxígeno para formar  $\cdot O_2^-$ . Es posible que la reducción en los niveles de lipoperoxidación observados se deba a que a través del metabolismo del BHB se promueva una disminución de coenzima  $Q_{10}$  reducida, y así se contrarreste la formación de radicales libres; como consecuencia final la lipoperoxidación también se reduciría (Veech *et al.*, 2001)

## VII. CONCLUSIONES

La alteración del metabolismo glucolítico a través de la inhibición de la GADPH induce un estado de estrés oxidativo sostenido, que se expresa como un aumento en la lipoperoxidación, lo que facilita la muerte neuronal excitotóxica. El restablecimiento del equilibrio metabólico a través del  $\beta$ -hidroxibutirato, posiblemente al restituir el estado energético, previene el estrés oxidativo, lo cual promueve la sobrevivencia neuronal. El uso de una estrategia antioxidante, durante la inhibición glucolítica, como es la administración de la vitamina E, previene la muerte excitotóxica al contrarrestar la formación de especies reactivas de oxígeno.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, CH., Swanson, R. (2000). Astrocyte glutamate transport. *Glia* 82: 1-14.

Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Gianattasio, S., Marra, E., Passarella, S. (2001). Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 497: 1-5.

- Balcar, V. (2002). Molecular pharmacology of the Na<sup>+</sup>-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol Pharm Bull* 25: 291-301.
- Beal, M. F. (2000). Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosci* 23: 298-304.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer, NH. (1984). Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1368-1374.
- Bittigau, P., Ikonomidou, Ch. (1997). Glutamate in neurological diseases. *J Child Neurol* 12: 471-484.
- Bough, K., Yao, S., Eagles, D. (2000). Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. *Epilepsy Res* 38: 15-25.
- Burke, J., Enghild, J., Martin, M. (1996). Huntintin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 2:347-350.
- Chan, P., Bielski, B. (1980). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by perhydroxyl radicals. *J Biol Chem* 255:874-876.
- Choi, D. (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurosci* 11:465-69.
- Choi, D. (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurol* 23: 1261-1276.
- Clarke, D., Sokoloff, L. (1999). Circulation and energy metabolism of the brain. *Basic Neurochemistry*. George Siegel, Bernard Agranoff, Wayne Albers, Michael Uhler (eds.). 6ed. Lippincott Williams y Wilkins, EUA. cap. 31. 638-669.
- Daikhim, Y., Yudkoff, M. (1998). Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Develop Neurosci* 20: 358-364.
- Dawson, L., Djali, S., Gonzales, C., Viniegra, M., Zaleska, M. (2000). Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull* 53: 767-776.

- Dingledine, R. y McBain, Ch. (1999). Glutamate and aspartate. Basic Neurochemistry. George Siegel, Bernard Agranoff, Wayne Albers, Michael Uhler (eds.) 6ed. Lippincott Williams y Wilkins, EUA. cap 15. 316-332.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends in neurosci 22: 391-397.
- Dugan, L., Choi, D. (1999). Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. Basic neurochemistry. George Siegel, Bernard Agranoff, Wayne Albers, Michael Uhler (eds.) 6ed. Lippincott Williams y Wilkins, EUA. cap. 34. 712-729.
- Gagliardi, R. (2000). Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. Arch. Neuropsiquiatr 58(2B): 583-588.
- García, O., Massieu, L. (2001). Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate- induced neuronal damage during energy impairment *in vitro*. J Neurosci Res 64: 418-428.
- Gemba, T., Oshima, T., Ninomiya, M. (1994). Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. Neuroscience 63: 789-795.
- Gjedde, A., Crone, CH. (1975). Induction process in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. Am J Physiol 229: 1165-1169.
- Gluck, M., Jayatilleke, E., Shaw, S., Rowan, A., Haroutunian, V. (2000) CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. Epilepsy Res 39:63-71.
- Greene, J., Greenamyre, J. (1996). Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. Prog Neurobiol 48: 613-634.
- Guzmán, M., Blázquez, C. (2001). Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle. Trends in Endocrinol and Metab 12: 169-173.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 59:1609-1623.
- Hara, H., Sukamoto, T., Kogure, K. (1993). Mechanism and patogénesis of ischemia induced neuronal damage. Prog Neurobiol 40:645-670.
- Hawkins, R., Mans, A., Davis, D. (1986). Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. Am J Physiol. (endocrinol. Metab.13) 250: E169-E178.



- Hawkins, R., Williamson, D., Krebs, H. (1971). Ketone- body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J* 122: 13-18.
- Holz, R., Fisher, S. (1999). Synaptic transmissi3n and cellular signaling an overview. *Basic neurochemistry*. George Siegel, Bernard Agranoff, Wayne Albers, Michael Uhler (eds.). 6ed. Lippincott Williams y Wilkins, EUA. cap. 10. 192-214.
- Hori, A., Tandon, P, Holmes, G., Stastrom, C. (1997). Ketogenic diet: Effects on expression of kindled seizures an behavior in adult rats. *Epilepsia* 38: 750-758.
- Ikemoto, A., Bole, D., Ueda, T. (2003). Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem* 278:5929-5940.
- [INEGI.2001.http://www.inegi.gob.mx/](http://www.inegi.gob.mx/)
- Izumi, Y., Ishii, K., Katsuki, H., Benz, A., Zorumski, Ch. (1998).  $\beta$ -hydroxybutyrate fuels synaptic function during development. *J Clin Investi* 101: 1121-1132.
- Kammula, R. G. (1976). Metabolism of ketone bodies by ovine brain in vivo. *Am J Physiol* 231: 1490-1494.
- Kanai, Y. (1997). Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr Op Cell Biol* 9: 565-572.
- Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., Veech, R. (2000). D- $\beta$ -hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer and Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5440-5444.
- Kirsch, J., D'Alecy, L. (1984). Hypoxia induced preferential ketone utilization by rat brain slices. *Stroke* 15: 319-323.
- Lafon-Cazal, M., Pietro, S., Culcasi, M., Bockaert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M. (2004). Fatty acid catabolism. *Principles of Biochemistry*. 4 ed. Hard Cover, EUA.
- Lind, CH., Verdes, R., Schuppe-Kois, I., Cotgreave, I. (1998). Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochim Biophys Res Comm* 247:481-486.
- Lo, E., Dalkara, T., Moskowitz, M. (2003). Mechanisms, Challenges and opportunities in stroke. *Nature Rev* 4:399-411.

- Magistretti, P. (1999). Brain energy metabolism. *fundamental neuroscience*. Michael Zigmond, Floyd Bloom, Story Landis, James Roberts y Larry Squire (eds). Academic Press. EUA. Cap. 14. 389-413.
- Massieu, L., Gómez-Román, N., Montiel, T. (2000). *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 165: 257-267.
- Massieu, L., Haces, M., Montiel, T., Hernández-Fonseca, K. (2003a). Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365-378.
- Massieu, L., Montiel, T., del Río, P., Hernández, K., Haces, M., García, O., Camacho, A., Mejía, J. (2003b). Role of energy metabolism in neuronal death associated with cerebral ischemia and neurodegenerative diseases, and its prevention by energy substrates. *Recent Res Devel Neurochem* 6:81-104.
- Masuda, R., Monahan, J., Kashiwaya, Y. (2005).  $\Delta$ - $\beta$ -hidroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J Neurosc Res* 80:501-509.
- Matthews, R., Ferrante, R., Jenkins, B., Browne, S., Goetz, K., Berger, S., Chen, Y., Beal, F. (1997). Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J Neurochem* 69: 285-289.
- Mazzola, J., Sirover, M. (2001). Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease fibroblasts. *J. Neurochem* 76: 442-449.
- Mcintosh, T., Saatman, K., Raghupathi, R. (1997). Calcium and the pathogenesis of traumatic CNS injury: cellular and molecular mechanism. *Neuroscientist* 3: 169-175.
- Mejía, T. J (2003). Efecto de sustratos metabólicos sobre los niveles energéticos cerebrales y la muerte neuronal excitotóxica en un modelo de inhibición glicolítica. Tesis de Licenciatura. Fac. de Psicología. UNAM
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog neurobiol* 54:369-415.

- Mishima, K., Tanaka, T., Pu, F., Egasira, N., Iwasaki, K., Hidaka, R., Matsunaga, K., Takata, J., Karube, Y., Fujiwara, M. (2003). Vitamin E isoforms  $\alpha$ -tocotrienol and  $\gamma$ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neurosci Lett* 337:56-60.
- Nehlig, A. (1996). Respective roles of glucosa and ketone bodies as substrates for cerebral energy metabolism in the suckling rat. *Dev Neurosci* 18: 426-433.
- Novelli, A., Reilly, J., Lysko, P., Henneberry, R. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451: 205-212
- Obrenovitch, T., Urenjak, J., Richards, D., Ueda, Y., Curzon, G., Symon, L. (1993). Extracellular neuroactive amino acids in the rat striatum during ischemia: comparison between penumbral conditions and ischemia with sustained anoxic depolarisation. *J Neurochem* 6:178-186.
- Olney, J. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 64: 719-721.
- Osakada, F., Hashino, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Akaike, A. (2003). Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *Eur J Pharmacol* 465:15-22.
- Owen, O., Morgan, A., Kemp, H., Sullivan, J., Herrera, M., Cahill, G. (1967). Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46: 1589-1595.
- Pan, J., Bebin, E., Chu, W., Hetherington, H. (1999). Ketosis and epilepsy:  $^{31}\text{P}$  Spectroscopic imaging at 4.1 T. *Epilepsia* 40: 703-707.
- Pan, J., Telang, F., Lee, J., Graaf, R., Rothman, D., Stein, D., Hetherington. (2001). Measurement of  $\beta$ -hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. *J Neurochem* 79: 539-544.
- Paschen, W., Douthell, J. (2000). Disturbances of Functioning of Endoplasmic reticulum a key mechanism underlying neuronal cell injury?. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1-13.
- Patel, M., Owen, O. (1976). Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. *Biochem J* 156: 603-607.
- Patel, M., Owen, O. (1977). Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. *J Neurochem* 28: 109-114.

- 
- Paxinos, G., Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney.
- Pellerin, L., Halestrap, A., Pierre, K. (2005). Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* 79:55-64.
- Phillis, J., Ren, J., O'Regan, M. (2000). Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res* 868:105-112.
- Pollay, M., Stevens, A. (1980). Starvation-induced changes in transport of ketone bodies across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 5: 163-172.
- Robinson, A., Williamson, D. (1980). Physiological roles of ketones bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60: 143-183.
- Sánchez-Carbente, M., Massieu, L. (1999). Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem* 72:129-138.
- Sandberg, M., Butcher, S., Hagberg, H. (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47:178-84.
- Sandberg, M., Butcher, S., Hamberger, A. (1985). Metabolically derived aspartate-elevated extracellular levels *in vivo* in iodacetate poisoning. *J Neurosci Res* 13: 489-495.
- Schulze, H., Schuler, A., Stuber, D., Dobeli, H., Langen, H., Huber, G. (1993). Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J Neurochem* 60:1915-1922.
- Seki, Y., Feustel, P., Keller, R., Tranmer, B., Kimelberg, H. (1999). Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433-440.
- Siesjö, B., Hu, B., Kristian, T. (1999). Is cell death triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum?. *J Cereb Blood Flow and Metab* 19: 19-26.

- Sirover, M. (1997). Role of glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in normal cell function and in the pathology. *J Cell Biochem* 66: 133-140.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Kitamura, Y., Mori, S., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A., Hiraide, A. (2002).  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *J Pharmacol* 89: 36-43.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A., Hiraide, A. (2001). Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *J Pharmacol* 87: 143-150.
- Tagami, M., Ikeda, K., Yamagata, K., Nara, Y., Fujino, H., Kubota, A., Numano, F., Yamori, Y. (1999). Vitamin E prevents apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* 79: 609-615.
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D., Yan, S., Naini, A., Vila, M., Przedborski. (2003). D- $\beta$ -hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J. Clin. Inv* 112:892-901.
- Vandecasteele, G., Szabadkai, G. Hirsuto, R. (2001). Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life* 52: 213-219.
- Veech, R. L., Chance, B., Kashiwaya, Y., Lardy, H., Cahill, G. (2001). Ketones bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB life* 51: 241-247.
- Vergun, O., Han, Y., Reynolds, I. (2003). Glucose deprivation produces a prolonged increase in sensitivity to glutamate in cultured rat cortical neurons. *Exp Neurol* 183:682-694.
- Villalobos, M., De la cruz, J., Carrasco, T., Smith-Agreda, J., Sánchez de la Cuesta. (1994). Effects of  $\alpha$ -tocopherol on lipid peroxidation and mitochondrial reduction of tetraphenyl tetrazolium in the rat brain. *Brain Res Bull* 33:313-318.
- Wada, H., Okada, Y., Nabetani, M., Nakamura, H. (1997). The effects of lactate and  $\beta$ -hydroxybutyrate on the energy metabolism and neural activity of hippocampal slices from adult and immature rat. *Dev Brain Res* 101: 1-7.

- Wang, X., Quinn, P. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 38:309-336.
- Warner, D., Sheng, H., Batinic-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants and ischemia brain. *J Exp Biol* 207:3221-32331.
- Yamamoto, M., Shima, T., Uozumi, T., Sogabe, T., Yamada, K., Kawasaki, T. (1983). A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of  $\alpha$ -tocopherol administration. *Stroke* 14:977-982.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., Nissim, I. (2001). Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci Res* 66:272-281.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., Nissim, I. (2001). Ketogenic diet, amino acid metabolism, and seizure control. *J Neurosci Res* 66:931-940.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., Nissim, I. (2004). Ketogenic diet, brain glutamate metabolism and seizure control. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty acids* 70:277-285.
- Zeevalk, G., Nicklas, W. (1991). Mechanism underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 870-878.