



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTOS DE LA HIPOGLUCEMIA TRANSITORIA INDUCIDA
POR 2-DG SOBRE LA ACTIVACIÓN GLIAL Y
PROLIFERACIÓN CELULAR DE HIPOCAMPO DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

PABLO VALLE LEIJA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LIMEI ZHANG

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 2007



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.

DEDICATORIA

A mis padres Eduardo y Marta Cristina por haberme traído a este mundo

A mis hermanos Eduardo, Anapaola e Ivan porque aún estando tan lejos siguen estando tan cerca

A Ana Lilia por su apoyo incondicional, y sus papás por compartir interés y brindarme su apoyo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos y cada uno de aquellos que hicieron posible la realización de esta tesis de licenciatura.

Al programa de becarios de tesis de licenciatura de DGAPA, ya que por medio del Dr. Arturo Vega González fue posible obtener una beca.

A la Dra. Limei Zhang, por permitirme concluir la tesis y haber comandado la realización de la misma.

A Felipe Estrada Zaleta y Aleph Corona Morales, por haber participado en los experimentos de la tesis.

A Pablo Hoffman y a Arturo Vega, porque cuando el agua hierve de más solo hay que apagar el fuego.

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Comunicación Intercelular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, a cargo de la Dra. Limei Zhang. El trabajo fue realizado con la colaboración directa de Felipe Estrada Zaleta y Aleph Corona Morales, además del autor de la tesis y su directora. El desarrollo de este proyecto de investigación fue apoyado por el donativo de PAPIIT IN224407 del Dr. Arturo Vega, del cual se obtuvo también una beca de tesista de licenciatura para el autor de la tesis, y los donativos de PAPIIT IN210406 y CONACYT 46141-M de la Dra. Zhang.

ÍNDICE

1. Resumen.	6
2. Introducción.	7
2.1 Hipocampo.	7
2.2 Neurogénesis en el giro dentado del cerebro adulto.	9
2.2 Glia.	12
2.2.1 Generalidades sobre glia.	12
2.2.2 Astroglia.	13
2.2.3 Activación astrocítica	17
2.3 Metabolismo de glucosa en el cerebro.	18
2.3.1 Barrera Hematoencefálica y transporte de glucosa.	18
2.3.2 Efectos de la hipoglucemia transitoria en el cerebro y formas de inducción.	20
2.3.3 Hipoglucemia inducida por 2-DG como modelo experimental.	23
3. Planteamiento del problema.	26
4. Hipótesis.	27
5. Objetivos.	28
6. Diseño experimental.	29
7. Materiales y Métodos.	32
8. Resultados.	37
8.1 Proliferación celular a corto, mediano y largo plazo.	37
8.2 Tamaño astrocítico en el corto y largo plazo.	39
9. Discusión.	44
9. Conclusiones.	48
10. Referencias.	49

RESUMEN

La neurogénesis o generación de nuevas células neuronales provenientes de células progenitoras continúa en el cerebro adulto en áreas específicas a lo largo de la vida. La influencia de diversos factores pueden modificarla, entre ellos está la actividad física y el daño al sistema nervioso. Al igual que sucede en la neurogénesis, la glia responde a diversos insultos al sistema nervioso, como son los traumatismo directos y algunas enfermedades, tratando de compensar el desbalance homeostático.

La hipoglucemia es una alteración metabólica común y su complicación puede causar daño cerebral severo. Ésta condición es capaz de aumentar la tasa de neurogénesis en el hipocampo. La 2-desoxiglucosa (2-DG) es un inhibidor competitivo de la vía glicolítica capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Se ha reportado que el uso de 2-DG simula el efecto de la hipoglucemia cerebral; sin embargo, aún se desconocen los cambios relacionados al uso de este fármaco.

En este estudio se reporta el efecto de 2-DG, en rata adulta, en el corto, mediano y largo plazo sobre la proliferación celular de hipocampo, y en el corto y largo plazo sobre el tamaño de la astrogli. Los resultados de la inmunoreacción para núcleos de BrdU marcados revelan un aumento en la proliferación celular en el corto y mediano plazo, y un decremento en el largo plazo; además de un incremento en el tamaño de la astrogli en el hipocampo en el corto plazo, regresando a sus niveles basales en el largo plazo. Este estudio puede dar indicios sobre la relación funcional existente entre el tamaño de la astrogli de hipocampo y la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo, probando una vez más la importancia de la glia en el recambio celular general en el cerebro.

INTRODUCCIÓN

HIPOCAMPO

El hipocampo es pilar en los estudios de plasticidad sináptica desde hace tiempo, con los primeros hallazgos sobre potenciación sináptica de largo plazo en la vía perforante que nace en la corteza entorrinal y desemboca en el giro dentado (GD) del hipocampo (Bliss y Lomo, 1973); estos estudios evolucionaron hacia comprobación de la existencia de la plasticidad Hebbiana-de la coincidencia en la actividad pre- y postsináptica. Otros estudios de plasticidad comprobaron la existencia de la proliferación neuronal en el cerebro adulto, postulando así, un nuevo paradigma en el funcionamiento cerebral, la existencia de un fenómeno de plasticidad que provocara la incorporación de nuevas neuronas a circuitos funcionales en el hipocampo (Altman y Das, 1965).

Aunque no hay un consenso en relación a los términos que describen el hipocampo y la corteza cerebral adyacente, el término *formación hipocampal* generalmente se refiere al GD, los campos “Cornu Ammonis” CA1-CA3 y CA4 o “hilus” (considerado parte del giro dentado) y el subiculum (ver figura 1).

Esta estructura bien conocida por su papel en la adquisición y procesamiento de la memoria explícita a través de su circuitería que recibe entrada y salida principalmente a través de la corteza entorrinal. La información que fluye a través del hipocampo converge primero en el giro dentado, que proyecta a través de sus fibras musgosas al área CA3, ésta distribuye sus fibras a CA1 a través de un conjunto de fibras llamadas colaterales de Schaffer, y finalmente CA1 distribuye sus fibras en el subiculum, quien envía información de salida,

este proceso sucede con información adicional en cada etapa. La región de CA2, dividiendo CA1 y CA3, representa una porción muy pequeña del hipocampo, y su presencia es comúnmente ignorada al considerar la función del hipocampo, aunque es notable que esta pequeña región parezca inusualmente resistente a condiciones que usualmente causan grandes cantidades de daño celular, como en la epilepsia. Es ampliamente aceptado que cada una de estas regiones tiene un único papel funcional en el procesamiento de información del hipocampo, sin embargo a la fecha se sabe poco de la contribución de cada una de las regiones. (Duvernoy, 2005).

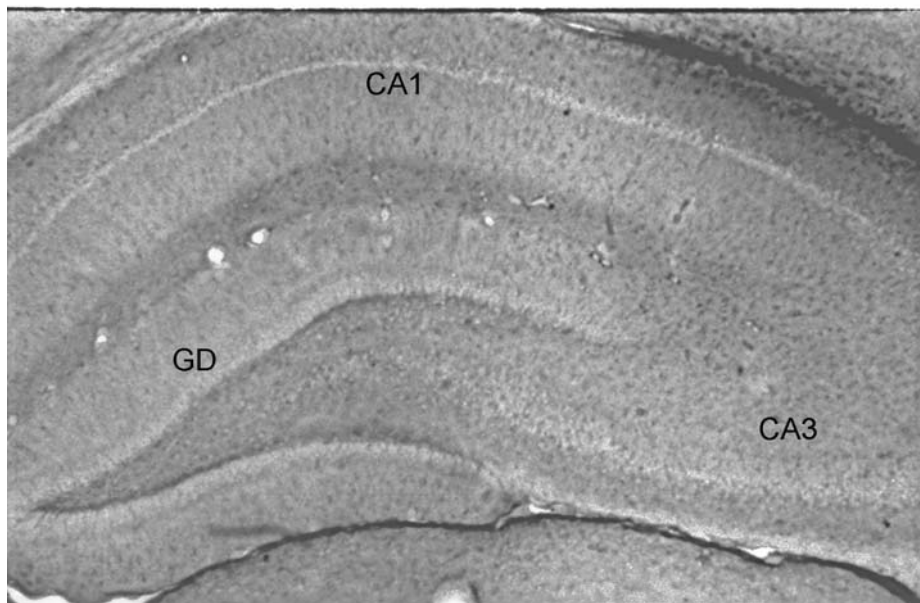


Fig 1: Diagrama de las regiones del hipocampo: Corte coronal que muestra el giro dentado, la región de CA1 y CA3.

El estudio de la vía perforante, que trae información proveniente de la corteza entorrinal, fue fundamental para dilucidar los mecanismos de plasticidad de corto y largo plazo, esto debido a la simplicidad de su inervación y de qué estructuras que la generan. Ésta estructura recibe entradas de información de

cortezas adyacentes, como son la corteza perirrinal y la corteza parahipocampal, que le proveen de información accesoria de diversas áreas de procesamiento multimodal (de asociación) de la corteza cerebral. Debido a la regionalización laminar del hipocampo, es posible que tenga un procesamiento ordenado y simplificado de múltiples entradas de información (Drachman and Arbit, 1966); siendo una estructura de fácil estudio, en comparación con la complejidad de inervación de la neocorteza. El hipocampo recibe también inervación subcortical, como es la entrada proveniente del tallo cerebral. La inervación subcortical al hipocampo es también abundante y ordenada, teniendo entradas del tallo cerebral como en el caso de la inervación serotoninérgica (Sotelo, 1991) y de estructuras límbicas como la amígdala (Kemppainen et al., 2002).

NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DEL CEREBRO ADULTO

En cuanto a la neurogénesis en el cerebro adulto, ésta ha sido identificada como un acontecimiento persistente a lo largo de la vida. Sucede cuando las células progenitoras del hilus (CA4) son comprometidas a tomar un plan que las llevará a transformarse en neuronas granulares y así posicionarse en la capa granular del giro dentado. Ésta es controlada por muchos factores tróficos y moléculas neuroactivas. La neurogénesis es en realidad un proceso bien preservado en la evolución animal, hipotéticamente involucrado en diversos mecanismos de plasticidad y reemplazo de la red neuronal; éstos, siendo mecanismos esenciales para llevar a cabo acciones complejas como el aprendizaje y la configuración estructural de nuevas memorias (Paizanis et al., 2007). Es modulada por varias condiciones fisiológicas y patológicas,

dependiendo del estímulo puede aumentar o disminuir la tasa de generación de nuevas neuronas; el aprendizaje asociativo o hipocampo dependiente, la respuesta ante un nuevo ambiente, la restricción dietética, todas ellas aumentando la neurogénesis, por el contrario el aislamiento social, el consumo de alcohol, la deprivación materna en etapas tempranas de la vida y el estrés prenatal, todas ellas disminuyendo la neurogénesis (Taupin, 2005, ver tabla 1). En otras condiciones como la hipoglucemia inducida por la insulina ocurre un aumento en la tasa de neurogénesis, mientras que 4 semanas posterior a la hipoglucemia disminuye ésta, debido a la pérdida de células progenitoras (Suh et al., 2005).

ESTÍMULO	MODULACIÓN
Edad	Disminuye
Ciclo estral	Aumenta
Ambiente enriquecido	Aumenta
Actividad física	Aumenta
Tarea de aprendizaje	Aumenta
Ambiente Nuevo	Aumenta
Restricción dietética	Aumenta
Aislamiento social	Disminuye
Ingesta de alcohol	Disminuye
Deprivación de olor	Disminuye
Deprivación maternal	Disminuye
Estrés	Disminuye
Diabetes	Disminuye
Derrame cerebral	Aumenta
Lesión traumática	Aumenta

Tabla 1: Modulación de la neurogénesis en etapa adulta en el giro dentado del hipocampo. La neurogénesis es modulada por varias condiciones fisiológicas y patológicas. El tipo de modulación podría variar dependiendo de la especie y del género. (modificado de Taupin, 2005).

A pesar de que miles de neuronas nacen día con día, una gran cantidad de ellas muere precipitadamente. Sin embargo, la influencia de diversos factores

exógenos puede hacer que sobrevivan y se afilien a un determinado linaje celular. Se ha visto que el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FCF-2) y el factor de crecimiento epidermal (FCE) son necesarios para el mantenimiento de células progenitoras en la zona subventricular (ZSV) y en el hipocampo, estos factores pudieran ser importantes para la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto (Kuhn et al., 1997). La glia juega un papel fundamental en el proceso de génesis y ulterior desarrollo de nuevas neuronas en muchas regiones del sistema nervioso adulto, sobre todo en el hipocampo (Song et al., 2002) y la zona subventricular (Lim and Álvarez-Buylla, 1999). En particular, se ha obtenido evidencia que demuestra el compromiso de las células gliales en destinar la migración de neuronas jóvenes, tanto en el cerebro intacto como en el lesionado, lo cual le adjudicaría a las mismas un papel de células precursoras que actúan como fuente de sustancias tróficas promotoras de la generación, diferenciación y sobrevivencia de nuevas neuronas (Song et al., 2002). Reiterando todo lo anterior, está muy claro que los astrocitos maduros del hipocampo postnatal promueven la neurogénesis. Estas funciones previamente desatendidas, contribuirían ampliamente al potencial cerebral para generar nuevas neuronas continuamente o a la capacidad, en el cerebro afectado, de procurar la homeostasis del sistema nervioso, al tiempo de proveer una parte esencial del entendimiento del sustrato celular de la plasticidad neuronal.

El mecanismo antes mencionado ha sido objeto de ardua investigación, pero a pesar de todos los esfuerzos, este complejo proceso, así como el significado real de la autorenovación del hipocampo, no han sido bien dilucidados. Lo que

actualmente se ha esclarecido es que las células recién nacidas en el hipocampo del animal adulto, expresan marcadores específicos para neurona, y exhiben propiedades funcionales, como la sincronía del potencial de acción, que son incorporadas rápidamente a circuitos neuronales preexistentes (Van Praag et al., 2002).

GLIA

La glia fue descubierta por Virchow en 1856, quien reconoció que este material tenía células estelares que eran difíciles de conservar y de distinguir de las neuronas pequeñas. Virchow y sus contemporáneos percibían a la glia como una matriz interneuronal de donde se suspendían las neuronas y este punto de vista prevaleció hasta tiempos recientes en que las técnicas de impregnación metálica, desarrolladas por Cajal y del Río Hortega en los albores de el siglo XX, permitieron un vasto desarrollo de la literatura sobre glia.(Peters, 1991)

Con base en la observación por microscopía de luz, la glia en el sistema nervioso central (SNC) es dividida en:

- Macroglia
 - Astrocitos
 - Protoplasmáticos
 - Fibrosos

- Oligodendrocitos
 - Interfasciculares
 - Perineuronales

- Microglia

Tradicionalmente se considera la función de la glia primordialmente de soporte a las funciones neuronales, sin embargo en las últimas décadas se han considerado nuevas funciones que rebasan esta concepción (Bear, 2001).

ASTROGLIA

Los astrocitos o llamados también astroglia, son las células más numerosas en el cerebro, tienen forma estrellada y constituyen del 20 al 50 % del volumen en la mayoría de las áreas cerebrales. Éstos tienen en la sustancia blanca, abundantes fibrillas por lo que reciben el nombre de astrocitos fibrosos, mientras que en la sustancia gris contienen menos fibrillas y consecuentemente se denominan protoplasmáticos (Wiley, 2002).

En el desarrollo embrionario los astrocitos provienen de la glia radial y en el cerebro adulto aíslan a las neuronas y a los oligodendrocitos, por medio de la extensión de procesos hacia la superficie de los vasos sanguíneos (Pies astrocíticos), hacia la superficie de la piamadre y epéndima (Glia limitans) y hacia los nodos de Ranvier (Ver Fig. 2). Están comunicados por medio de

uniones tipo comunicantes, lo cual conforma un sincisio para el paso libre de iones y pequeñas moléculas a través de ellos. (Wiley, 2002).

Los astrocitos tienen algunas características citológicas e inmunológicas comunes que permiten su identificación, entre las cuales podemos mencionar: su forma estrellada, los pies astrocíticos sobre los capilares, la gran cantidad de haces de filamentos intermedios compuestos de PAFG (proteína ácida fibrilar de glia), los marcadores astrocíticos S-100b, proteína fijadora de calcio y glutamina sintetasa. Ultraestructuralmente son particulares las uniones tipo comunicantes (conexinas), los desmosomas, los gránulos de glucógeno y los arreglos ortogonales de sus membranas que sirven para su identificación. (Wiley, 2002).

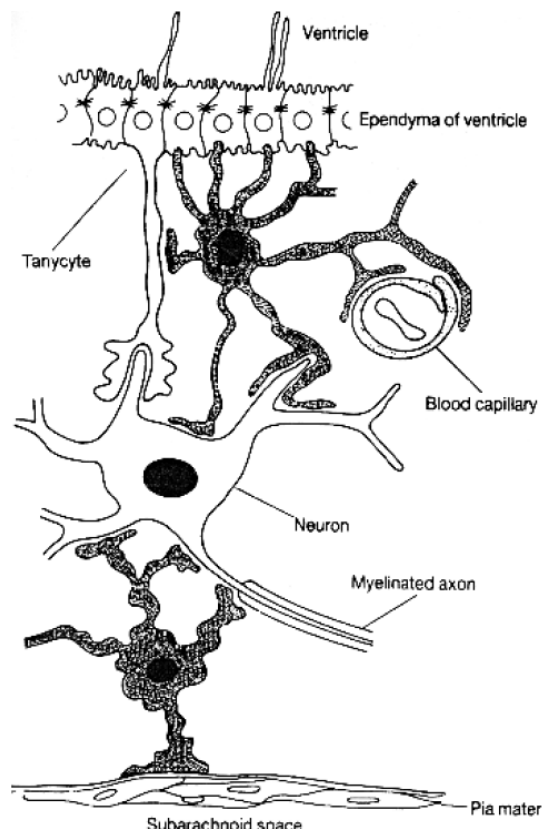


Fig. 2: En este esquema clásico se muestra la diversidad de interacciones de los astrocitos (en negro) con diferentes poblaciones celulares en el cerebro, conformando la barrera hematoencefálica, dando soporte a la epéndima que rodea a las cavidades ventriculares, y teniendo una interacción funcional para el correcto funcionamiento de las neuronas (Copiada de Warwick y Williams, 1973).

Por mucho tiempo se creyó que los astrocitos formaban la barrera hematoencefálica (BHE) y de hecho esto es cierto para algunas especies en grados inferiores de la escala filogenético; sin embargo, en especies más complejas, los astrocitos inducen la formación y el mantenimiento de uniones estrechas entre las células endoteliales que efectivamente forman la barrera hematoencefálica (BHE). También tienen un papel importante en la angiogénesis que puede ser importante en el desarrollo y en la reparación del SNC. (Wiley, 2002).

Otro papel atribuido a los astrocitos y a la glia radial es la migración y guía de las neuronas en el desarrollo temprano, por medio de la liberación de proteínas de matriz extracelular y moléculas de adhesión celular como N-CAM, laminina y fibronectina. Estas moléculas no sólo participan en la migración neuronal sino también son determinantes en la formación de grupos de neuronas y redes neuronales. (Wiley, 2002)

Los astrocitos tanto *in vivo* como *in vitro* producen gran número de factores de crecimiento (e.g. citocinas) que modulan la morfología, proliferación, diferenciación y sobrevivencia de distintas poblaciones neuronales y gliales. Durante la neurotransmisión pueden remover los neurotransmisores y los iones de la hendidura sináptica, evitando que interfieran con la futura actividad

sináptica. Ésto coincide con la presencia de transportadores para varios neurotransmisores, canales iónicos y receptores de neurotransmisores en su membrana. En la detoxificación del SNC los astrocitos tienen un papel principal, pues pueden secuestrar metales y una gran variedad de sustancias neuroactivas de origen endógeno y xenobiótico. (Wiley, 2002).

Además de las funciones anteriores, en el cerebro adulto se ha observado que si los astrocitos son estimulados, se generan ondas de calcio intracelulares y se propagan a través de uniones comunicantes entre los astrocitos, ésta característica podría ser relevante en el acoplamiento de la fisiología funcional de las neuronas y la glia (Giaume and Venance, 1998).

ACTIVACIÓN ASTROCÍTICA

Como se discutió anteriormente, los astrocitos se reconocen cada vez más como participantes dinámicos en muchos aspectos de la fisiología normal del sistema nervioso (SN). Una característica conservada filogenéticamente y muy prominente de los astrocitos, es su capacidad de responder vigorosamente a diversos insultos, mostrando cambios fenotípicos importantes como son: hipertrofia de las proyecciones membranales, aumento en la expresión de PAFG, vimentina, nestina, entre otras (Pekny y Nilsson, 2005), y en algunos casos proliferación celular cerca del área de daño (Okada et al., 2006). La activación astrocítica, también llamada astrogliosis, puede ser detectada desde una hora posterior a un trauma focal mecánico. Se ha reportado la presencia de astrogliosis prominente en SIDA y otras infecciones virales, encefalopatía espongiiforme, enfermedades desmielinizantes, traumatismos

craneoencefálicos, y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer. La dinámica de su respuesta, su rapidez y su conservación entre especies indica una importante función dentro del SN (Eng and Ghirnikar, 1994).

La activación astrocítica primero fue asumida como una condición que impedía la regeneración neuronal, por medio del desarrollo de "cicatrices de glia", sin embargo evidencia acumulada ha indicado que puede promover la recuperación funcional ante lesiones cerebrales bajo ciertas condiciones (Okada et al., 2006). En algunos modelos se ha observado que esta condición provee de energía y otros factores que promueven la sobrevivencia neuronal, el crecimiento axónico y la reorganización sináptica, por medio de la liberación de factores tróficos, citocinas y otras moléculas de reconocimiento de superficie. En otros más se ha visto que previenen que las neuronas sufran estrés oxidativo y excitotoxicidad por glutamato, por medio de la remoción de radicales libres y exceso de glutamato. También se ha propuesto en algunas revisiones que la activación astrocítica pudiera promover la neurogénesis en el sistema nervioso central adulto, estimulando la diferenciación neuronal, guiando la migración de nuevas células, o actuando como progenitores; esto por medio de la liberación de citocinas y otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FCF-2) (Chen et al., 2005; Liberto et al., 2004). El mecanismo que pudiera generar esto sería que la activación astrocítica provocara la liberación de citocinas y otros factores, que estimularían la liberación de FCF-2 de los astrocitos, lo cual a su vez incidiría directamente en el recambio neuronal, ya que se ha visto que FCF-2 estimula directamente la conversión de neuroblastos a neuronas (Kuhn et al., 1997).

METABOLISMO DE GLUCOSA EN EL CEREBRO

BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y TRANSPORTE DE GLUCOSA

La especificidad de funciones e importancia de la membrana plasmática para la realización de las funciones de las distintas poblaciones celulares del sistema nervioso central, generan la necesidad del control preciso del ambiente extracelular en el que se encuentran dichas poblaciones celulares. Debido a que una gran parte de las funciones de transmisión de señales dentro del SNC se llevan a cabo por la despolarización de las membranas plasmáticas, el balance iónico del medio en el que se encuentran es de suma importancia. La estructura anatomofuncional que regula el intercambio de elementos entre el espacio extracelular del tejido neural y la circulación general, se denomina barrera hematoencefálica (BHE) (Prat et al., 2001).

Esta barrera es una estructura compleja formada por células endoteliales vasculares cuya función depende de las uniones densas entre ellas, y de células gliales que establecen una relación íntima con las paredes de los vasos y capilares que irrigan al sistema nervioso central. La unión de las células endoteliales hace prácticamente imposible la difusión libre de sustancias del plasma sanguíneo hacia la región intersticial del tejido neural (Prat et al., 2001).

La BHE posee mecanismos de transporte selectivo que garantizan el intercambio de metabolitos entre el microambiente neural y el plasma sanguíneo (Schlosshauer, 1993) y por lo tanto, la composición del medio en el

que funciona el parénquima neural tiene el balance adecuado de factores para lograr su función.

El transporte de glucosa a través de la BHE normalmente no es un paso limitante en el metabolismo cerebral; sin embargo, el transporte se convierte en un paso limitante bajo condiciones extremas de hipoglucemia o anoxia. Algunos estudios del mecanismo de transporte de glucosa de la sangre al cerebro no permiten distinguir entre transporte activo y difusión facilitada; sin embargo se piensa que pueda ser similar a la difusión facilitada que ocurre en el transporte hacia los eritrocitos en términos de los requerimientos estructurales de la molécula de glucosa (e.g. inhibición por florizina, floretina, carencia de sensibilidad al Na^+ o a la insulina) (Betz et al., 1976). La presencia tan ubicua del transportador GLUT1 en la barrera hematoencefálica (Pardridge et al., 1990) apoya esta noción, ya que usa difusión facilitada y es insensible a Na^+ .

EFFECTOS DE LA HIPOGLUCEMIA TRANSITORIA EN EL CEREBRO Y FORMAS DE INDUCCIÓN

En el estado euglucémico las concentraciones de glucosa en sangre fluctúan entre 4 y 7 mmol/L (Saltiel y Khan, 2001), niveles menores a éstos (<3.8 mmol/L) conducen a hipoglucemia, comprometiendo a las funciones vitales (Cryer, 2007). Existen algunos estados patológicos y no patológicos que pueden provocar hipoglucemia, entre los no patológicos se encuentran el ayuno prolongado y el ejercicio excesivo. Sin embargo, la causa más frecuente de hipoglucemia es la inducida por un exceso de insulina en el torrente

sanguíneo, siendo ésta muy común durante el tratamiento de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 (Cryer, 2007) o en personas que padecen insulinoma (de Herder, 2004). El uso farmacológico de 2-DG, aunque produce hiperglucemia sanguínea, imita el estado fisiopatológico de la hipoglucemia cerebral inducida por exceso de insulina (Breier et al., 1993).

Sin duda, el órgano más afectado durante el estado hipoglucémico es el cerebro. En el sistema nervioso la disminución en la utilización efectiva de glucosa es denominada neuroglicopenia. Esta utilización efectiva se traduciría en cantidad de ATP producido, que no necesariamente correlacionaría con la cantidad de glucosa existente en el cerebro, aunque bajo condiciones fisiológicas sí lo sería. Mientras mayor tiempo persista el estado neuroglicopénico, el daño neurológico se incrementa, llegando a ser irreversible e incluso fatal (Cryer, 2007).

Las regiones cerebrales que están más propensas a daños son la corteza cerebral, el hipocampo, y el núcleo caudado. Diversas poblaciones neuronales se han documentado como más propensas a morir por hipoglucemia como el área CA1 del hipocampo, el subiculum, y la capa granular del giro dentado (GrGD); así como las capas 2 y 3 de la corteza cerebral (Suh et al., 2007).

A concentraciones de glucosa por debajo de 2.5 mmol/L, la hexocinasa cerebral ya no se satura, siendo insuficiente para proveer de la energía necesaria al cerebro. Debido a esto, los astrocitos y las neuronas se adaptan incrementando la cantidad de transportadores de glucosa GLUT 1 y GLUT 3 en

su membrana (Nehlig, 1997). Otra de las formas de compensación que utilizan las neuronas son el uso de la reserva de glucógeno de la astroglia (Cryer, 2007) y la activación del metabolismo alterno (utilizando glicerol, lactato y cuerpos cetónicos) (Auer, 2004); debido a que estos metabolitos no son buenos sustitutos energéticos, se incrementa el estrés oxidativo (Suh et al., 2007), aumentando así la posibilidad de daño neuronal.

El efecto directo de la caída en las concentraciones de glucosa se comienza a registrar con anomalías en el electroencefalograma (EEG), también aparecen síntomas que varían desde letargia, confusión, estupor, hasta llegar al coma. Cuando la concentración intracelular de glucosa se acerca a cero, el EEG muestra ondas lentas y actividad paroxismal hasta que finalmente la actividad cesa (Nehlig, 1997). El daño neuronal temprano puede apreciarse observando abultamientos dendríticos por microscopía electrónica. La muerte neuronal por necrosis aparece a partir que el EEG se ha vuelto isoelectrico (Auer, 2004).

La muerte neuronal incluye una serie de eventos moleculares previos que ocurren en la célula tales como producción de especies reactivas de oxígeno, activación de los receptores para glutamato, transición de la permeabilidad mitocondrial (Suh et al., 2007) y cambios en los flujos de calcio (Auer, 2004). Es importante mencionar que una vez iniciado el proceso de muerte neuronal éste no se detiene, aunque se corrija el estado hipoglucémico (Suh et al., 2007). A nivel periférico se ha demostrado que la hipoglucemia inducida por

insulina produce degeneración axonal y defectos en el transporte por sí mismo (Pozzessere et al., 1997).

Aunque exista recuperación después de un episodio hipoglucémico agudo, ésta es incompleta, y siempre queda algún grado de déficit neurológico, principalmente defectos en la memoria y cognición.

HIPOGLUCEMIA INDUCIDA POR 2-DG COMO MODELO EXPERIMENTAL

Estudios previos sobre los efectos de la hipoglucemia inducida por insulina sobre el cerebro no han sido concluyentes (Breier et al., 1993). Por esto, una nueva alternativa para el estudio de los efectos de la hipoglucemia cerebral es la administración del análogo de glucosa 2-desoxiglucosa (2-DG) (Fig. 3). La 2-DG es un inhibidor competitivo, no fisiológico, de la vía glicolítica capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Al ser un análogo estructural de la D-glucosa, la 2-DG es captada por la célula para posteriormente ser fosforilada por la enzima glucosa hexocinasa, produciendo 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato. El hecho de que esta molécula no pueda ser metabolizada por medio de la vía glicolítica causa su gradual acumulación en la célula, generando la consecuente inhibición de la glucosa-6-fosfato isomerasa y el bloqueo de la conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, un paso crucial en la vía glicolítica (Breier et al., 1993).

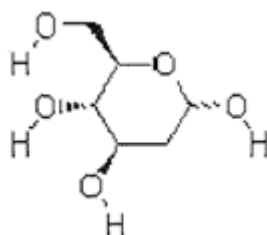


Fig. 3: Estructura molecular de la 2-desoxiglucosa

Esta propiedad intrínseca de la 2DG ha sido recientemente estudiada y aplicada en la farmacología clínica para el tratamiento de dos patologías muy comunes, el cáncer y la epilepsia. En el caso de esta última, la literatura médica describe que una dieta baja en carbohidratos y rica en grasas es capaz de disminuir la frecuencia de las crisis convulsivas en pacientes que sufren de epilepsia severa. En la actualidad, esta dieta “cetogénica” se ha mostrado útil como alternativa terapéutica en pacientes con epilepsia resistente al tratamiento farmacológico. Dadas sus características moleculares, la 2-DG es capaz de emular este efecto y de esa manera incrementar el umbral necesario para inducir convulsiones focales por estimulación, al tiempo que se ha mostrado capaz de inhibir parcialmente la severidad progresiva de la epilepsia en algunos modelos experimentales (Garriga-Canut et al., 2006).

En el caso del cáncer, se ha reportado que las células tumorales son altamente dependientes de la glicólisis para soportar sus altos requerimientos metabólicos. Por esta razón, la elevada captación de glucosa en estas células representa un punto importante de regulación en el mantenimiento de su crecimiento y en la supresión del proceso apoptótico. La 2-DG, al inducir el bloqueo de la vía glicolítica, provoca la muerte de células tumorales por medio de la activación y consecuente estimulación de la vía apoptótica. (Kang y Hwang, 2006).

En el cerebro la deprivación de glucosa provee de un paradigma experimental para estudiar el flujo sanguíneo cerebral en estudios clínicos y preclínicos. Muchos de los estudios al respecto han sido en hipoglucemia inducida por insulina. Sin embargo, el uso farmacológico de 2-DG es una alternativa para el estudio de este fenómeno, por su cualidad es capaz de inhibir de manera directa la glicólisis y el metabolismo oxidativo sin alterar el pO_2 , pCO_2 y el pH arterial (Breier et al., 1993). La caída en los niveles de ATP es la pieza crucial del modelo, ya que a pesar de que la insulina y la 2-DG tienen efectos opuestos sobre la concentración de glucosa, estos tienen efectos similares en el cerebro, sugiriendo un mecanismo común que subyazca a estos cambios, pero aún así siendo más directo el efecto de la 2-DG. (Elman et al., 1999).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha comprobado que la neurogénesis es influenciada por diversas señales provenientes de los astrocitos. Muchas enfermedades o insultos al SNC, destacando la hipoglucemia inducida por insulina, pueden provocar cambio en la tasa de neurogénesis en el giro dentado (GD). El agente farmacológico 2-DG produce un estado neuroglucopénico transitorio, no se sabe si pudiera tener un efecto sobre la neurogénesis en el GD, más aún si el efecto está relacionado con algún cambio en el estado glial del hipocampo.

HIPÓTESIS

La inducción de hipoglucemia transitoria por 2-DG producirá activación astrocítica, lo cual tendrá un efecto sobre la proliferación celular en el giro dentado (GD) del hipocampo, que se podrá correlacionar con la atenuación de los cambios en el tiempo.

OBJETIVOS

-Determinar la tasa de proliferación celular en el giro dentado (GD) del hipocampo de los grupos experimental y control, en el corto, mediano y largo plazo.

-Determinar el tamaño y la densidad de la astroglia de hipocampo, de los grupos experimental y control en el corto y largo plazo, que pudieran estar indicando la presencia de activación astrocítica.

-Analizar los datos anteriores para determinar si existe una relación intrínseca entre los dos fenómenos observados.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñó el experimento con el objetivo de evaluar la tasa de proliferación celular (Fig. 4). Hay 2 factores que pueden cambiar el número de células marcadas para BrdU, la proliferación *per se*, y la sobrevivencia neuronal. Al inyectar BrdU justo antes de la perfusión de los animales se estaría evaluando únicamente la proliferación, en la que recae el interés del experimento. Debido a la noción de que existe una poza de células progenitoras que se mantiene de manera constante, se analizó el efecto a distintos tiempos posterior al tratamiento con 2-DG, se escogieron los tiempos con base en los efectos, visto en otros modelos, de la glucoprivación inducida por insulina sobre la tasa de neurogénesis. Se utilizó una dosis de 500mg/kg/día de 2-DG (Breier et al., 1993) sin causar cambios en la conducta, coma o convulsiones, pudiendo imitar los efectos de su uso en la clínica.

Con el objetivo de evaluar el estado astrocítico (Fig. 5), se analizaron el tamaño y el número de ramificaciones de los astrocitos de hipocampo a través de un solo parámetro que cuantifica el número de intersecciones de las proyecciones de una célula en una grátula de círculos concéntricos (con más detalle en Materiales y Métodos). Se usó este método para darle a la hipertrofia astrocítica un valor paramétrico (Martínez-Contreras et al., 2002), y hacer una comparación más objetiva. Debido a la influencia que tienen los astrocitos en la generación de nuevas neuronas (Song et al., 2002), se decidió comparar este parámetro de los grupos control y experimental en el corto y largo plazo del experimento de proliferación celular.

Para medir la proliferación celular se utiliza el análogo de timidina, 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU), ya que este compuesto tiene la propiedad de ser incorporado en el momento en que una célula este replicando su ADN, y posteriormente se divida. En la detección de BrdU, las células que estén marcadas serán células recién creadas, o células que están por dividirse (progenitoras).

Se decidió utilizar la técnica de perfusión transcárdial con paraformaldehído con el objetivo de fijar el tejido y de preservar su capacidad antigénica, esto tiene importancia ya que en posteriores evaluaciones se describirá el tejido tomando como referencia el estado del animal en el momento de la perfusión. (Descripción más detallada de la técnica en Materiales y Métodos).

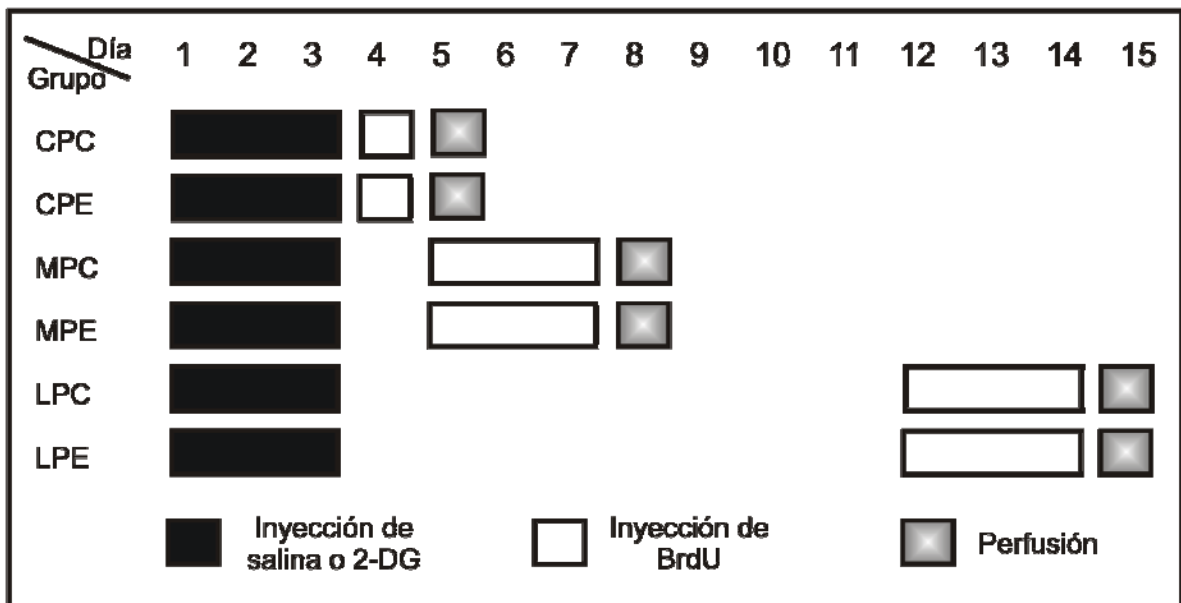


FIG. 4: PROLIFERACIÓN CELULAR: Diseño experimental para evaluar la tasa de proliferación celular en giro dentado, en el corto, mediano y largo plazo, de los grupos control y experimental. Los grupos incluyen el control de corto plazo (CPC), experimental de corto plazo (CPE), control de mediano plazo (MPC), experimental de mediano plazo (MPE), control de largo plazo (LPC) y experimental de largo plazo (LPE).

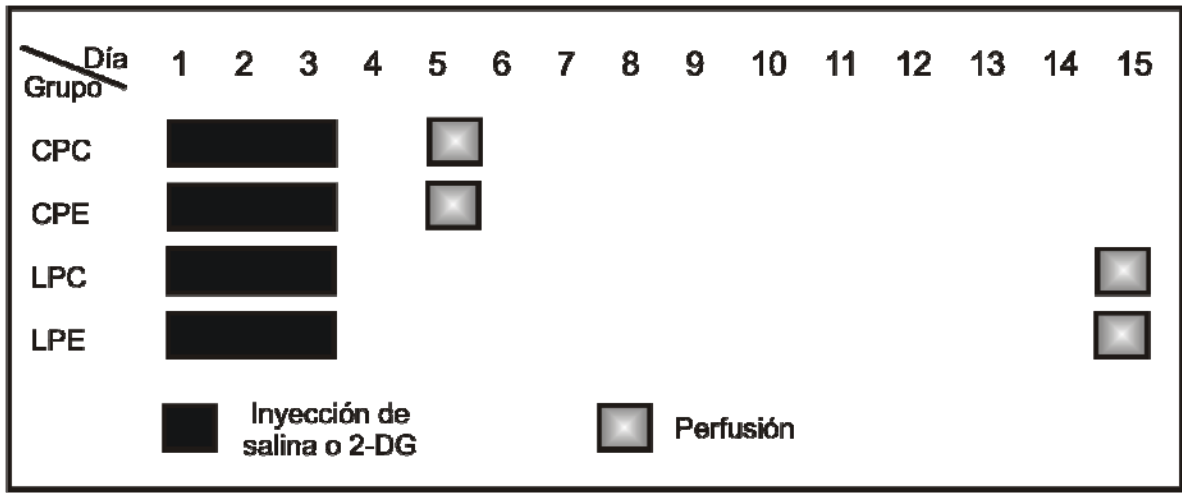


FIG.5: TAMAÑO ASTROCÍTICO: Diseño experimental para evaluar el tamaño de los astrocitos de hipocampo, en el corto y largo plazo, de los grupos control y experimental. Los grupos incluyen el control de corto plazo (CPC), experimental de corto plazo (CPE), control de largo plazo (LPC) y experimental de largo plazo (LPE).

RESULTADOS

PROLIFERACIÓN CELULAR A CORTO, MEDIANO Y LARGO PLAZO

Con la dosis de 2-DG usada, no se observó ninguna alteración del comportamiento aparente. La inmunoreacción para BrdU se encontró predominantemente en la zona subventricular (ZSV) y en el giro dentado (GD), y frecuentemente en forma de grupos de células marcadas (Fig. 7). Por necesidad del protocolo, los grupos recibieron diferentes dosis de BrdU. Por lo tanto, para normalizar los resultados, los datos de los grupos experimentales se presentan como el porcentaje de cambio comparado contra su control respectivo. La consecuencia temprana de la glucoprivación (CPE) inducida por 2-DG en el hipocampo adulto es un claro incremento ($63.3\% \pm 25\%$) en el número de núcleos positivos para BrdU, comparado con el grupo control (CPC) (Fig. 7, representativa). La proliferación celular del GD mantuvo una tendencia similar después de 5 días del término de la aplicación de 2-DG, con un $28\% \pm 4.53\%$ de incremento en el número de núcleos positivos para BrdU (MPE) comparado con su control (MPC) (Fig. 8).

De manera contraria, el análisis de núcleos positivos para BrdU 12 días después del tratamiento, mostró un notorio decremento en el grupo experimental (LPE) ($52.3\% \pm 3.23\%$), comparado con su control respectivo (LPC) (Fig. 8).

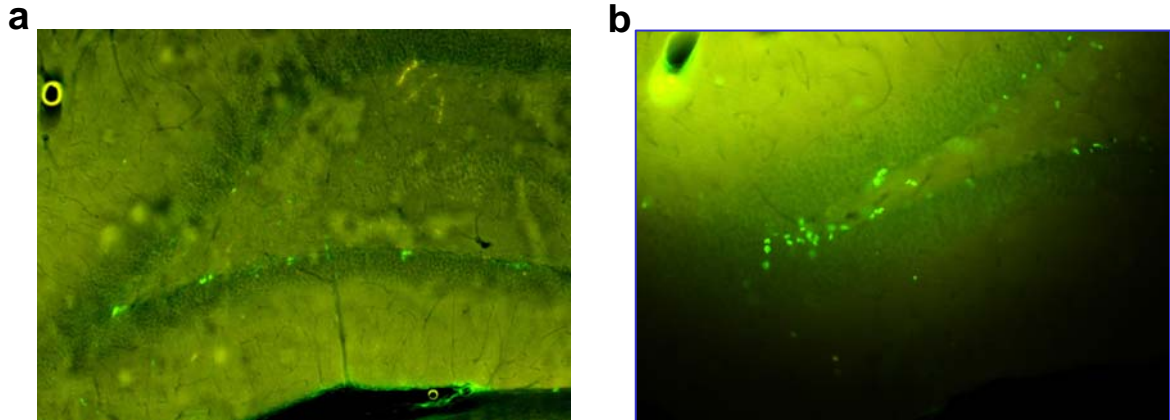


Fig 7: Imágenes representativas que muestran núcleos inmunoreactivos para BrdU en el giro dentado de rata adulta 24 horas después del término del tratamiento (con 2-DG o solución salina). a)GD de rata inyectada con solución salina (CPC). b)GD de rata inyectada con 2-DG (CPE)

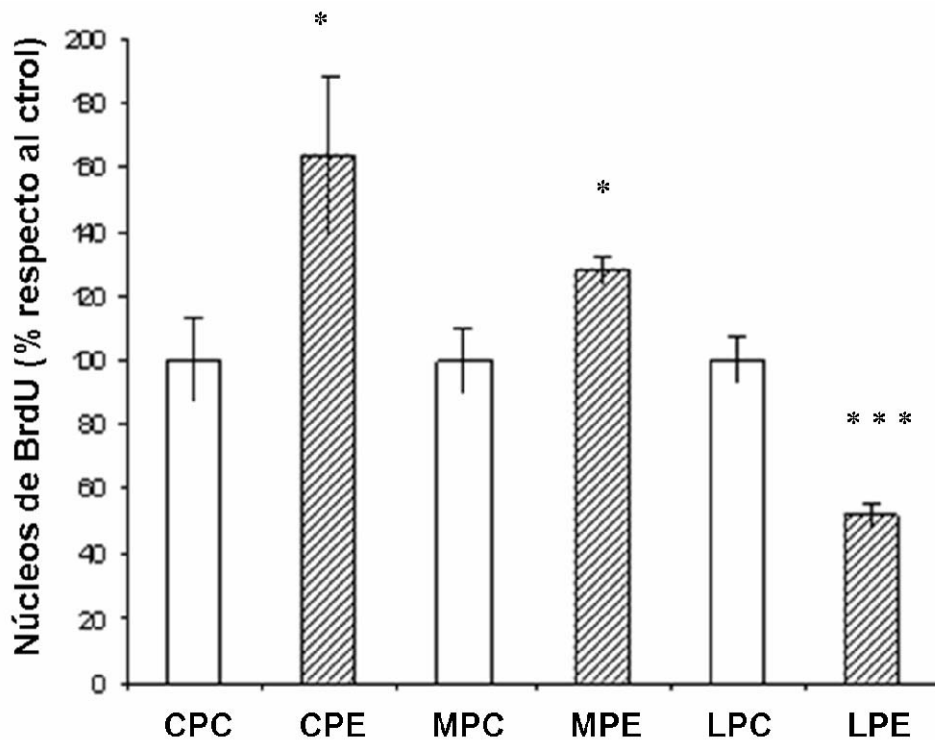


Fig. 8: La gráfica muestra el resultado de los conteos de núcleos inmunoreactivos para BrdU después de tratamiento con 2-DG (n=4). Se muestran los porcentajes de cambio de los grupos experimentales respecto a los controles. Primero se observa un aumento en la tasa de proliferación celular (grupo CPE), que continúa en el mediano plazo (grupo MPE), y termina por revertirse en el largo plazo (LPE); contrario al comportamiento homogéneo de los controles (CPE, MPE Y LPE). Para el análisis de los grupos se utilizó una prueba de Student-Newman-Kauls, las diferencias fueron consideradas

*estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, respecto al grupo control.*

TAMAÑO ASTROCÍTICO EN EL CORTO Y LARGO PLAZO

La inmunoreactividad para PAFG en el hipocampo se encontró de manera uniforme a través de cada región para todos los cortes coronales (Fig. 9). Tomando en cuenta lo anterior, para analizar de manera muy general el estado glial en el hipocampo de los grupos experimental y control, y correlacionarlo con la tasa de proliferación celular en el GD, se obtuvo el valor de N_{ol} y la densidad celular de la población. El valor N_{ol} nos da un parámetro aproximado y en conjunto del número y tamaño de ramificaciones que posee una célula con proyecciones de su membrana (Sholl, 1953). Para el análisis de N_{ol} se tomaron las siguientes áreas: capa granular de giro dentado (GrGD), capa piramidal de CA1 (PiCA1), capa piramidal de CA3 (PiCA3), estrato radiado del hipocampo (Erad), estrato lacunoso molecular (ELMol) y la capa polimórfica del giro dentado (PoGD) (Ver regiones en Fig. 9), se comparó el experimental con su propio control para cada región. Todas las regiones tuvieron diferencia significativa en el valor de N_{ol} (valores de P: 0.046, 0.024, 0.0016, 0.0054, 0.43, 0.0038, respectivamente) exceptuando el estrato lacunoso molecular (Fig. 10a). La densidad celular se obtuvo para las áreas antes mencionadas exceptuando GrDG, debido a la baja densidad de astrocitos en ésta región, en ninguna de las regiones estudiadas se encontró diferencia significativa (Fig. 10b).

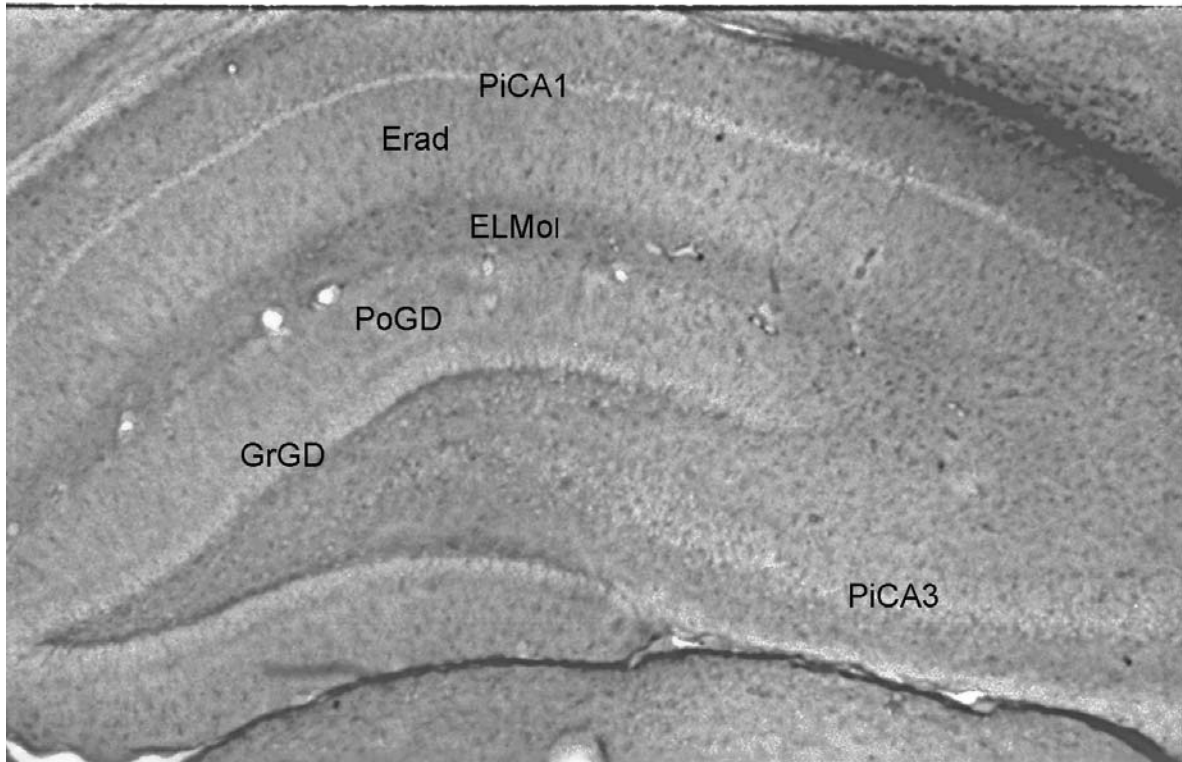


Fig. 9: Corte coronal donde se muestra la inmunoreactividad para PAFG de manera uniforme a través de las regiones estudiadas: capa granular del giro dentado (GrGD), capa piramidal de CA1 (PiCA1), capa piramidal de CA3 (PiCA3), estrato radiado (Erad), estrato lacunoso molecular (ELMol) y capa polimórfica de giro dentado (PoDG).

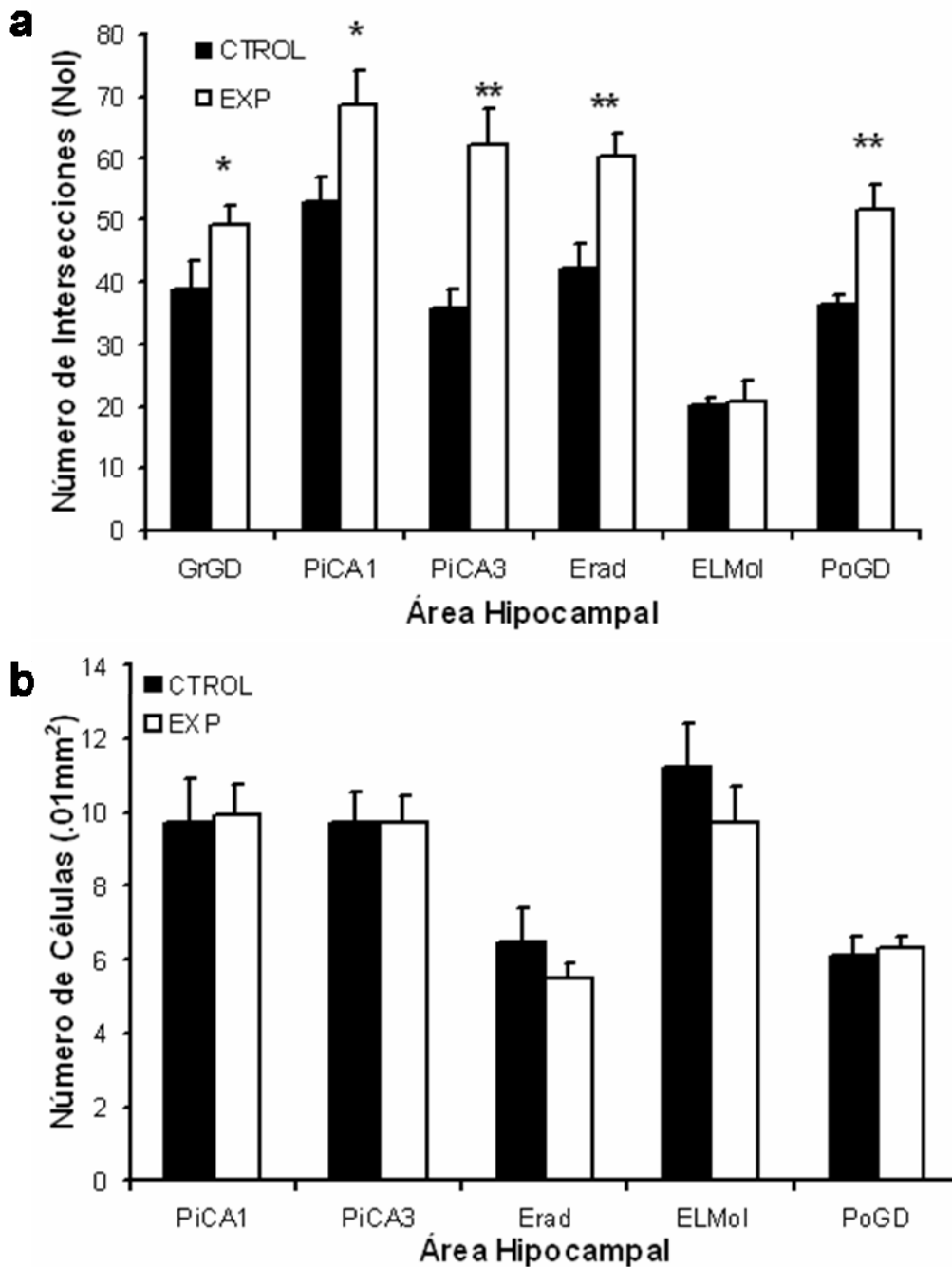


Fig. 10: En esta imagen se muestra el estado de la astroglia del hipocampo en el corto plazo después del tratamiento con 2-DG, se obtuvo el valor de Nol y el número de células de control y experimental en diversas regiones del hipocampo (grupos CPC Y CPE), se comparó el experimental con su control respectivo para cada región. a) Hipertrofia astrocítica en el corto plazo: se muestra el Nol de distintas regiones del hipocampo, todas ellas exceptuando ELMol muestran diferencias significativas. b) muestra el número de células PAFG-positivas en distintas regiones del hipocampo, no existen diferencias significativas. Para el análisis de los grupos se utilizó una prueba de ANOVA POS HOC con un ajuste de Bonferroni.

Doce días posterior al término de la aplicación de 2-DG (día 15 del diseño experimental) se realizó la medición completa de Nol y densidad celular del experimental y control (grupos LPC Y LPE) para las mismas regiones analizadas en el corto plazo, no se encontró ninguna diferencia entre el experimental y el control (Fig. 11a y 11b).

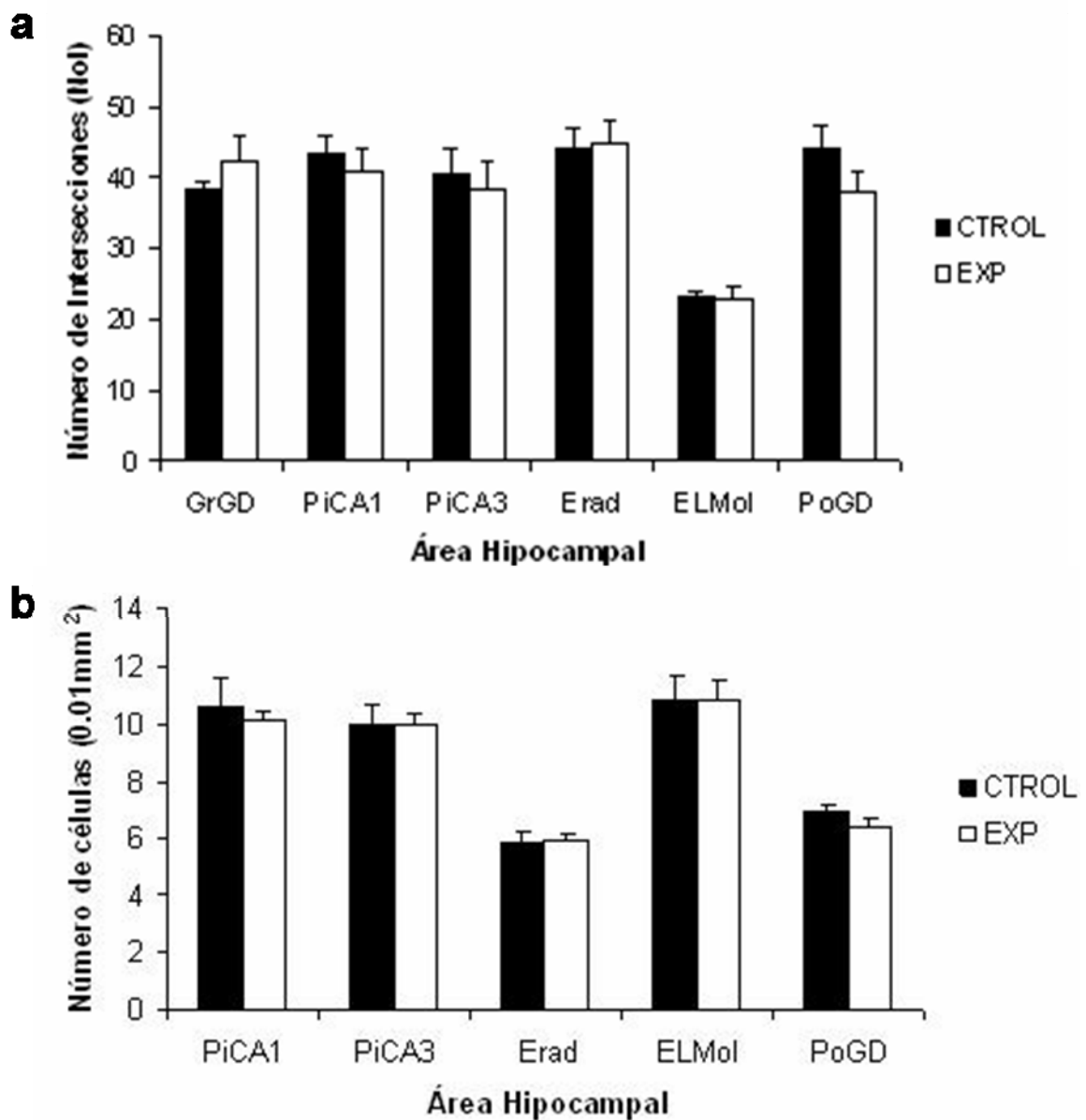


Fig. 11: En esta imagen se muestra el estado de la astroglia del hipocampo en el largo plazo después del tratamiento con 2-DG, se obtuvo el valor de Nol y el número de células de control y experimental en diversas regiones del hipocampo (grupos LPC Y LPE), se comparó el experimental con su control

respectivo para cada región. a) se muestra el Nof de distintas regiones del hipocampo, ninguna de ellas muestra diferencias significativas. b) muestra el número de células PAFG-positivas en distintas regiones del hipocampo, no existen diferencias significativas. Para el análisis de los grupos se utilizó una prueba de ANOVA POS HOC con un ajuste de Bonferroni.

DISCUSIÓN

El cerebro necesita de un continuo aporte de glucosa difundiéndose de la sangre a través de la barrera hematoencefálica (BHE), glia y por último hacia las neuronas. La hipoglucemia cerebral, produce comportamiento atípico en las neuronas, y en casos severos puede ocasionar daños permanentes en el cerebro. En este estudio se produjo hipoglucemia cerebral bajo el tratamiento con el agente 2-desoxiglucosa (2-DG), inhibidor competitivo de la vía glucolítica. El cerebro es especialmente susceptible a la 2-DG debido a su dependencia de glucosa para funcionar correctamente. La glucoprivación por 2-DG no es un fenómeno fisiológico, sin embargo se asemeja a condiciones neuroglicopénicas que ocurren bajo ciertas circunstancias. Usualmente, la neuroglicopenia ocurre cuando hay un nivel bajo de glucosa en la sangre, siendo muy común en pacientes bajo tratamiento con insulina.

En este estudio, las ratas experimentales recibieron una dosis de 500 mg/kg/día/ip. Esta dosis ha sido utilizada en otros estudios de glucoprivación sin producir cambios en el comportamiento, coma o convulsiones (Breier et al., 1993). De manera similar no se observó en esta aplicación ninguna de las alteraciones antes mencionadas.

Los resultados indican que la glucoprivación cerebral por 2-DG induce diferentes modificaciones en la proliferación celular de giro dentado (GD) de manera tiempo-dependiente (Fig. 8). Poco después de la glucoprivación, la proliferación celular en GD se incrementó considerablemente (grupo CPE). Este incremento pudo haberse producido por una respuesta directa a la

glucoprivación (e.g. factores tróficos), o indirectamente por la muerte neuronal, o por las dos causas. Este estudio junto con otros, propone que la proliferación celular en el GD puede ser modificada bajo ciertas condiciones patológicas o insultos al sistema nervioso.

Una condición similar se observó en el grupo MPE. En contraste, 12 días después del término de la aplicación de 2-DG (grupo LPE) hubo una reducción en la tasa de proliferación en el GD. El incremento transitorio en la proliferación celular seguido de un decremento debajo del nivel basal inducido por 2-DG está en acuerdo con otros paradigmas de insulto al sistema nervioso (Suh et al., 2005). Un asunto interesante sería investigar si la caída en la tasa de proliferación es permanente, reflejando la existencia de daños permanentes a las células progenitoras o al microambiente; o si por el contrario regresa a sus niveles basales, podría sugerir que 2-DG produjo daño moderado que provocó el aumento en la tasa de proliferación, consecuentemente disminuyendo la poza de células progenitoras.

Debido a que los grupos CPE y LPE recibieron diferentes dosis de BrdU (1 día vs 3 días, Fig. 4), una posibilidad que pudiera explicar el decremento en la proliferación sería que se hubieran observado poblaciones diferentes de células BrdU-positivas, es decir, que el decremento en el grupo LPE hubiera sido porque las nuevas células generadas BrdU-positivas entre las 24 y las 72 hrs se estuvieran muriendo. Sin embargo, debido a que se encontró un incremento significativo en el número de núcleos BrdU-positivos en el grupo MPE, que

recibieron una dosis durante 3 días, indica que es una posibilidad poco probable.

Aunque no se realizó una inmunocitoquímica doble (BrdU y marcador neuronal) para confirmar que el aumento en la proliferación celular era debido a que se estaban generando nuevas neuronas, el hecho de que la mayoría de los núcleos BrdU-positivos que se observaron eran neuronas es muy probable, debido a que la gran mayoría de las células nuevas producidas en la zona subgranular de GD expresan marcadores para neurona (Doetsch y Hen, 2005; Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Cameron y McKay, 2001).

Los astrocitos son capaces de responder ante señales de daño incrementando su tamaño, ésto es también llamado astrogliosis o activación glial (Eng y Ghirnikar, 1994; Panickar y Norenberg, 2005; Damiani y O'Callaghan, 2007). La activación glial ocurre en respuesta a todo tipo de daños al sistema nervioso, independiente de su regionalidad, celularidad, o la base molecular del insulto. En relación a esto los resultados de la glucoprivación cerebral indicaron de manera inequívoca la presencia de hipertrofia astrocítica en distintas regiones del hipocampo (Fig. 10a), sin cambiar la densidad astrocítica (Fig. 10b), posterior al término del tratamiento con 2-DG (grupo CPE). Ésta activación astrocítica es inhibida con el paso del tiempo, doce días después del término del tratamiento fueron suficientes (grupo LPE). Sin duda cuando los astrocitos censan el desbalance homeostático en el cerebro, su actividad metabólica incrementa (Liberto et al., 2004), como ocurre con el uso de 2-DG activando la glucólisis y la gluconeogénesis (Elman et al., 1999), al igual que la

producción de factores de crecimiento, que estarían a su vez causando esta hipertrofia, probando una vez más la existencia de la plasticidad metabólica en glia.

En el cerebro de roedores se propone la existencia de dos regiones principales capaces de generar nuevas neuronas en etapa adulta: la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo; existe una gran influencia astrocítica en la generación de un ambiente propicio para que pueda suceder la conversión de célula progenitora a neurona en ambas regiones (Lim y Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002), implicando que los astrocitos tienen un papel funcional, más que meramente de soporte. Otro resultado interesante al respecto fue la relación que se observó entre el aumento en el tamaño de la astroglia, y los niveles de proliferación celular en el GD, siendo mayor el tamaño y mayor la proliferación celular en el grupo CPE comparado con CPC, llegando el tamaño astrocítico a sus niveles basales en LPE, y la proliferación abajo de sus niveles basales en LPE. Por lo tanto, es posible que el aumento de tamaño de la astroglia esté modificando el ambiente extracelular (e.g. factores tróficos), lo cual pudiera incrementar la conversión de célula progenitora a neurona.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Ratas macho adultas (200-225 gr) del bioterio de la Facultad de Medicina (UNAM) fueron mantenidas en jaulas de acrílico en periodos de luz oscuridad (12hrs:12hrs) con acceso a comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales se hicieron de acuerdo a los estatutos del comité de bioética de la UNAM, se tomaron medidas para minimizar el dolor y el maltrato animal. Se asignaron 6 grupos para los experimentos de proliferación celular: Control de corto plazo (CPC), Experimental de corto plazo (CPE), Control de mediano plazo (MPC), Experimental de mediano plazo (MPE), Control de largo plazo (LPC) y Experimental de largo plazo (LPE). Se asignaron 4 grupos para los experimentos de tamaño astrocítico: Control de corto plazo (CPC), Experimental de corto plazo (CPE), Control de largo plazo (LPC) y Experimental de largo plazo (LPE). Durante 3 días consecutivos (d1, d2, d3), las ratas experimentales fueron inyectadas con 2-DG (500 mg/kg/día/ip, dividida en 3 dosis al día, diluida en agua estéril), mientras que las ratas control fueron inyectadas con solución salina. Para detección de células nuevas, las ratas fueron inyectadas con el análogo de timidina 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Sigma, 9285), (50 mg/kg/día, ip/ 3 inyecciones por día), con el siguiente protocolo: los grupos de corto plazo recibieron las inyecciones de BrdU un día después de la última administración de 2-DG (d4); el grupo de mediano plazo la recibieron en d5, d6 y d7; mientras que los grupos de largo plazo recibieron el tratamiento en d12, d13 y d14 (ver Fig. 4).

PREPARACIÓN DE TEJIDO E INMUNOCITOQUÍMICA (BrdU)

Se realizó una inmunocitoquímica para BrdU con el objetivo de analizar la tasa de proliferación celular. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital y fueron perfundidos transcardialmente con 0.9% de solución salina, seguida de 4% w/v de paraformaldehído frío con 1% v/v de ácido pícrico en 0.1M de búfer de fosfatos (BF). Los cerebros fueron inmediatamente removidos y cortes de 50 μm fueron obtenidos en plano coronal a través del hipocampo usando un vibratomo (Leica VT 1000, Alemania). Los cortes fueron incubados en 3% H_2O_2 en BF durante 10 minutos. Posteriormente se incubó con formamida y citrato de sodio salino, por una hora a 65°C, esto para descubrir el antígeno, y después con HCl 2N por 30 min a 37°C para desnaturalizar el DNA. Después, las secciones fueron lavadas 2 veces con búfer de boratos (pH=8.5), seguidas de un lavado con BF 0.1M. Los cortes fueron bloqueados en una solución de BF 0.1M con 3% tritón X-100 (Sigma T7878) y 0.3% de albúmina sérica bovina (Sigma A2153) (solución de trabajo) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario de rata anti-BrdU (Accurate Scientific, OBT003, 1:1000) durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, los cortes se lavaron con solución de trabajo tres veces y fueron incubados con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 cabra anti-IgG de rata (Molecular probes, 1:500) por dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron lavadas en BF, y montadas en laminillas usando el reactivo Vectashield para conservar la fluorescencia.

PREPARACIÓN DE TEJIDO E INMUNOCITOQUÍMICA (PAFG)

Se realizó una inmunocitoquímica contra la proteína ácida fibrilar de glia (PAFG) con el objetivo de analizar el tamaño y número de las ramificaciones de la astroglia. Los animales fueron perfundidos de igual forma que en la inmunocitoquímica para BrdU, los cortes tratados de la misma forma con H₂O₂, bloqueados de la misma forma y tratadas con el anticuerpo primario conejo anti-PAFG (Biomedical Care, 1:500). Posteriormente, los cortes se lavaron con solución de trabajo y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado cabra anti-IgG de conejo durante dos horas, posteriormente se lavaron 3 veces con solución de trabajo y se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs, Burlingame, CA, USA, 1:200) por una hora a temperatura ambiente. La peroxidasa fue detectada utilizando diaminobenzidina (DAB) como cromógeno en solución líquida utilizando el Kit de substrato DAB-plus líquido (Zymed laboratories, San Francisco, CA, USA, 00-2020).

CONTEO DE NÚCLEOS BrdU POSITIVOS

Núcleos fluorescentes inmunoreactivos para BrdU fueron contados en un microscopio modelo Nikon 550i. Se contaron como núcleos positivos aquellos restringidos a la zona subgranular del GD y a la parte interna de la capa granular, en ambas hojas, supra- e infrapiramidales del GD. El estudio estadístico del conteo de núcleos BrdU positivos se realizó haciendo un análisis de varianza seguido de una prueba de Student-Newman-Kauls usando software InStat (graphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs grupo control).

CONTEO DE N_{ol} Y NÚMERO DE ASTROCITOS

Los cortes se analizaron con microscopía de luz para analizar el número de células PAFG-positivas (número de células por 0.01mm²) de un campo focal específico (círculo o rectángulo) de un área específica. Los cambios morfológicos de las células PAFG-positivas fueron evaluados con la ayuda de una grátícula estereológica colocada en el soma de una célula, con sus proyecciones visibles radiando de adentro hacia fuera. La grátícula consiste de 5 círculos concéntricos de 20 µm de distancia entre cada una. Se registra el número total de sitios en que las proyecciones intersectan con los círculos concéntricos (Sholl, 1953, ver figura 6), a esto le llamamos N_{ol} (número de intersecciones). El estudio estadístico del valor de N_{ol} se realizó utilizando una prueba de ANOVA con ajuste de Bonferroni, con el objetivo de comparar el experimental con su control respectivo para cada región, usando software InStat (graphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs grupo control).

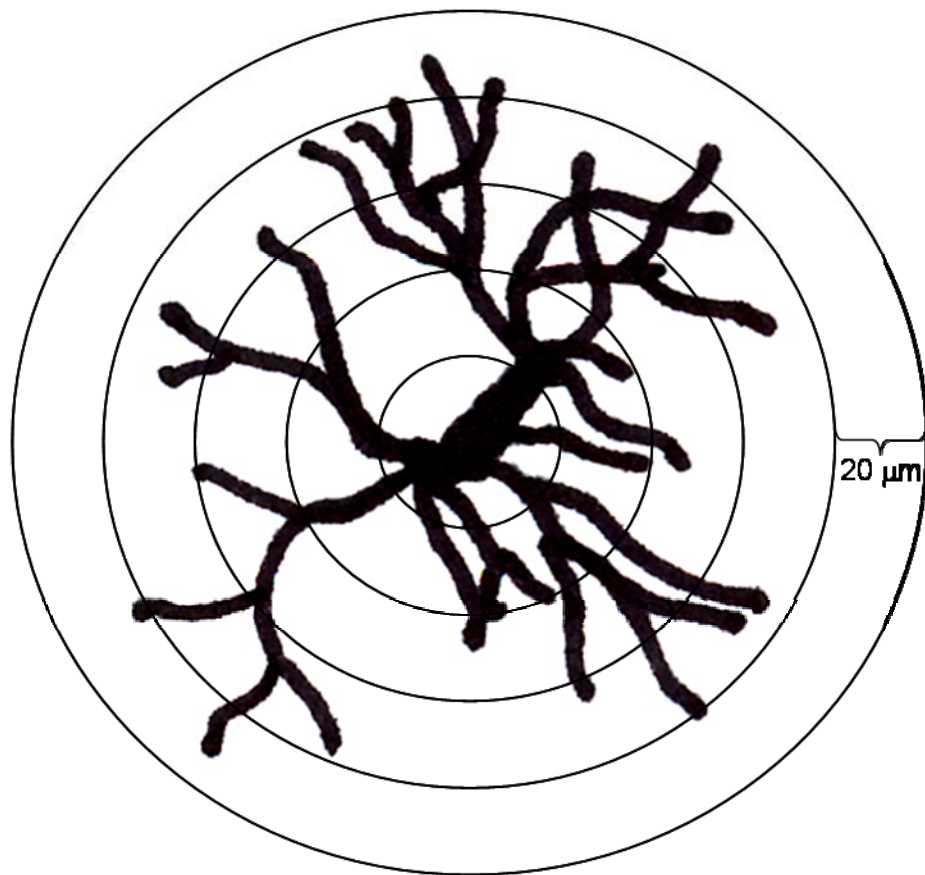


FIG.6: Se muestra la gráticula de círculos concéntricos con una separación de 20μm entre cada círculo. Utilizada para darle al tamaño astrocítico un valor paramétrico, con el tubo de dibujo, se coloca el soma de la célula en el centro de la gráticula y se cuentan el número de intersecciones de las proyecciones membranales en los círculos concéntricos (NoI), teniendo así más intersecciones las células con más proyecciones o con mayor longitud de sus proyecciones.

RESULTADOS

PROLIFERACIÓN CELULAR A CORTO, MEDIANO Y LARGO PLAZO

Con la dosis de 2-DG usada, no se observó ninguna alteración del comportamiento aparente. La inmunoreacción para BrdU se encontró predominantemente en la zona subventricular (ZSV) y en el giro dentado (GD), y frecuentemente en forma de grupos de células marcadas (Fig. 7). Por necesidad del protocolo, los grupos recibieron diferentes dosis de BrdU. Por lo tanto, para normalizar los resultados, los datos de los grupos experimentales se presentan como el porcentaje de cambio comparado contra su control respectivo. La consecuencia temprana de la glucoprivación (CPE) inducida por 2-DG en el hipocampo adulto es un claro incremento ($63.3\% \pm 25\%$) en el número de núcleos positivos para BrdU, comparado con el grupo control (CPC) (Fig. 7, representativa). La proliferación celular del GD mantuvo una tendencia similar después de 5 días del término de la aplicación de 2-DG, con un $28\% \pm 4.53\%$ de incremento en el número de núcleos positivos para BrdU (MPE) comparado con su control (MPC) (Fig. 8).

De manera contraria, el análisis de núcleos positivos para BrdU 12 días después del tratamiento, mostró un notorio decremento en el grupo experimental (LPE) ($52.3\% \pm 3.23\%$), comparado con su control respectivo (LPC) (Fig. 8).

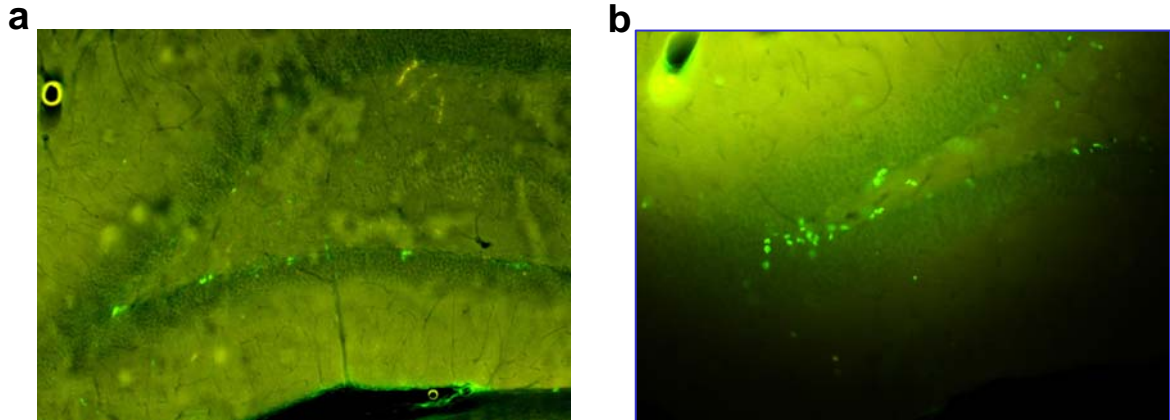


Fig 7: Imágenes representativas que muestran núcleos inmunoreactivos para BrdU en el giro dentado de rata adulta 24 horas después del término del tratamiento (con 2-DG o solución salina). a)GD de rata inyectada con solución salina (CPC). b)GD de rata inyectada con 2-DG (CPE)

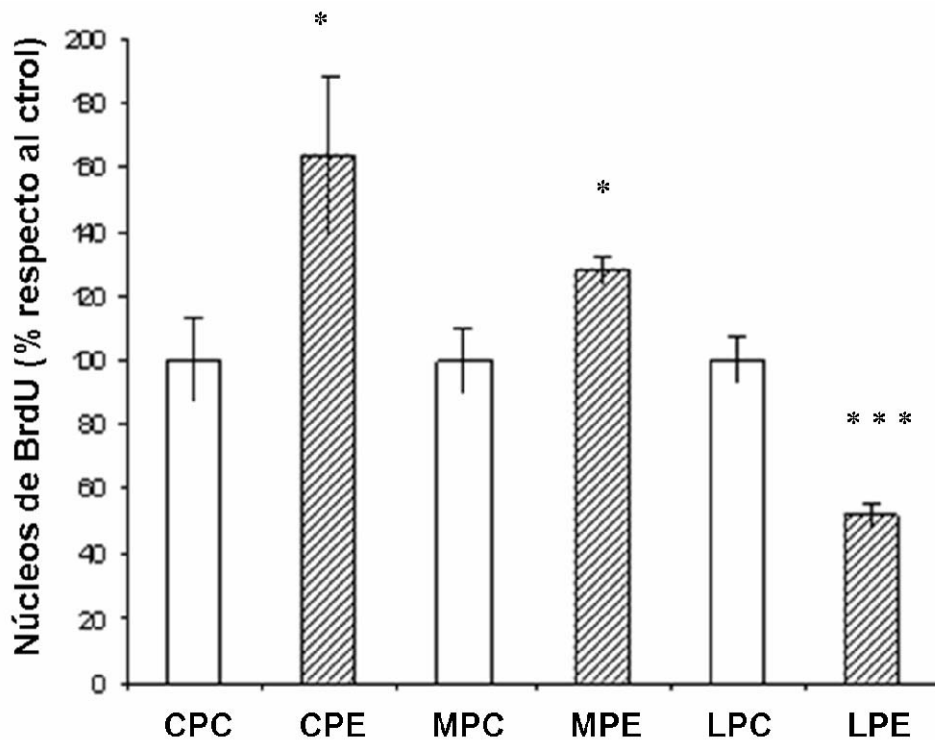


Fig. 8: La gráfica muestra el resultado de los conteos de núcleos inmunoreactivos para BrdU después de tratamiento con 2-DG (n=4). Se muestran los porcentajes de cambio de los grupos experimentales respecto a los controles. Primero se observa un aumento en la tasa de proliferación celular (grupo CPE), que continúa en el mediano plazo (grupo MPE), y termina por revertirse en el largo plazo (LPE); contrario al comportamiento homogéneo de los controles (CPE, MPE Y LPE). Para el análisis de los grupos se utilizó una prueba de Student-Newman-Kauls, las diferencias fueron consideradas

*estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, respecto al grupo control.*

TAMAÑO ASTROCÍTICO EN EL CORTO Y LARGO PLAZO

La inmunoreactividad para PAFG en el hipocampo se encontró de manera uniforme a través de cada región para todos los cortes coronales (Fig. 9). Tomando en cuenta lo anterior, para analizar de manera muy general el estado glial en el hipocampo de los grupos experimental y control, y correlacionarlo con la tasa de proliferación celular en el GD, se obtuvo el valor de N_{ol} y la densidad celular de la población. El valor N_{ol} nos da un parámetro aproximado y en conjunto del número y tamaño de ramificaciones que posee una célula con proyecciones de su membrana (Sholl, 1953). Para el análisis de N_{ol} se tomaron las siguientes áreas: capa granular de giro dentado (GrGD), capa piramidal de CA1 (PiCA1), capa piramidal de CA3 (PiCA3), estrato radiado del hipocampo (Erad), estrato lacunoso molecular (ELMol) y la capa polimórfica del giro dentado (PoGD) (Ver regiones en Fig. 9), se comparó el experimental con su propio control para cada región. Todas las regiones tuvieron diferencia significativa en el valor de N_{ol} (valores de P: 0.046, 0.024, 0.0016, 0.0054, 0.43, 0.0038, respectivamente) exceptuando el estrato lacunoso molecular (Fig. 10a). La densidad celular se obtuvo para las áreas antes mencionadas exceptuando GrDG, debido a la baja densidad de astrocitos en ésta región, en ninguna de las regiones estudiadas se encontró diferencia significativa (Fig. 10b).

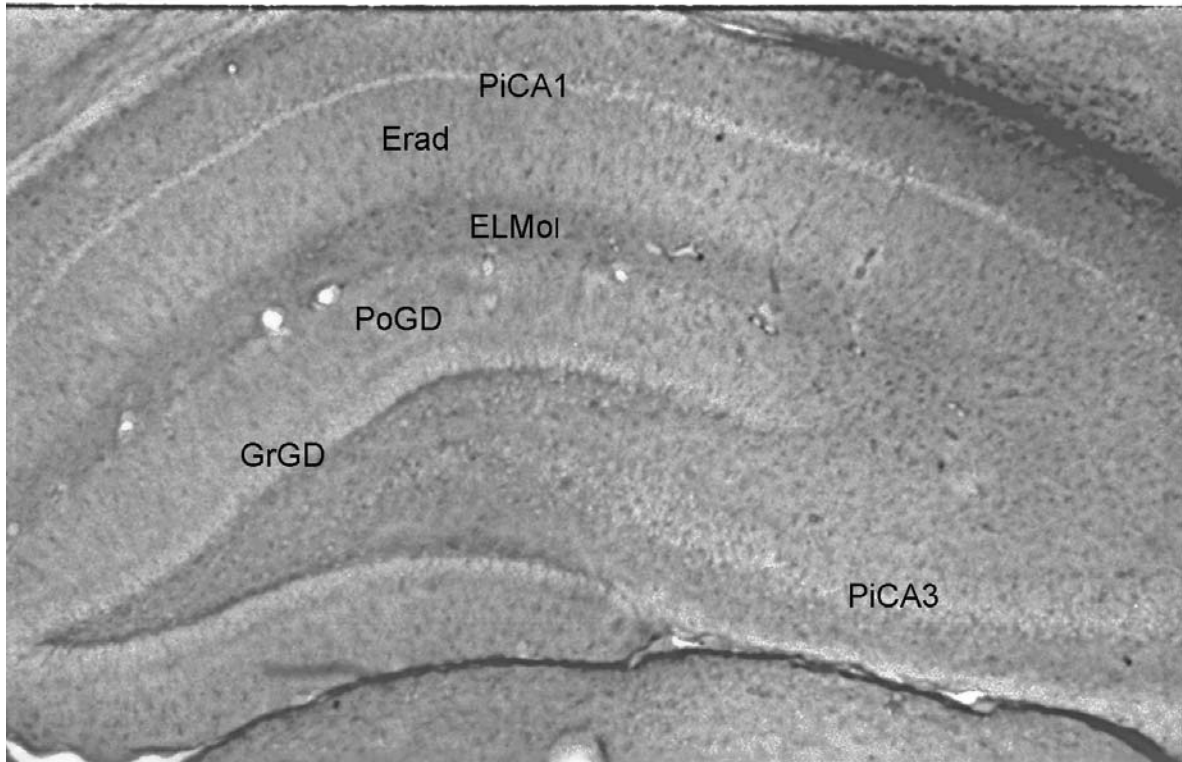


Fig. 9: Corte coronal donde se muestra la inmunoreactividad para PAFG de manera uniforme a través de las regiones estudiadas: capa granular del giro dentado (GrGD), capa piramidal de CA1 (PiCA1), capa piramidal de CA3 (PiCA3), estrato radiado (Erad), estrato lacunoso molecular (ELMol) y capa polimórfica de giro dentado (PoDG).

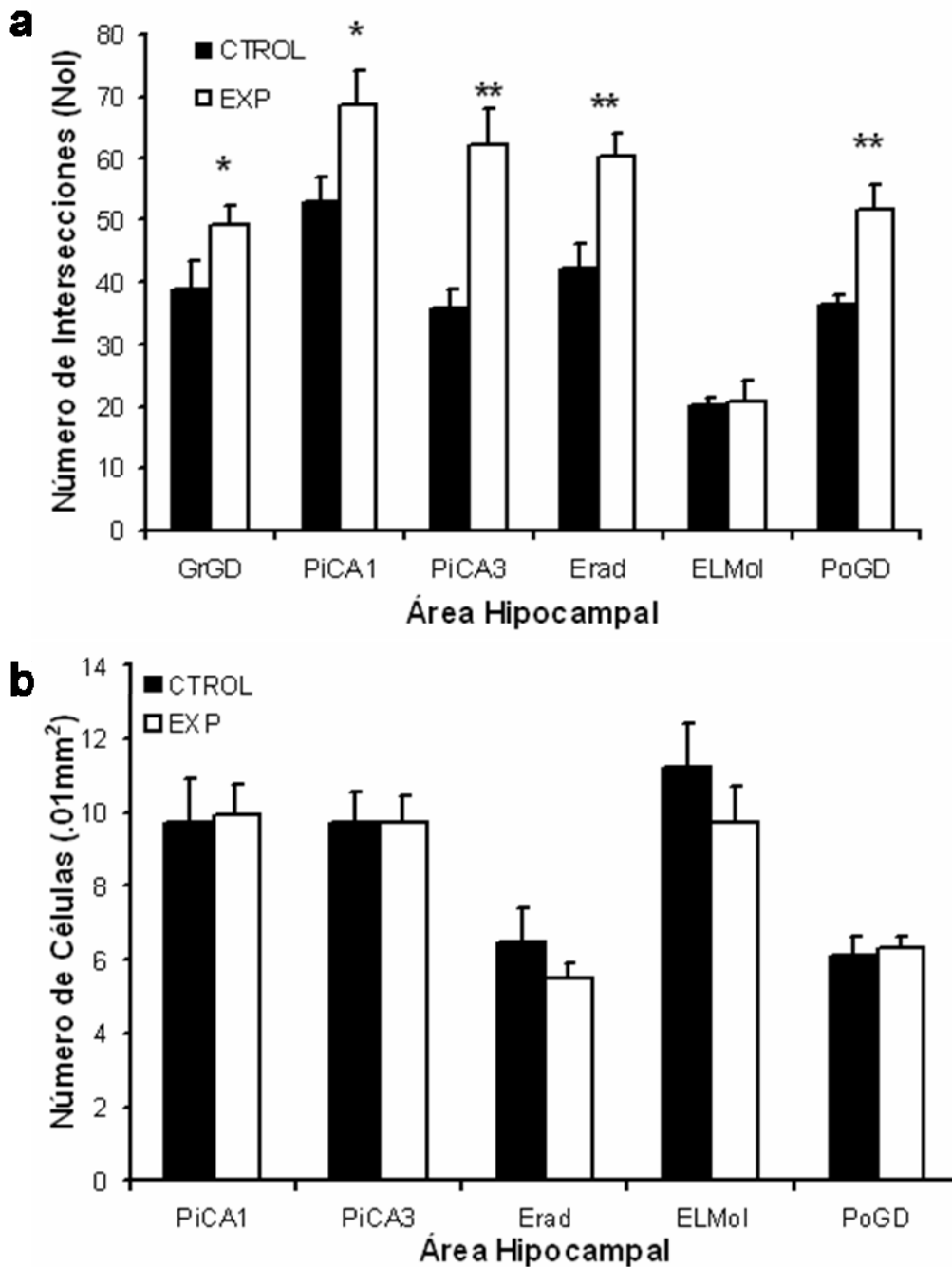


Fig. 10: En esta imagen se muestra el estado de la astrogliosis del hipocampo en el corto plazo después del tratamiento con 2-DG, se obtuvo el valor de Nol y el número de células de control y experimental en diversas regiones del hipocampo (grupos CPC Y CPE), se comparó el experimental con su control respectivo para cada región. a) Hipertrofia astrocítica en el corto plazo: se muestra el Nol de distintas regiones del hipocampo, todas ellas exceptuando ELMol muestran diferencias significativas. b) muestra el número de células PAFG-positivas en distintas regiones del hipocampo, no existen diferencias significativas. Para el análisis de los grupos se utilizó una prueba de ANOVA POS HOC con un ajuste de Bonferroni.

Doce días posterior al término de la aplicación de 2-DG (día 15 del diseño experimental) se realizó la medición completa de Nol y densidad celular del experimental y control (grupos LPC Y LPE) para las mismas regiones analizadas en el corto plazo, no se encontró ninguna diferencia entre el experimental y el control (Fig. 11a y 11b).

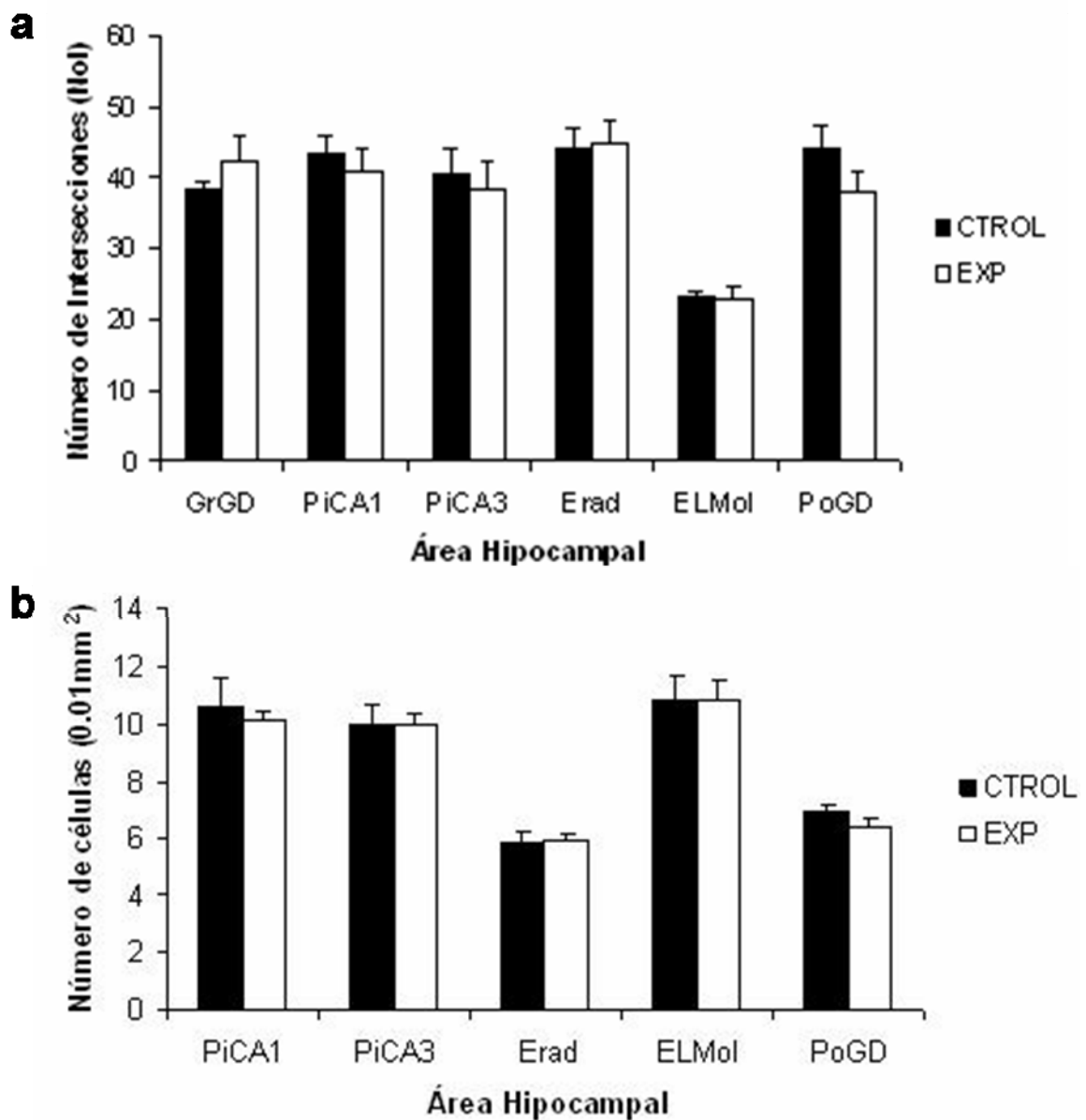


Fig. 11: En esta imagen se muestra el estado de la astroglia del hipocampo en el largo plazo después del tratamiento con 2-DG, se obtuvo el valor de Nol y el número de células de control y experimental en diversas regiones del hipocampo (grupos LPC Y LPE), se comparó el experimental con su control

respectivo para cada región. a) se muestra el Nof de distintas regiones del hipocampo, ninguna de ellas muestra diferencias significativas. b) muestra el número de células PAFG-positivas en distintas regiones del hipocampo, no existen diferencias significativas. Para el análisis de los grupos se utilizó una prueba de ANOVA POS HOC con un ajuste de Bonferroni.

DISCUSIÓN

El cerebro necesita de un continuo aporte de glucosa difundiéndose de la sangre a través de la barrera hematoencefálica (BHE), glia y por último hacia las neuronas. La hipoglucemia cerebral, produce comportamiento atípico en las neuronas, y en casos severos puede ocasionar daños permanentes en el cerebro. En este estudio se produjo hipoglucemia cerebral bajo el tratamiento con el agente 2-desoxiglucosa (2-DG), inhibidor competitivo de la vía glucolítica. El cerebro es especialmente susceptible a la 2-DG debido a su dependencia de glucosa para funcionar correctamente. La glucoprivación por 2-DG no es un fenómeno fisiológico, sin embargo se asemeja a condiciones neuroglicopénicas que ocurren bajo ciertas circunstancias. Usualmente, la neuroglicopenia ocurre cuando hay un nivel bajo de glucosa en la sangre, siendo muy común en pacientes bajo tratamiento con insulina.

En este estudio, las ratas experimentales recibieron una dosis de 500 mg/kg/día/ip. Esta dosis ha sido utilizada en otros estudios de glucoprivación sin producir cambios en el comportamiento, coma o convulsiones (Breier et al., 1993). De manera similar no se observó en esta aplicación ninguna de las alteraciones antes mencionadas.

Los resultados indican que la glucoprivación cerebral por 2-DG induce diferentes modificaciones en la proliferación celular de giro dentado (GD) de manera tiempo-dependiente (Fig. 8). Poco después de la glucoprivación, la proliferación celular en GD se incrementó considerablemente (grupo CPE). Este incremento pudo haberse producido por una respuesta directa a la

glucoprivación (e.g. factores tróficos), o indirectamente por la muerte neuronal, o por las dos causas. Este estudio junto con otros, propone que la proliferación celular en el GD puede ser modificada bajo ciertas condiciones patológicas o insultos al sistema nervioso.

Una condición similar se observó en el grupo MPE. En contraste, 12 días después del término de la aplicación de 2-DG (grupo LPE) hubo una reducción en la tasa de proliferación en el GD. El incremento transitorio en la proliferación celular seguido de un decremento debajo del nivel basal inducido por 2-DG está en acuerdo con otros paradigmas de insulto al sistema nervioso (Suh et al., 2005). Un asunto interesante sería investigar si la caída en la tasa de proliferación es permanente, reflejando la existencia de daños permanentes a las células progenitoras o al microambiente; o si por el contrario regresa a sus niveles basales, podría sugerir que 2-DG produjo daño moderado que provocó el aumento en la tasa de proliferación, consecuentemente disminuyendo la poza de células progenitoras.

Debido a que los grupos CPE y LPE recibieron diferentes dosis de BrdU (1 día vs 3 días, Fig. 4), una posibilidad que pudiera explicar el decremento en la proliferación sería que se hubieran observado poblaciones diferentes de células BrdU-positivas, es decir, que el decremento en el grupo LPE hubiera sido porque las nuevas células generadas BrdU-positivas entre las 24 y las 72 hrs se estuvieran muriendo. Sin embargo, debido a que se encontró un incremento significativo en el número de núcleos BrdU-positivos en el grupo MPE, que

recibieron una dosis durante 3 días, indica que es una posibilidad poco probable.

Aunque no se realizó una inmunocitoquímica doble (BrdU y marcador neuronal) para confirmar que el aumento en la proliferación celular era debido a que se estaban generando nuevas neuronas, el hecho de que la mayoría de los núcleos BrdU-positivos que se observaron eran neuronas es muy probable, debido a que la gran mayoría de las células nuevas producidas en la zona subgranular de GD expresan marcadores para neurona (Doetsch y Hen, 2005; Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Cameron y McKay, 2001).

Los astrocitos son capaces de responder ante señales de daño incrementando su tamaño, ésto es también llamado astrogliosis o activación glial (Eng y Ghirnikar, 1994; Panickar y Norenberg, 2005; Damiani y O'Callaghan, 2007). La activación glial ocurre en respuesta a todo tipo de daños al sistema nervioso, independiente de su regionalidad, celularidad, o la base molecular del insulto. En relación a esto los resultados de la glucoprivación cerebral indicaron de manera inequívoca la presencia de hipertrofia astrocítica en distintas regiones del hipocampo (Fig. 10a), sin cambiar la densidad astrocítica (Fig. 10b), posterior al término del tratamiento con 2-DG (grupo CPE). Ésta activación astrocítica es inhibida con el paso del tiempo, doce días después del término del tratamiento fueron suficientes (grupo LPE). Sin duda cuando los astrocitos censan el desbalance homeostático en el cerebro, su actividad metabólica incrementa (Liberto et al., 2004), como ocurre con el uso de 2-DG activando la glucólisis y la gluconeogénesis (Elman et al., 1999), al igual que la

producción de factores de crecimiento, que estarían a su vez causando esta hipertrofia, probando una vez más la existencia de la plasticidad metabólica en glia.

En el cerebro de roedores se propone la existencia de dos regiones principales capaces de generar nuevas neuronas en etapa adulta: la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo; existe una gran influencia astrocítica en la generación de un ambiente propicio para que pueda suceder la conversión de célula progenitora a neurona en ambas regiones (Lim y Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002), implicando que los astrocitos tienen un papel funcional, más que meramente de soporte. Otro resultado interesante al respecto fue la relación que se observó entre el aumento en el tamaño de la astroglia, y los niveles de proliferación celular en el GD, siendo mayor el tamaño y mayor la proliferación celular en el grupo CPE comparado con CPC, llegando el tamaño astrocítico a sus niveles basales en LPE, y la proliferación abajo de sus niveles basales en LPE. Por lo tanto, es posible que el aumento de tamaño de la astroglia esté modificando el ambiente extracelular (e.g. factores tróficos), lo cual pudiera incrementar la conversión de célula progenitora a neurona.

CONCLUSIONES

El presente trabajo contribuye al conocimiento general de la plasticidad por recambio celular en el hipocampo adulto en un paradigma de daño al sistema nervioso. Este es un hecho relevante ya que la proliferación neuronal en el adulto es un fenómeno que puede ser fuente de múltiples terapias de regeneración. Se observó que el tratamiento con 2-DG produce cambios en la tasa de proliferación celular o neurogénesis en el giro dentado (GD) del hipocampo, siendo mayor en el corto y mediano plazo, y menor en el largo plazo; también se produjo activación astrocítica en distintas regiones del hipocampo en el corto plazo, inferido por la presencia de hipertrofia de los procesos membranales. Dada la relación intrínseca existente entre los dos fenómenos observados en este y otros estudios, se postula que la astroglia pudiera influir en la variación en la tasa de proliferación celular del GD por el uso de 2-DG, y así corroborar la gran influencia que tienen los astrocitos en los eventos de plasticidad cerebral. Finalmente, cuando el agente 2-DG es usado con propósitos clínicos, tomando en cuenta este estudio podría ser de utilidad en el tratamiento.

REFERENCIAS

- Altman, J., and G. D. Das. "Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats." *J Comp Neurol* 124, no. 3 (1965): 319-35.
- Alvarez-Buylla A., and D. A. Lim. "For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain." *Neuron* 41, no. 5 (2004): 683-86.
- Auer, R. N. "Hypoglycemic Brain Damage." *Metab Brain Dis* 19, no. 3-4 (2004): 169-75.
- Bear, M., B. W. Connors, and M. A. Paradiso. "Neuroscience, Exploring the Brain." *Lippincot Williams and Wilkin*, Second Edition (2001).
- Betz, A. L., D. D. Gilboe, and L. R. Drewes. "The Characteristics of Glucose Transport across the Blood Brain Barrier and Its Relation to Cerebral Glucose Metabolism." *Adv Exp Med Biol* 69 (1976): 133-49.
- Bliss, T. V., and T. Lomo. "Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path." *J Physiol* 232, no. 2 (1973): 331-56.
- Breier, A., A. M. Crane, C. Kennedy, and L. Sokoloff. "The Effects of pharmacologic Doses of 2-Deoxy-D-Glucose on Local Cerebral Blood Flow in the Awake, Unrestrained Rat." *Brain Res* 618, no. 2 (1993): 277-82.
- Cameron, H. A., and R. D. McKay. "Adult Neurogenesis Produces a Large Pool of New Granule Cells in the Dentate Gyrus." *J Comp Neurol* 435, no. 4 (2001): 406-17.
- Chen, L. W., K. L. Yung, and Y. S. Chan. "Reactive Astrocytes as Potential Manipulation Targets in Novel Cell Replacement Therapy of Parkinson's Disease." *Curr Drug Targets* 6, no. 7 (2005): 821-33.
- Cryer, P. E. "Hypoglycemia, Functional Brain Failure, and Brain Death." *J Clin Invest* 117, no. 4 (2007): 868-70.
- Damiani, C. L., and J. P. O'Callaghan. "Recapitulation of Cell Signaling Events Associated with Astrogliosis Using the Brain Slice Preparation." *J Neurochem* 100, no. 3 (2007): 720-6.
- De Herder, W. W. "Insulinoma." *Neuroendocrinology* 80 Suppl 1 (2004): 20-2.
- Doetsch, F., and R. Hen. "Young and Excitable: The Function of New Neurons in the Adult Mammalian Brain." *Curr Opin Neurobiol* 15, no. 1 (2005): 121-8.
- Drachman, D. A., and J. Arbit. "Memory and the Hippocampal Complex. II. Is Memory a Multiple Process?." *Arch Neurol* 15, no. 1 (1966): 52-61.
- Duvernoy, H. M. "The human hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI." *Berlin: Springer-Verlag*, 3rd ed (2005).
- Elman, I., L. Sokoloff, C. M. Adler, N. Weisenfeld, and A. Breier. "The Effects of Pharmacological Doses of 2-Deoxyglucose on Cerebral Blood Flow in Healthy Volunteers." *Brain Res* 815, no. 2 (1999): 243-9.
- Eng, L. F., and R. S. Ghirnikar. "GFAP and Astrogliosis." *Brain Pathol* 4, no. 3 (1994): 229-37.
- Garriga-Canut, M., B. Schoenike, R. Qazi, K. Bergendahl, T. J. Daley, R. M. Pfender, J. F. Morrison, J. Ockuly, C. Stafstrom, T. Sutula, and A. Ropra. "2-Deoxy-D-Glucose Reduces Epilepsy Progression by Nrsf-Ctbp-

- Dependent Metabolic Regulation of Chromatin Structure." *Nat Neurosci* 9, no. 11 (2006): 1382-7.
- Giaume, C., and L. Venance. "Intercellular Calcium Signaling and Gap Junctional Communication in Astrocytes." *Glia* 24, no. 1 (1998): 50-64.
- Kang, H. T., and E. S. Hwang. "2-Deoxyglucose: An Anticancer and Antiviral Therapeutic, but Not Any More a Low Glucose Mimetic." *Life Sci* 78, no. 12 (2006): 1392-9.
- Kempainen, S., E. Jolkonen, and A. Pitkanen. "Projections from the Posterior Cortical Nucleus of the Amygdala to the Hippocampal Formation and Parahippocampal Region in Rat." *Hippocampus* 12, no. 6 (2002): 735-55.
- Kuhn, H. G., J. Winkler, G. Kempermann, L. J. Thal, and F. H. Gage. "Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain." *J. Neurosci.* 17, no. 15 (1997): 5820-29.
- Liberto, C. M., P. J. Albrecht, L. M. Herx, V. W. Yong, and S. W. Levison. "Pro-Regenerative Properties of Cytokine-Activated Astrocytes." *J Neurochem* 89, no. 5 (2004): 1092-100.
- Lim, D. A., and A. Alvarez-Buylla. "Interaction between Astrocytes and Adult Subventricular Zone Precursors Stimulates Neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, no. 13 (1999):7526-31.
- Martinez-Contreras, A., M. Huerta, S. Lopez-Perez, J. Garcia-Estrada, S. Luquin, and C. Beas Zarate. "Astrocytic and Microglia Cells Reactivity Induced by Neonatal Administration of Glutamate in Cerebral Cortex of the Adult Rats." *J Neurosci Res* 67, no. 2 (2002): 200-10.
- Nehlig, A. "Cerebral Energy Metabolism, Glucose Transport and Blood Flow: Changes with Maturation and Adaptation to Hypoglycaemia." *Diabetes Metab* 23, no. 1 (1997): 18-29.
- Okada, S., M. Nakamura, H. Katoh, T. Miyao, T. Shimazaki, K. Ishii, J. Yamane, A. Yoshimura, Y. Iwamoto, Y. Toyama, and H. Okano. "Conditional Ablation of Stat3 or Socs3 Discloses a Dual Role for Reactive Astrocytes after Spinal Cord Injury." *Nat Med* 12, no. 7 (2006): 829-34.
- Paizanis, E., M. Hamon, and L. Lanfumey. "Hippocampal Neurogenesis, Depressive Disorders, and Antidepressant Therapy." *Neural Plast* (2007): 73754.
- Panickar, K. S., and M. D. Norenberg. "Astrocytes in Cerebral Ischemic Injury: Morphological and General Considerations." *Glia* 50, no. 4 (2005): 287-98.
- Pardridge, W. M., R. J. Boado, and C. R. Farrel. "Brain-type Glucose Transporter (GLUT-1) is Selectively Localized to the Bloodbrain Barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization." *J Biol Chem* 265 (1990): 18035-40.
- Pekny, M., and M. Nilsson. "Astrocyte Activation and Reactive Gliosis." *Glia* 50, no. 4 (2005): 427-34.
- Peters, A., S. L. Palay, and H. D. Webster. "The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their supporting Cells", *Oxford University Press*, Third Edition (1991).
- Pozzessere, G., E. Valle, C. D'Alessio, G. Soldati, F. Pierelli, F. Leonetti, M. Foniciello, and G. Tamburrano. "Effects of Spontaneous Chronic Hypoglycemia on Central and Peripheral Nervous System in Insulinoma

- Patients before and after Surgery: A Neurophysiological Follow-Up." *J Clin Endocrinol Metab* 82, no. 5 (1997): 1447-51.
- Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik, and J. P. Antel. "Glial Cell Influence on the Human Blood-Brain Barrier." *Glia* 36, no. 2 (2001): 145-55.
- Saltiel, A. R., and C. R. Kahn. "Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism." *Nature* 414, no. 6865 (2001): 799-806.
- Schlosshauer, B. "The Blood-Brain Barrier: Morphology, Molecules, and Neurothelin." *Bioessays* 15, no. 5 (1993): 341-6.
- Sholl, D. A. "Dendritic Organization in the Neurons of the Visual and Motor Cortices of the Cat." *J Anat* 87, no. 4 (1953): 387-406.
- Song, H., C. F. Stevens, and F. H. Gage. "Astroglia Induce Neurogenesis from Adult Neural Stem Cells." *Nature* 417, no. 6884 (2002): 39-44.
- Sotelo, C. "Immunohistochemical Study of Short- and Long-Term Effects of Di-Fenfluramine on the Serotonergic Innervation of the Rat Hippocampal Formation." *Brain Res* 541, no. 2 (1991): 309-26.
- Suh, S. W., Y. Fan, S. M. Hong, Z. Liu, Y. Matsumori, P. R. Weinstein, R. A. Swanson, and J. Liu. "Hypoglycemia Induces Transient Neurogenesis and Subsequent Progenitor Cell Loss in the Rat Hippocampus." *Diabetes* 54, no. 2 (2005): 500-9.
- Suh, S. W., E. T. Gum, A. M. Hamby, P. H. Chan, and R. A. Swanson. "Hypoglycemic Neuronal Death Is Triggered by Glucose Reperfusion and Activation of Neuronal NADPH Oxidase." *J Clin Invest* 117, no. 4 (2007): 910-8.
- Taupin, P. "Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System: Functionality and Potential Clinical Interest." *Med Sci Monit* 11, no. 7 (2005): RA247-52.
- Van Praag, H., A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer, and F. H. Gage. "Functional Neurogenesis in the Adult Hippocampus." *Nature* 415, no. 6875 (2002): 1030-4.
- Warwick, R., and P. L. Williams. "Gray's Anatomy." *Livingstone*, Edinburgh, Churchill (1973).
- Wiley, J., and Sons Ltd. "elements of Molecular neurobiology." *C U M SMITH*, 3rd ed (2002).
- Zigmond, M., F. Bloom, F. Landis, J. Roberts, and L. Squire. "Fundamental Neuroscience." *Academic Press* (1999).