

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**DAÑO OXIDATIVO Y MUERTE NEURONAL EN UN  
MODELO DE HIPOGLUCEMIA INDUCIDA POR  
INSULINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

LIBB María Luisa Haces del Blanco

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Lourdes Massieu Trigo

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Maricia Hiriart Urdanivía

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

MÉXICO, D.F.

Diciembre 2009



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

¿Qué es la vida? Un frenesí  
¿Qué es la vida? Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño;  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son.

Calderón de la Barca

A Santiago

A Regina, Diego y Begoña.

A mis padres.

A mis hermanas.

A Mayos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros del jurado, por las correcciones hechas a la presente tesis, y por su contribución a la materialización de un sueño. GRACIAS.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Marcia Hiriart y el Dr. Mauricio Díaz, por sus consejos, sus comentarios, su dirección en el desarrollo del proyecto y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Lourdes Massieu, por su apoyo, por su persistencia, por su paciencia, por sus consejos, por su capacidad de ver la luz al final del túnel, por su comprensión y su confianza. Mil Gracias.

A Tere Montiel por todos esos experimentos compartidos, por su habilidad, su paciencia, su apoyo y su granote de arena para que este trabajo se completara, no tengo palabras suficientes de agradecimiento. Por todas esas comidas compartidas y por ser como eres, gracias Montiel.

A mis entrañables amigas, de aquí Karla, Perla y Yu y de allá Mariana, Mati y Bea, por todos esos capuchinos platicados y los sueños compartidos.

A los compañeros del laboratorio, a los que están (Ana, Paloma, Blanca, y Selene) y a los que ya se fueron (Octa, Alberto, Karla y Perla) por aguantarme pero sobre todo por hacer ameno el laboratorio. En especial gracias a Ceci por mantener el laboratorio en tan buenas condiciones, por todo el material lavado, por los martes de journal y por su sonrisa.

A mi familia, Santi mil gracias por tu apoyo, por tu comprensión y por el respeto demostrado... a mis hijos por darle alegría a mis días. Los adoro.

A mis papás, a Marina y Ma. José por su incansable ayuda, por dejarme volar y por creer en mí.

A Mayos por todo y por tanto. Gracias por enseñarme a ir "donde el corazón te lleve".

# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

## INTRODUCCIÓN

### 1. Metabolismo energético cerebral

#### 1.1 Metabolismo de glucosa

- Glucólisis y ciclo de Krebs
- Glucogénesis y glucogenólisis
- Vía de las pentosas

#### 1.2 Transportadores de glucosa (GLUT)

#### 1.3 Metabolismo de cuerpos cetónicos

- Papel neuroprotector de los cuerpos cetónicos

#### 1.4 Transportadores de monocarboxilatos (MCT)

### 2. Hipoglucemia

#### 2.1 Cambios en la actividad eléctrica cerebral durante la hipoglucemia

#### 2.2 Mecanismos de muerte neuronal asociada a la hipoglucemia

- Artículo 1: Mecanismos de muerte neuronal en la hipoglucemia.
- Artículo 2: Changes in the antioxidant defense machinery associated with ischemia and hypoglycemia. In vivo studies in the central nervous system.

#### 2.3 Avances recientes en el campo de la hipoglucemia

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPÓTESIS

## OBJETIVOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

## RESULTADOS

1. Vulnerabilidad cerebral selectiva al daño oxidativo y su relación con la muerte neuronal en condiciones de hipoglucemia

-Artículo 3: Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia.

2. Papel de los cuerpos cetónicos en la prevención del daño oxidativo asociado a la hipoglucemia

2.1 Efecto de los cuerpos cetónicos sobre el daño oxidativo inducido por la hipoglucemia en el cerebro de la rata

-Artículo 4: Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions.

## DISCUSIÓN

## CONCLUSIONES

## LISTA DE ABREVIATURAS

## REFERENCIAS

## RESUMEN

La glucosa es el principal sustrato energético del cerebro y su aporte continuo es necesario para la actividad cerebral normal. Cuando la concentración sanguínea de glucosa disminuye, fenómeno conocido como hipoglucemia, la función cerebral se altera. La hipoglucemia es un padecimiento generalmente transitorio que puede presentarse de manera crónica en pacientes con alteraciones hormonales, o bien, en pacientes diabéticos. Trabajos clásicos han demostrado que en el cerebro existe una vulnerabilidad selectiva al daño hipoglucémico siendo el hipocampo, la corteza cerebral y el estriado, las regiones más afectadas. Cuando los niveles de glucosa disminuyen a 20 mg/dl o menos, la actividad cerebral cesa, lo que se conoce como periodo isoeléctrico o coma. Recientemente, se ha sugerido la presencia de estrés oxidativo en condiciones de hipoglucemia, aunque su distribución temporal y regional, así como su posible contribución al daño selectivo han sido poco exploradas. En este trabajo evaluamos la distribución regional de marcadores de estrés oxidativo en animales hipoglucémicos antes del coma, y en animales que recibieron una infusión de glucosa, para prevenir el desarrollo del periodo isoeléctrico. Por otro lado, en algunas condiciones, el cerebro es capaz de utilizar sustratos energéticos alternativos a la glucosa, como los cuerpos cetónicos (acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato). Su utilización está limitada por su baja concentración sanguínea, sin embargo, al aumentar su disponibilidad se ha encontrado que tienen un efecto neuroprotector en diversos modelos de daño neuronal. Este efecto se ha atribuido principalmente a su utilización como sustratos energéticos, mientras que otros mecanismos protectores han sido poco explorados. En este trabajo también se evaluó el posible efecto antioxidante de los cuerpos cetónicos y su relación con los niveles de lipoperoxidación en el cerebro de animales hipoglucémicos. Los resultados muestran que existe daño oxidativo en lípidos y proteínas de las regiones del cerebro vulnerables a la muerte hipoglucémica, mientras que el cerebelo que es una región más resistente a esta condición, no presentó aumento en ningún marcador de estrés oxidativo. El aumento en los marcadores de daño oxidativo en las regiones vulnerables correlaciona con la presencia de células dañada. Así mismo, ambos isómeros del  $\beta$ -hidroxibutirato fueron capaces de prevenir la lipoperoxidación en dichas regiones, lo que sugiere un importante papel antioxidante de este cuerpo cetónico.

## **ABSTRACT**

Brain depends on the continuous supply of glucose as main energy substrate. Whenever this supply is interrupted, as during ischemia or hypoglycemia, normal brain function is impaired. Hypoglycemia is usually a transitory condition but can become chronic in patients with hormonal alterations and in type 1 diabetic patients. If blood glucose level decreases to 20 mg/dl or less, brain activity ceases, a condition known as isoelectric period or hypoglycemic coma. Classic studies in this field, have demonstrated selective brain vulnerability to hypoglycemia, being the hippocampus, the cerebral cortex and the striatum the most affected regions. Recently, the presence of oxidative stress during hypoglycemia has been suggested, but its temporal and regional distribution, as well as its possible role in selective brain damage remains unknown. In the present study we have evaluated the regional distribution of oxidative stress markers in the brain of hypoglycemic animals, either before the isoelectric period or after the infusion of glucose, that prevents the development of the coma state. Besides, it is well-know that the brain is able to use alternative metabolic substrates such as the ketone bodies,  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetoacetate, in certain conditions. During adulthood ketone bodies blood levels are low and so is their utilization by brain. Many strategies have been conducted to raise their levels, and a neuroprotective effect against diverse neurotoxic stimuli has been shown. Most studies relate their neuroprotective effect to their metabolic action, while other mechanisms of neuroprotection have been less explored. Thus, we have evaluated the antioxidant action of ketone bodies in different brain regions under non-coma hypoglycemic conditions, as well, as their potential to prevent oxidative damage in brain. Results show that hypoglycemia promotes a pro-oxidant state in vulnerable brain regions, leading to the oxidation of lipids and proteins, which correlates with the presence of cell death. Interestingly, no oxidative damage was found in cerebellum, a far less vulnerable region to hypoglycemia. In addition, we found that both isomers of  $\beta$ -hydroxybutyrate have antioxidant capacity, which can prevent hypoglycemia-induced oxidative damage to brain lipids.



### **III ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

La tesis está organizada en ocho secciones: Introducción, Antecedentes, Hipótesis, Objetivos, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión y Referencias.

La introducción inicia con un panorama general del metabolismo energético cerebral, seguido del metabolismo de glucosa y de los cuerpos cetónicos. A continuación se da una introducción sobre la condición de hipoglucemia, que incluye una descripción breve de los mecanismos encargados de regular la concentración sanguínea de glucosa. Una explicación de los cambios en la actividad eléctrica cerebral en condiciones de hipoglucemia, así como los mecanismos y distribución del daño hipoglucémico en el cerebro, precede al primer artículo de revisión sobre el tema (Artículo 1). Este artículo profundiza en los mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia y describe básicamente resultados obtenidos en trabajos donde se utilizó el modelo de hipoglucemia severa con presencia de coma. La segunda revisión (Artículo 2) trata sobre el papel del estrés oxidativo en el daño neuronal inducido tanto en condiciones de isquemia como de hipoglucemia, enfocándose principalmente al estado de las defensas antioxidantes. A este trabajo de revisión le sigue la exposición de los avances recientes relacionados con el daño neuronal hipoglucémico

En los antecedentes se incluyen observaciones que sirvieron como pilar para este proyecto de doctorado y se describe así mismo el planteamiento del problema. Luego se plantea la hipótesis original del trabajo y los objetivos del mismo.

En la sección de materiales y métodos se esquematizan brevemente las estrategias experimentales, sin profundizar en las

técnicas empleadas, ya que éstas están descritas ampliamente en los artículos originales incluidos en la sección de resultados.

En la sección de resultados están incluidos 2 artículos originales (Artículo 3 y 4) que contienen la mayor parte del trabajo realizado durante el doctorado, y una sección de resultados adicionales que todavía no se publican. Del Artículo 4 sólo los experimentos *in vivo* forman parte de esta tesis.

En la sección de discusión se presenta de manera integral una discusión breve de todos los resultados presentados en la tesis, seguida de las conclusiones a las que hemos llegado con nuestro trabajo experimental.

Por último se enlistan las referencias citadas en esta tesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
AcAc	acetoacetato
BHB	$\beta$ -hidroxibutirato
BHE	barrera hematoencefálica
FJB	Fluoro-Jade B
GLUT	transportador de glucosa
GSH	glutación reducido
MCT	transportador de monocarboxilato
NO	óxido nítrico
$\cdot$ OH	radical hidroxilo
PARP	polimerasa de poli-ADP ribosa
PRE	pérdida del reflejo de enderezamiento
ROS	especies reactivas de oxígeno
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Metabolismo energético cerebral**

El cerebro tiene un alto gasto energético, relacionado principalmente con el consumo de energía en el mantenimiento de los gradientes iónicos celulares, indispensables en los procesos de señalización (McKenna y col, 2006). El consumo metabólico del cerebro para mantener su funcionamiento normal equivale al 20% del consumo energético basal total, a pesar de que este órgano sólo representa el 2% del peso corporal (McKenna y col, 2006). Debido a esta alta demanda energética el cerebro depende del aporte continuo de oxígeno y de sustratos energéticos. La obtención de sustratos energéticos en el cerebro está regulada por la presencia de transportadores específicos para éstos en la barrera hematoencefálica (BHE), ya que esta barrera aísla al sistema nervioso central (SNC) del torrente sanguíneo. La BHE está formada por células endoteliales, de los capilares cerebrales, que están unidas entre sí por uniones estrechas sin fenestraciones, conformando una barrera continua entre la sangre y el líquido intersticial (Pardridge, 1983). La función principal de la BHE es aislar al cerebro de las fluctuaciones iónicas que ocurren en la sangre, y de esta manera se logra que el medio que lo baña sea constante, lo cual es imprescindible para su funcionamiento.

En la edad adulta, el principal sustrato energético del cerebro es la glucosa, por lo que su transportador es el más activo y abundante de la BHE (Lund, 1979). Si su aporte se ve interrumpido o limitado, ya sea por un evento isquémico o por la disminución en sus niveles sanguíneos (fenómeno conocido como hipoglucemia), el funcionamiento normal del cerebro se ve comprometido y puede presentarse daño neuronal.

#### **1.1 Metabolismo de glucosa**

Como se muestra en la Figura 1, la glucosa dentro del cerebro puede participar en diferentes vías metabólicas. La glucosa no solamente es usada como fuente de energía sino que además participa en la síntesis de inositol, la formación de glucógeno, la síntesis de amino ácidos, neurotransmisores y lípidos (McKenna y col, 2006).

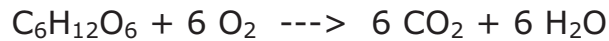


Figura 1. La glucosa tiene múltiples destinos metabólicos en el cerebro. La glucosa es la principal fuente de energía en el SNC, a través de su degradación a  $\text{CO}_2$  por las vías de la glucólisis y el ciclo de Krebs. El metabolismo de la glucosa está íntimamente ligado a la biosíntesis de neurotransmisores e intermediarios del ciclo de Krebs. Parte de la glucosa participa en la vía de las pentosas donde se genera NADPH. Además puede ser almacenada en los astrocitos como glucógeno. Modificado de McKenna y col, 2006.

#### - Glucólisis y ciclo de Krebs

La principal ruta de la glucosa para la obtención de energía es su degradación hasta piruvato en la glucólisis, posteriormente éste se incorpora al ciclo de Krebs para su completa oxidación a  $\text{CO}_2$ , en condiciones aerobias. Estas vías le permiten al cerebro obtener energía produciendo ATP y equivalentes reducidos, los cuales al pasar a través de la cadena respiratoria de la mitocondria se convertirán en fuerza motriz para la producción de más moléculas de ATP. La oxidación completa de una molécula de glucosa a  $\text{CO}_2$

permite la síntesis de 38 moléculas de ATP. La ecuación de la oxidación completa de una molécula de glucosa es:



El cerebro tiene la capacidad de adaptarse a la disminución del suministro de glucosa, sin embargo ésta es limitada. La adaptación del cerebro ocurre básicamente por dos eventos: el aumento en el flujo sanguíneo cerebral y el uso de sustratos alternativos a la glucosa. Algunos de estos sustratos son: proteínas y ácidos grasos cuyo rompimiento aumenta en estas condiciones, lo que genera metabolitos capaces de incorporarse al ciclo de Krebs (Agardh y col, 1980; 1981). Adicionalmente el cerebro obtiene otros sustratos de la sangre, tales como: glicerol, lactato y cuerpos cetónicos (Auer, 2004). Estas moléculas también se incorporan al ciclo de Krebs para producir energía. Todos estos mecanismos en conjunto permiten que el consumo de O<sub>2</sub> se mantenga prácticamente constante aún en presencia de hipoglucemia.

Dada la disminución en la concentración de glucosa, el flujo glucolítico se ve limitado, y con ello el funcionamiento normal del ciclo de Krebs. El ciclo se trunca ya que hay menos cantidad de acetil-CoA para condensarse con el oxaloacetato y formar citrato (Auer, 2004). Por su parte el oxaloacetato interviene en la reacción de transaminación entre el glutamato y el aspartato donde se genera además  $\alpha$ -cetoglutarato capaz de incorporarse de nuevo al ciclo (Sutherland y col, 2008), como se muestra en la Figura 2. Esta reacción permite que parte del ciclo de Krebs continúe y que la concentración de aspartato se incremente considerablemente, tal como ha sido reportado en animales sometidos a una condición hipoglucémica (Sandberg y col, 1986; Sutherland y col, 2008).



Figura 2. El metabolismo de la glucosa normalmente se da a través de la glucólisis en donde se produce piruvato que es incorporado al ciclo de Krebs, como se muestra en gris. En condiciones de hipoglucemia ocurren ajustes metabólicos dados por la disminución en la concentración de glucosa. La reacción que se ve más favorecida es la transaminación de glutamato a aspartato que además permite al  $\alpha$ -cetoglutarato recién formado incorporarse al ciclo y continuar con éste. En negro se representa la parte del ciclo de Krebs que ocurre en condiciones de hipoglucemia. Modificado de Sutherland y col, 2008.

#### - Glucogénesis y glucogenólisis

Otro destino que puede tener la glucosa en el cerebro es la síntesis de glucógeno que se lleva a cabo principalmente en los astrocitos (Brown y Ransom, 2007). Los niveles de glucógeno en el cerebro son un orden de magnitud menor que los niveles hepáticos, pero varias veces mayores que el contenido de glucosa cerebral (Gruetter, 2003). El glucógeno cerebral sirve

como reservorio energético, y su utilización no requiere de energía, ya que su degradación libera moléculas de glucosa-6-fosfato. Esto permite sobrepasar el primer paso de la glucólisis que requiere ATP y es catalizado por la hexocinasa. La actividad de esta enzima se vuelve limitante en condiciones de hipoglucemia (Brown y Ransom, 2007). La movilización basal de glucógeno o glucogenólisis participa en la función cerebral normal (Choi y col, 2003) y durante la hipoglucemia (Suh y col, 2007a). El rompimiento de glucógeno en los astrocitos, se ha sugerido que provee a las neuronas del lactato que utilizarán como sustrato energético (Brown y Ransom, 2007).

Clásicamente se pensaba que por su baja concentración el glucógeno se agotaba rápidamente en condiciones de hipoglucemia (revisado en Cryer y col, 2003). Sin embargo, dado que los niveles de glucosa disminuyen pero nunca llegan a cero, la glucosa se transporta y contribuye a que los niveles de glucógeno sirvan como complemento energético en esta condición (Gruetter, 2003). Se ha demostrado que para que el glucógeno se agote necesitan transcurrir más de 120 min de hipoglucemia severa (Choi y col, 2003; Morgenthaler y col, 2006). Estos resultados sugieren que el glucógeno en sí, es un reservorio importante de energía que puede ser utilizado eficazmente durante la hipoglucemia. Otros grupos han evaluado las concentraciones de glucógeno tanto en modelos de hipoglucemia aguda como recurrente. En ambos casos se ha demostrado que sus niveles disminuyen, lo que refuerza su papel activo como reservorio energético durante la hipoglucemia (Herzog y col, 2008).

#### - Vía de las pentosas

En condiciones basales el 5% de la glucosa cerebral se metaboliza por esta vía, tanto en neuronas como en astrocitos (McKenna y col, 2006). Su principal contribución es la producción de NADPH, el cual es necesario tanto en la síntesis de lípidos como en el mantenimiento del glutatión reducido



(Wood, 1986). Además, esta vía provee las pentosas necesarias para la síntesis de nucleótidos (Wood, 1986). La vía consta de dos fases: una oxidativa donde se producen las moléculas de NADPH y otra no oxidativa donde se recuperan 5 hexosas a partir de 6 pentosas. El flujo por esta vía se cree está regulado por la concentración de glucosa-6-fosfato, NADP<sup>+</sup>, gliceraldehido-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, estos dos últimos compuestos son intermediarios de la fase no oxidativa.

## 1.2 Transportadores de glucosa (GLUT)

La glucosa entra al cerebro por difusión facilitada a través de la BHE. En este proceso intervienen los GLUT que son una familia de transportadores encargados de la entrada de glucosa tanto en tejidos periféricos como en el cerebro. Se han descrito algunas isoformas que están expresadas específicamente en el SNC (para revisión ver McEwen y Reagan, 2004). Los transportadores más ampliamente distribuidos en el SNC son el GLUT tipo 1 (GLUT1) y el tipo 3 (GLUT3) (Maher y col, 1994). Ambos transportadores son los principales encargados del transporte de glucosa que será utilizada como sustrato energético a nivel central.

GLUT1 co-existe como dos isoformas de 55 y 45 KDa respectivamente; las cuales solo se distinguen por sus niveles de glucosilación. El GLUT1 altamente glucosilado (55 KDa) se expresa en células endoteliales de la microvasculatura cerebral mientras que la isoforma de 45 KDa se localiza en la membrana plasmática de los astrocitos. En cambio GLUT3 se localiza específicamente en neuronas preferencialmente en el neuropilo y tiene una amplia distribución en el cerebro (Nehlig, 1997).

Otros tipos de GLUT se han descrito en el cerebro, sin embargo, su distribución es más discreta y está relacionada con funciones más específicas. El GLUT tipo 2 (GLUT2) se localiza principalmente en el hígado y en el páncreas donde sirve como un sensor de glucosa que determina la

liberación de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas (Gould y Bell, 1990). El GLUT2 a nivel central se ha descrito en núcleos hipotalámicos que se asocian con el monitoreo central de la concentración de glucosa (Levin y col, 2001). En animales transgénicos, donde este gen ha sido deletado, la liberación sistémica de glucagon, en respuesta a la hipoglucemia, se ve anulada y ésta se restablece cuando el gen es reintroducido bajo un promotor específico de células gliales (Marty y col, 2005). Estos resultados sugieren un papel importante de la glia como sensor y orquestador de la respuesta hormonal ante la hipoglucemia.

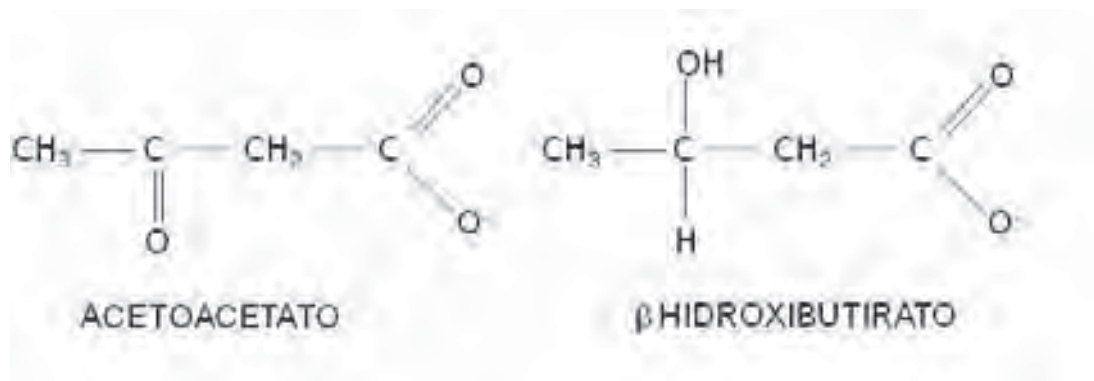
El GLUT tipo 4 (GLUT4), es el transportador dependiente de insulina localizado principalmente en músculo y tejido adiposo (McEwen y Reagan, 2004). Su localización plasmática aumenta en condiciones de hiperinsulinemia lo que promueve la entrada de glucosa en estos tejidos. En el cerebro, se ha demostrado, que el GLUT4 existe en algunas regiones específicas y su expresión se ha visto tanto en la membrana plasmática como en el citosol de neuronas, lo que sugiere la existencia de una poza que podría ser movilizada en presencia de insulina (Messari y col, 1998). Su expresión coincide con la presencia del receptor de insulina aunque su posible función aún se desconoce. Otro transportador regulado por insulina es el GLUT tipo 8, el cual también se ha visto expresado en el cerebro. El GLUT tipo 5, que se localiza principalmente en el intestino, se ha visto expresado en la microglia aunque su función no ha sido esclarecida.

Recientemente un estudio basado en la técnica de micro arreglos, ha demostrado que el gen para el GLUT1 se expresa durante la hipoglucemia incluso cuando esta condición es muy moderada (Mastaitis y col, 2005), lo que sugiere un posible aumento en su expresión como medida compensatoria ante la disminución en los niveles de glucosa.

### 1.3 Metabolismo de cuerpos cetónicos

Uno de los principales sustratos alternativos a la glucosa son los cuerpos cetónicos. En el cerebro, éstos se utilizan en condiciones en las que la oxidación de glucosa no satisface las necesidades cerebrales. Los cuerpos cetónicos son 3: acetoacetato (AcAc),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) y acetona. La acetona se forma a partir del AcAc de manera no enzimática, se produce en cantidades mínimas y es exhalada en la respiración, por lo que no tiene una contribución metabólica importante (Musa-Veloso y col, 2006).

La estructura química de los cuerpos cetónicos es la siguiente:



El BHB tiene un carbón quiral lo que genera que exista en dos isoformas: L y D. Fisiológicamente el isómero D es el que se produce y se consume en el metabolismo, ya que las enzimas que intervienen en su ruta metabólica son específicas para este isómero. En cambio, el transporte del BHB a través de la BHE no es específico para algún isómero; es decir, su transportador es capaz de reconocer tanto al D-BHB como al L-BHB (Pierre y Pellerin, 2005).

Endógenamente, los cuerpos cetónicos se producen principalmente en el hígado como resultado de la oxidación excesiva de ácidos grasos. Su síntesis está altamente regulada, no sólo a nivel global por hormonas (insulina y glucagon) que actúan sobre el tejido adiposo, sino a nivel local; es decir, existe un control intrahepático. Se ha reportado también que en los

astrocitos se pueden sintetizar los cuerpos cetónicos a partir de ácidos grasos (Auestad, 1991) y de leucina (Bixel y Hamprecht, 1995), teniendo esta producción propiedades similares a la síntesis hepática (Guzmán y Blázquez, 2001) tanto a nivel de regulación, como de algunas enzimas.

La primera demostración de su utilización metabólica se hizo en sujetos obesos con períodos de ayuno prolongado, en los cuales no se observó degradación de proteínas pero si un aumento en la concentración sanguínea de los cuerpos cetónicos (Owen y col, 1967). También se ha visto que están involucrados en la lipogénesis cerebral durante la etapa postnatal temprana (Patel y Owen, 1976; 1977), y que pueden ser precursores de aminoácidos, en esta misma etapa (DeVivo y col, 1975). Durante esta etapa constituyen el principal sustrato energético del cerebro y esto se debe al alto contenido lipídico de la leche materna (Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1993). Al madurar el animal, junto con el cambio de dieta, la utilización de los cuerpos cetónicos disminuye dado que su concentración sanguínea baja (Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1993). Se ha demostrado que la utilización de los cuerpos cetónicos es directamente proporcional a su concentración en la sangre (Hawkins, 1971), y que ésta es independiente del estado nutricional del animal (Hawkins y col, 1971; Kammula, 1976). Las enzimas que permiten la transformación de los cuerpos cetónicos a acetil-CoA se encuentran activas en el animal adulto (Williamson y col, 1971), lo que les permite incorporarse al ciclo de Krebs. Es por ello que si los cuerpos cetónicos son infundidos en animales adultos estos son capaces de utilizarlos. Se ha visto que la oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos disminuye en presencia de los cuerpos cetónicos (Robinson y Williamson, 1980; Ruderman y col, 1974). Las vías de síntesis y la utilización de los cuerpos cetónicos en el cerebro se muestran en la Figura 3.

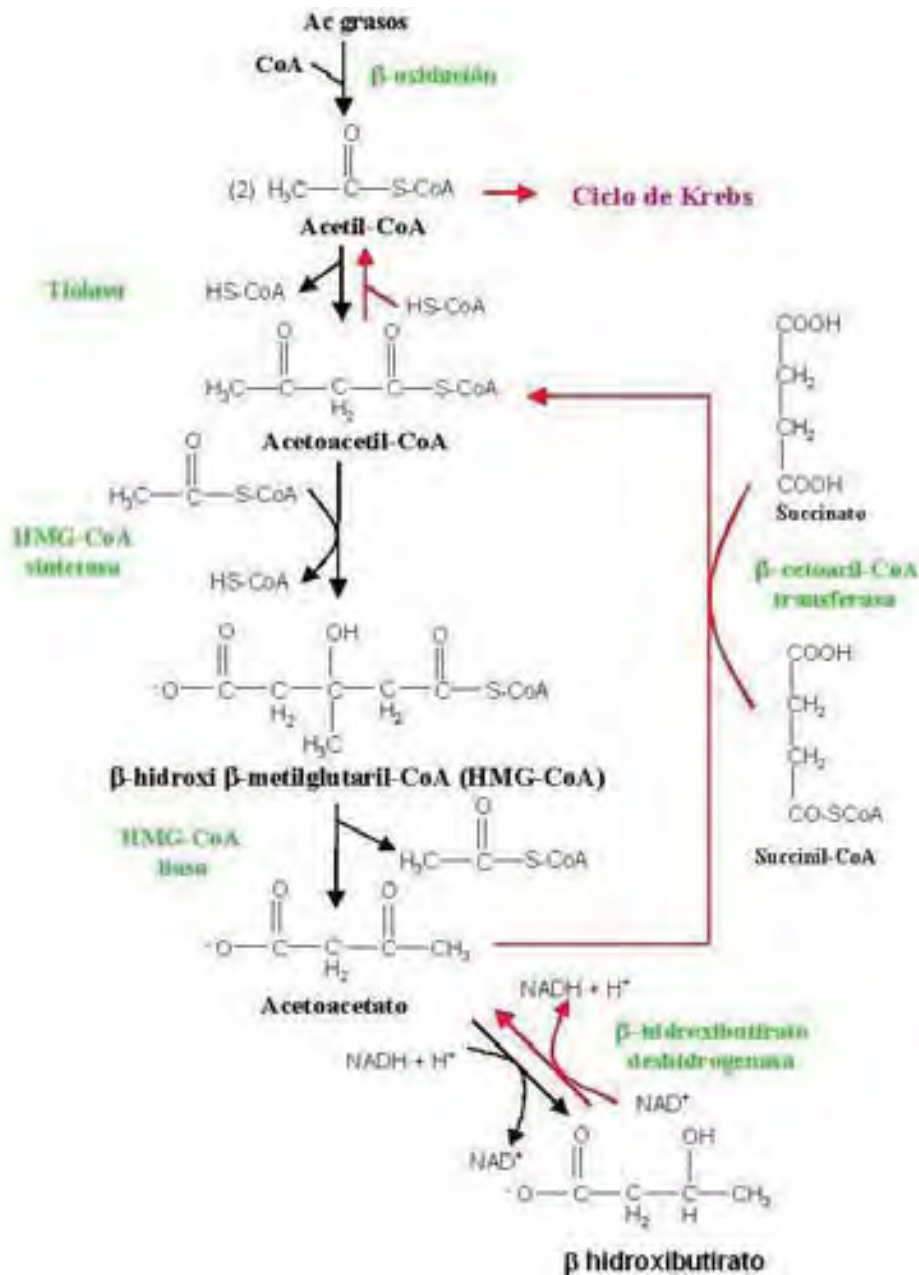


Figura 3. Vías de síntesis y utilización de los cuerpos cetónicos. Las flechas negras muestran la vía de síntesis de los cuerpos cetónicos que se lleva a cabo principalmente en las mitocondrias hepáticas, como resultado de la oxidación de los ácidos grasos. Las flechas rojas indican la vía de utilización de los cuerpos cetónicos. Las enzimas involucradas en esta vía difieren de un tejido a otro, las aquí mostradas son las que participan en la utilización de los cuerpos cetónicos en el cerebro.

-Papel neuroprotector de los cuerpos cetónicos

La concentración sanguínea de los cuerpos cetónicos, y por tanto su oxidación cerebral, puede aumentarse significativamente como resultado de una dieta cetogénica, el ayuno prolongado o bien por una infusión exógena

de los mismos, entre otras (Owen y col, 1967; Hawkins y Biebuyck, 1979; Yudkoff y col, 2001). Algunas de estas estrategias se han utilizado para evaluar el efecto protector de los cuerpos cetónicos ante diversos estímulos neurotóxicos (revisado por Smith y col, 2005).

La dieta cetogénica, rica en lípidos y baja en carbohidratos, promueve la síntesis de cuerpos cetónicos. Esta dieta se usa en forma eficiente en infantes como tratamiento de la epilepsia refractaria (Nordli y col, 2001; Yudkoff y col, 2001) y también para controlar las crisis convulsivas inducidas por el ácido kaínico (Noh y col, 2006). Recientemente, esta dieta también ha sido utilizada en ratas jóvenes para prevenir el daño en condiciones de hipoglucemia (Yamada y col, 2005). En este estudio las ratas recibieron la dieta cetogénica durante 5 días antes de ser sometidas a un evento hipoglucémico sin coma. Los animales tratados presentaron menos células marcadas con Fluoro-Jade B (FJB), que es un marcador de muerte (Yamada y col, 2005). Por otro lado, se ha visto que una infusión cetótica previene la muerte neuronal asociada a eventos de hipoxia e isquemia (Suzuki y col, 2001; Suzuki y col, 2002; Masuda y col, 2005). También se ha observado que estos compuestos pueden prevenir el daño neuronal en modelos *in vivo* e *in vitro* de la enfermedad de Parkinson (Kashiwaya y col, 2000; Tieu y col, 2003). En ambos estudios se utilizó la neurotoxina MPP<sup>+</sup>, la cual inhibe al complejo I de la cadena respiratoria y causa degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra emulando la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, neuronas expuestas al fragmento 1-42 del péptido  $\beta$  amiloide, que es un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, son protegidas en presencia de D-BHB (Kashiwaya y col, 2000). Por su parte en nuestro laboratorio hemos demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que los cuerpos cetónicos previenen la muerte neuronal excitotóxica en condiciones de inhibición metabólica (Massieu y col, 2003; Mejía-Toiber y col, 2006).

Todos los estudios descritos anteriormente han evaluado el potencial neuroprotector ya sea del AcAc, del D-BHB o de ambos, como en la dieta cetogénica; mientras que el efecto protector del L-BHB no ha sido explorado. En este sentido el isómero L puede utilizarse como una estrategia experimental que nos permite distinguir si la protección obtenida con el BHB está relacionada únicamente con su utilización metabólica o bien se debe a otros efectos, como por ejemplo una actividad antioxidante intrínseca.

#### 1.4 Transportadores de monocarboxilatos (MCT)

En 1975 se demostró que el transporte de los cuerpos cetónicos a través de la BHE es un proceso saturable (Gjedde y Crone, 1975), y que existe competencia entre el AcAc y el BHB, transportándose el primero más eficientemente (Hawkins y col, 1971). También se demostró que el transporte es un proceso inducible por la presencia de cuerpos cetónicos en la sangre (Gjedde y Crone, 1975; Daniel y col, 1977; Hasselbach y col, 1995; Pan y col, 2001), sobre todo si su disponibilidad es continua como en el caso del ayuno prolongado o la dieta cetogénica (Leino y col, 2001). El transportador que está involucrado en este proceso pertenece a la familia de MCT, los cuales también acarrean lactato, piruvato y los  $\alpha$ -cetoácidos de varios aminoácidos neutros (Pardridge, 1991). Dada la naturaleza hidrofílica de los monocarboxilatos su entrada al cerebro y a las células está mediada por los MCT que se localizan en la membrana plasmática tanto de células endoteliales de la BHE, como de las neuronas y astrocitos (Halestrap y Price, 1999).

Ahora se sabe que la familia de los MCT está compuesta de 14 miembros, de los cuales el MCT los tipos 1, 2 y 4 (MCT1, MCT2, MCT4) se expresan en el SNC (Hertz y Dienel, 2005). Al menos para estos tipos, se ha demostrado que co-transportan una molécula de monocarboxilato y un protón en la misma dirección, con una estequiometría equimolar (Pierre y

Pellerin, 2005). Dado que es un proceso bidireccional, el transporte está regulado por la diferencia de pH y el gradiente del sustrato (Halestrap y Price, 1999). Los MCT1 y MCT4 tienen baja afinidad mientras que la afinidad del MCT2 por el sustrato es alta (Hertz y Dienel, 2005). Se ha estudiado la distribución celular y se ha visto que el MCT1 se expresa abundantemente en células endoteliales que forman la vasculatura cerebral, en los endotelios que rodean los cuatro ventrículos cerebrales, así como en astrocitos (Pierre y Pellerin, 2005). El MCT2 se ha encontrado principalmente en neuronas, siendo su expresión muy abundante en la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Pierre y Pellerin, 2005). Por su parte el MCT4 está expresado exclusivamente en astrocitos, y su distribución se ha encontrado enriquecida en el hipocampo, el estriado y la corteza, al menos en roedores (Pierre y Pellerin, 2005).

En conclusión, la oxidación de los cuerpos cetónicos en el cerebro está limitada por su transporte a través de la BHE y por su concentración sanguínea. A su vez, la disponibilidad del oxaloacetato y de CoA es necesaria para que puedan incorporarse al ciclo de Krebs.

## 2. Hipoglucemia

Se considera que en el humano adulto existe una condición hipoglucémica cuando la concentración sanguínea de glucosa se reduce a menos de 50 mg/dl, o bien cuando los niveles plasmáticos están por debajo de 60 mg/dl (Davidson, 2002). En infantes se considera como hipoglucemia una concentración sanguínea menor a 40-45 mg/dl (Sperling, 2002).

En humanos existen varios mecanismos que mantienen los niveles postprandiales de glucosa en un rango fisiológico entre 70-110 mg/dl (Cryer, 2007). Cuando su concentración disminuye a 81 mg/dl, la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas cesa (Cryer, 2007). Si la glucosa sigue disminuyendo, por debajo del rango fisiológico (68 mg/dl), algunos



mecanismos se activan, tales como: la liberación de glucagon en el páncreas y de epinefrina por las glándulas adrenales, entre otras respuestas neuroendócrinas (Cryer, 2007). Si estas medidas compensatorias no son suficientes, cuando la concentración de glucosa disminuye a niveles de 54 mg/dl se presenta una respuesta simpatoadrenal mayor, que es la responsable de los síntomas autonómicos de la hipoglucemia (Cryer, 2007). Estos síntomas incluyen: debilidad, sudoración, taquicardia, palpitaciones, irritabilidad, entre otros (Cryer y col, 2003). Alrededor de esta misma concentración de glucosa se presentan los síntomas neurológicos como consecuencia de una menor actividad del SNC; entre éstos se encuentran dolor de cabeza, hipotermia, alteraciones visuales, confusión, y amnesia (Cryer y col, 2003). La percepción de estos síntomas se acompaña de la conducta de defensa: la ingesta de alimentos (Cryer, 2007). Si todos estos mecanismos fallan, y la concentración de glucosa sigue disminuyendo se presentará un decaimiento de las funciones cognitivas, conductas aberrantes, crisis convulsivas y coma. Todas estas respuestas son interrumpidas en cuanto el rango fisiológico de glucosa se recupera (Cryer, 2007).

La disminución de glucosa es percibida a nivel central por los glucosensores localizados en la zona ventromedial del hipotálamo, localizados principalmente en el núcleo paraventricular y el núcleo arcuato (Davidson, 2002). Las hormonas liberadas a nivel sistémico (glucagon y epinefrina) evitan que los niveles de glucosa sigan disminuyendo a concentraciones peligrosamente bajas. En conjunto, todas estas hormonas favorecen principalmente la liberación hepática de glucosa, y con ello la normalización de sus niveles sanguíneos.

La hipoglucemia es un padecimiento poco frecuente, aunque puede presentarse en individuos con trastornos hormonales, por ejemplo, pacientes que presentan un insulinooma (de Herder, 2004). Sin duda los pacientes más

afectados son aquellos que padecen diabetes tipo 1, ya que el tratamiento de su enfermedad consiste principalmente en la administración de insulina. Estos pacientes presentan niveles sanguíneos de glucosa por debajo de 50 mg/dl el 10% del tiempo; y en general sufren dos episodios sintomáticos de hipoglucemia dos veces por semana, y al menos un estado de hipoglucemia severa al año por lo que tienen que ser hospitalizados (Cryer, 2007). La aparición frecuente de hipoglucemia en la diabetes tipo 1 se debe a que los pacientes van perdiendo las respuestas hormonales normales que previenen el desarrollo de esta condición (Cryer y col, 2003). En los primeros 5 años de la enfermedad, la respuesta del glucagon disminuye, para finalmente perderse y más adelante (alrededor de 10 años) la respuesta adrenérgica también se ve atenuada, lo que generalmente se acompaña de la pérdida de la habilidad para reconocer la hipoglucemia, ya que los síntomas desaparecen. Ésto incrementa el riesgo de que el paciente tenga un episodio de hipoglucemia severa y caiga en coma (Cryer y col, 2003).

La diabetes es una enfermedad muy común en la actualidad, se estima que alrededor del 7% de la población adulta mundial la padece (International Diabetes Federation, 2009). En la zona de Norte América y el Caribe se calcula que existen 37.4 millones de personas afectadas con este padecimiento (International Diabetes Federation, 2009). En México la diabetes es una de las principales causas de mortalidad (INEGI, 2005). La diabetes tipo 1 es menos frecuente que la tipo 2, ya que ésta constituye alrededor del 90% de todos los casos (Heaton y col, 2003). La hipoglucemia en los pacientes que padecen diabetes tipo 2 se presenta en estados avanzados de la enfermedad (Baner y Cryer, 2004), ya que el progreso de la enfermedad se acompaña de una disminución en la insulina (Cryer y col, 2003). También se presenta cuando estos pacientes son tratados con secretagogos de insulina (Baner y Cryer, 2004). Por ello, un gran número de pacientes sufren cotidianamente los síntomas de la hipoglucemia.

## 2.1 Cambios en la actividad eléctrica cerebral durante la hipoglucemia

El electroencefalograma (EEG) es una herramienta importante en los modelos de hipoglucemia, ya que los cambios en la actividad eléctrica cerebral monitoreados a través del EEG, correlacionan con la subsecuente presencia o ausencia de daño cerebral. Normalmente el EEG en vigilia consiste de ondas en el rango de 8-13 Hz (ondas  $\alpha$ ) y 13-25 Hz (ondas  $\beta$ ). Las ondas  $\delta$  de 1-4 Hz están ausentes en vigilia mientras que las ondas  $\theta$  de 4-8 Hz constituyen un componente menor del registro (Auer, 2004). Conforme se desarrolla la hipoglucemia el registro va haciéndose más lento, es decir, predominan las ondas de mayor amplitud y menor frecuencia (ondas  $\theta$ ,  $\delta$ ) (Auer, 2004). Cuando los niveles de glucosa sanguíneos son  $\leq 18$  mg/dl el EEG se aplana, pues se pierde la actividad cerebral, y ésto indica el inicio del estado de coma o periodo isoeléctrico. Se ha visto, tanto en individuos sanos como en pacientes diabéticos, que un episodio de hipoglucemia moderada es capaz de aumentar las ondas de baja frecuencia en el EEG (Tallroth y col, 1990) y de alterar la función cognoscitiva (McCrimmon y Frier, 1994).

Estudios clásicos apoyan la idea de que el daño cerebral está determinado por la presencia del periodo isoeléctrico y que la duración de éste tiene una relación directa con la extensión del daño (Auer y col, 1984a). Estudios pioneros establecieron la presencia de muerte neuronal retardada (7 días después) en animales hipoglucémicos sometidos a un período de coma superior a los 20-30 min. En estos trabajos el daño neuronal se evaluó a través de la tinción de Nissl con la cual se identificó la pérdida masiva de neuronas en distintas regiones del cerebro, principalmente en el hipocampo (Auer y col, 1984b).

## 2.2 Mecanismos de muerte neuronal asociada a la hipoglucemia

Los mecanismos propuestos para explicar el daño neuronal subsecuente a un episodio de hipoglucemia severa han sido incluidos en un artículo de revisión publicado en el 2005. En el artículo se revisa el papel de algunos factores como la activación de los receptores a glutamato, el incremento de la concentración intracelular de calcio, el estado energético celular, la falla mitocondrial, la activación de algunas proteasas y el estrés oxidativo. Por otra parte, se incluye además un capítulo que está en prensa, el cual se centra en la revisión del estado de las defensas antioxidantes durante un evento isquémico e hipoglucémico. Tras ésta revisión se detallan los avances más recientes en cuanto al papel del estrés oxidativo en la muerte neuronal hipoglucémica.

**Artículo 1**

“Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia.”

Ma. Luisa Haces del Blanco, Lourdes Massieu-Trigo

Arch. Neurocién. (Mex) 2005

Vol. 10 No. 2: 83-91.

## Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia

Ma. Lilia Haces del Blanco, Lourdes Masirou-Trigo\*

### RESUMEN

La concentración fisiológica de la glucosa sanguínea en los humanos (80-90 mg/dl) se mantiene en este rango a través de mecanismos sistémicos altamente regulados. Cuando estos mecanismos no operan adecuadamente, la glucosa sanguínea disminuye dando lugar a un estado de hipoglucemia. La disminución de glucosa por debajo de los 20 mg/dl induce un estado de coma hipoglucémico caracterizado por el cese o aplaniamiento de la actividad cerebral eléctrica. Dicho estado puede revertirse a través de la administración intravenosa de glucosa. Como consecuencia de un episodio hipoglucémico ocurre daño neuronal debido a que el cerebro es altamente dependiente del aporte sanguíneo de glucosa, la cual es la fuente de energía principal necesaria para su correcto funcionamiento. Una gran variedad de funciones celulares se alteran en condiciones de deficiencia energética, como tales: el mantenimiento de los gradientes iónicos, la liberación y recaptura de neurotransmisores, la regulación de la concentración intracelular de calcio y la función mitocondrial. Muchas evidencias señalan la anticipación del glutamato como excitotóxica en la muerte neuronal hipoglucémica y recientemente, se ha propuesto que el estrés oxidativo juega un papel importante en este proceso. En esta revisión analizamos los factores que contribuyen al desarrollo de daño cerebral en hipoglucemia.

Recibido: 1<sup>o</sup> octubre 2004. Aceptado: 22 octubre 2004.

\*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México  
Correspondencia: Ma. Lilia Haces del Blanco, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510, México D.F., México. E-mail: mhaces@icm.unam.mx

**Palabras clave:** hipoglucemia, daño neuronal, estrés oxidativo, excitotoxicidad

### MECHANISMS INVOLVED IN NEURONAL DAMAGE ASSOCIATED TO HYPOGLYCEMIA

#### ABSTRACT

In physiological conditions blood glucose concentration (80-90 mg/dl) is maintained through highly regulated systemic mechanisms. Disruption of these mechanisms leads to hypoglycemia, whose decreases to levels lower to 20 mg/dl blocks the electrical activity of the brain. This condition is known as hypoglycemic coma and can be overcome by intravenous administration of glucose. Subsequently to the hypoglycemic episode, it occurs brain damage determined by the high dependency of brain on glucose blood supply, which is the main energy source necessary for its normal functioning. Many neuronal functions are compromised during energy failure such as the maintenance of ionic gradients, the release and reuptake of neurotransmitters, the intracellular buffering of calcium, and the mitochondrial function. Excitotoxic glutamate activity in hypoglycemic neuronal damage is well documented, and a role of oxidative stress in this process has recently raised. The contribution of these processes to hypoglycemic brain damage is the main subject of this review.

**Key words:** hypoglycemia, brain damage, oxidative stress, excitotoxicity.

La concentración fisiológica de glucosa en sangre oscila entre 80-90 mg/dl (normoglucemia) y se modifica en diversas situa-



ciones. La ingesta de alimentos induce un aumento en los niveles de glucosa alrededor de 200 mg/dl (hiperglucemia), mientras que en el ayuno prolongado su nivel disminuye hasta 60-40 mg/dl (hipoglucemia moderada). Si el nivel de glucosa disminuye aún más (menor 20 mg/dl) se puede presentar una hipoglucemia severa que se acompaña del cese de la actividad eléctrica del cerebro o de coma hipoglucémico. Existen mecanismos compensatorios encargados de mantener los niveles de glucosa dentro del rango fisiológico, uno de ellos es la liberación de insulina que ocurre como respuesta a la hiperglucemia. La insulina es una hormona pancreática que provoca una disminución en la concentración sanguínea de glucosa, ya que aumenta su captura en diversos tipos celulares, y en especial en el hígado en donde favorece la síntesis de glucógeno y de ácidos grasos, considerándose por eso una hormona anabólica. Por su parte, la hipoglucemia provoca la liberación de hormona de crecimiento, cortisol y epinefrina. Esta última, induce la liberación de glucagón hacia la sangre y la acción conjunta de todas ellas favorecen principalmente la liberación hepática de glucosa (figura 1).

El cerebro depende del aporte continuo de glucosa para su buen funcionamiento, de tal manera que cuando éste se interrumpe, por ejemplo durante la isquemia o la hipoglucemia, se puede presentar daño neuronal. La vulnerabilidad de las distintas regiones cerebrales a la muerte en estas dos situaciones es la misma, siendo más sensibles la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, pero la distribución del daño es diferente<sup>1</sup>. Por ejemplo, en el hipocampo en condiciones de hipoglucemia se lesionan zonas mediales de la región CA1 y el subículo, mientras que éste es resistente a la isquemia.

La hipoglucemia es un estado generalmente transitorio, aunque puede presentarse en forma crónica, tanto en adultos como en infantes con trastornos hormonales, como es la deficiencia de glucagón o alteraciones en la hormona del crecimiento, entre otras. Los pacientes diabéticos dependientes de insulina (diabetes tipo 1) también están expuestos a estados de hipoglucemia, ya que al administrarse la insulina pueden excederse en la dosis y provocar así una disminución excesiva en los niveles sanguíneos de glucosa. La hipoglucemia también puede presentarse como consecuencia de un insulnoma que al sintetizar y liberar insulina de manera excesiva, produce la hipoglucemia. Se ha demostrado que la hipoglucemia moderada afecta los procesos de memoria en humanos<sup>2</sup>, y que episodios repetidos

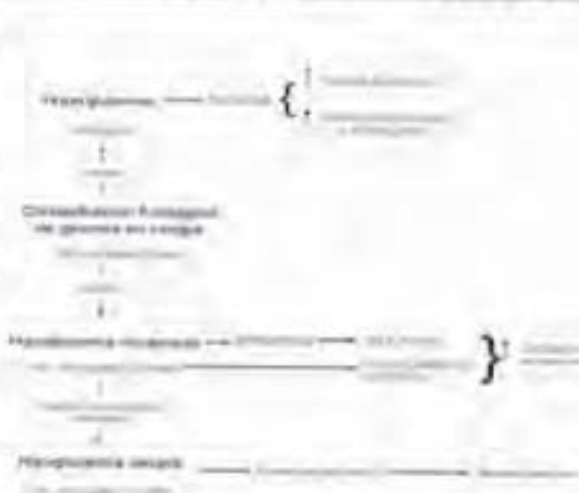


Figura 1. La concentración fisiológica de glucosa en el ayuno prolongado. Tras la ingesta de alimento la glucosa puede elevarse a niveles alrededor de 200 mg/dl, lo que se conoce como hiperglucemia. El organismo responde a este estado con la secreción pancreática de insulina, la cual promueve la captación de glucosa en diversos tipos celulares, tales como en células hepáticas, promoviendo que sus niveles regresen a los niveles basales. Por el contrario, en períodos de ayuno prolongado, (o ayuno exagerado) la glucosa disminuye y se genera lo que se conoce como hipoglucemia moderada. Ante la cual, el organismo induce la liberación de hormona de crecimiento, cortisol y epinefrina. Esta última, estimula la liberación pancreática de glucagón, que junto con las hormonas antes mencionadas, estimula la liberación de glucosa principalmente en el hígado. Si se ignoran estos mecanismos reguladores, los niveles de glucosa pueden llegar a ser menores a 20 mg/dl, induciendo el cese de la actividad eléctrica cerebral y la muerte neuronal subsecuente.

de hipoglucemia severa, frecuentes en los pacientes diabéticos tipo 1, causan déficit cognoscitivo irreversible<sup>3</sup>, el cual correlaciona con el daño a estructuras cerebrales como el hipocampo<sup>4</sup>.

Para estudiar el daño neuronal asociado a la hipoglucemia se han desarrollado diversos modelos animales. El modelo *in vivo* más utilizado es la inyección sistémica de insulina en ratas, la cual provoca una disminución progresiva de la concentración sanguínea de glucosa hasta alcanzar niveles menores a 20 mg/dl e induce un estado de coma o período isoelectrónico. Si éste se prolonga por más de 15 min se produce muerte neuronal. Para restablecer la normoglucemia y la actividad cerebral, y por consiguiente evitar la muerte del animal, se administra glucosa por vía intravenosa. El daño subsiguiente al coma hipoglucémico tiene una relación directa con la duración de éste, entre más largo sea el período isoelectrónico mayor extensión tendrá la lesión<sup>5</sup>. Por otra parte, se han desarrollado modelos *in vitro* en cultivos celulares de tejido cerebral, en los cuales se mimetiza la condición hipoglucémica mediante la privación de

glucosa. Sin embargo, las conclusiones derivadas de los estudios *in vitro* no siempre son extrapolables a lo que ocurre en sistemas *in vivo*. Estos dos tipos de modelos han sido muy útiles para estudiar los mecanismos de muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa. A continuación se describen las observaciones más concluyentes en este campo.

### Los aminoácidos excitadores, la excitotoxicidad y el daño hipoglucémico

El glutamato es el neurotransmisor excitador distribuido más ampliamente en el sistema nervioso central, cuya liberación de la presinapsis ocurre por exocitosis a través de la fusión vesicular dependiente de  $Ca^{2+}$ . Una vez en el espacio sináptico el glutamato se une a dos variedades de receptores postsinápticos: los receptores ionotrópicos que son en sí canales iónicos y los receptores metabotrópicos que están acoplados a cascadas intracelulares de segundos mensajeros.

Los receptores ionotrópicos se han clasificado de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, y se han denominado de acuerdo a su agonista específico: el receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor a kainato y el receptor al ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA). A estos dos últimos se les agrupa como receptores no-NMDA. Los receptores no-NMDA son principalmente permeables a  $Na^+$ , mientras que los NMDA son permeables a  $Ca^{2+}$  y a  $Na^+$ . Estos últimos en condiciones de reposo mantienen bloqueado su canal iónico por un ión  $Mg^{2+}$ . Esto los hace dependientes de voltaje pues es necesario que la membrana se despolarice para que se libere dicho ión y permita el paso de  $Ca^{2+}$ . La despolarización puede ser consecuencia de la activación de los receptores no-NMDA. Un agonista de los receptores NMDA es el aspartato que también es un aminoácido con función de neurotransmisor excitador en el cerebro.

En los años cincuentas, se describieron las propiedades tóxicas del glutamato<sup>1</sup>; sin embargo, el término de excitotoxicidad no fue acuñado sino hasta 1969 por Olney. La excitotoxicidad se refiere a la capacidad del glutamato y otros aminoácidos excitadores, de causar neurodegeneración por la estimulación prolongada de sus receptores postsinápticos<sup>2</sup>. Este tipo de toxicidad se ha descrito en diversos tipos de lesiones como las causadas por un accidente vascular cerebral, por el coma hipoglucémico o por una hemorragia cerebral. Los mecanismos de muerte en estas condiciones no se han

esclarecido completamente, pero se sabe que el  $Ca^{2+}$ , al igual que los aminoácidos excitadores, interviene en su desarrollo<sup>3</sup>.

Dadas las propiedades tóxicas del glutamato, su concentración extracelular está finamente regulada a través de su captura del espacio sináptico por transportadores específicos, una vez que se libera de la terminal sináptica. Estos transportadores se localizan principalmente en la membrana plasmática de los astrocitos, y también se encuentran en neuronas. La captura de glutamato es dependiente de  $Na^+$  y por tanto está acoplada al gradiente electroquímico de  $Na^+/K^+$ , que le sirve de fuerza motora para transportar dicho aminoácido al interior de la célula<sup>4</sup>. El proceso de captura es por tanto dependiente de energía pues el mantenimiento del gradiente de  $Na^+/K^+$  depende del funcionamiento de las bombas  $Na^+/K^+$  que son dependientes de ATP.

El papel del glutamato y del aspartato en el daño hipoglucémico ha sido objeto de estudio de varios grupos y ha quedado establecido el papel preponderante de la excitotoxicidad en el daño producido por la disminución de los niveles de glucosa. Hasta la fecha se sabe por estudios de microdialisis que estos aminoácidos excitadores son liberados desde que se inicia el periodo isoléptico<sup>5</sup>. En estos experimentos se observó que la cantidad de aspartato liberado es mayor que la de glutamato y esto se debe a que el glutamato es utilizado como sustrato metabólico en esta condición, y por tanto su disponibilidad como transmisor se ve limitada favoreciéndose la vesiculación y la liberación del aspartato<sup>6,7</sup>. La acumulación de los aminoácidos excitadores en el espacio sináptico puede deberse básicamente a dos eventos: que su liberación esté aumentada o que los sistemas de captura estén comprometidos. Ambas posibilidades son factibles, pues al colapsarse el gradiente electroquímico, la membrana presináptica se despolariza y se activan los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje incrementándose la concentración intracelular de este ión. El aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular favorece la liberación por exocitosis de neurotransmisor. Por otra parte, si el estado energético no es el óptimo por la ausencia de glucosa, se altera el proceso de captura que es dependiente de energía. Todavía no se ha establecido cual de estos eventos es más importante en la hipoglucemia. Experimentos *in vitro* sugieren la disfunción de los transportadores de glutamato/aspartato ya que si se restablece la concentración de glucosa después de un periodo de privación, el glutamato extracelular vuelve a sus niveles normales siendo este proceso depen-



diente de  $\text{Na}^+$ . Al parecer los sistemas de captura no funcionan adecuadamente en condiciones de hipoglucemia debido a la deficiencia energética.

La acumulación de aminoácidos excitadores en el espacio sináptico, debido al bloqueo de sus transportadores, en sí no es suficiente para provocar muerte neuronal. Se ha demostrado que la acumulación *in vivo* de estos aminoácidos, después de la administración de un inhibidor de la captura de glutamato, no causa daño en condiciones normales<sup>15</sup>, pero sí cuando el metabolismo energético está inhibido<sup>17</sup>. Estos trabajos apuntan a que el estado energético celular es fundamental en el desarrollo de la lesión excitotóxica por lo que más adelante se discutirá su papel en el daño hipoglucémico.

Otra evidencia que apoya a la excitotoxicidad como el mecanismo de daño subsecuente a la hipoglucemia, es la observación de que la muerte neuronal en el estriado inducida en condiciones de hipoglucemia, se previene cuando se eliminan las vías glutamatérgicas cortico-estriatales<sup>18</sup>. Esto sugiere que la liberación de glutamato por las terminales glutamatérgicas es necesaria para que se produzca la lesión hipoglucémica. Por otra parte, la administración de antagonistas de los receptores NMDA previene la muerte neuronal<sup>19</sup> aún cuando éstos se administren después del período isoelectrico<sup>20</sup>. Este efecto no está relacionado con la inducción de hipotermia descrita para algunos antagonistas de estos receptores<sup>21</sup>. Estos resultados también han sido obtenidos en experimentos *in vitro*, donde se ha demostrado que diversos antagonistas glutamatérgicos previenen el daño de manera dosis dependiente en condiciones de privación de glucosa<sup>22</sup>. Los receptores no-NMDA posiblemente también intervienen en el desarrollo del daño pues el tratamiento con sus antagonistas reduce el área lesionada<sup>23</sup>, aunque en menor proporción. Su participación quizás está relacionada con la despolarización necesaria para activar los receptores NMDA. Estas evidencias sin duda son contundentes para sugerir que el glutamato y la activación de sus receptores juega un papel importante y temprano en el desarrollo del daño hipoglucémico.

### El estado energético celular en la hipoglucemia

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de aminoácidos excitadores en el espacio extracelular después de inhibir sus transportadores, no causa muerte neuronal en la rata o en neuronas cultivadas energéticamente competentes, pero cuando el metabolismo energético es deficiente se induce muerte

excitotóxica. El cerebro tiene la capacidad de adaptarse a la disminución del suministro de glucosa; sin embargo, ésta es limitada. La adaptación del cerebro ocurre básicamente por dos eventos: el aumento en el flujo sanguíneo cerebral y el uso de reservorios de sustratos alternativos a la glucosa.

Un aumento del flujo sanguíneo durante la hipoglucemia ha sido demostrado por varios grupos<sup>24,25</sup>, pero aún se encuentra en discusión el mecanismo por el cual que éste ocurre. Existen estudios que apoyan la participación del óxido nítrico como factor relajante de las células endoteliales en condiciones de hipoglucemia<sup>26</sup>, pero esto ha sido puesto en duda por otros autores<sup>27</sup>.

Al parecer el metabolismo energético en la hipoglucemia sólo se altera en condiciones muy severas o muy prolongadas, pues el consumo de  $\text{O}_2$  se mantiene durante la hipoglucemia lo que sugiere que otros sustratos están siendo utilizados para obtener energía<sup>28,29</sup>. La cantidad de glucógeno en las neuronas es limitada y clásicamente se piensa que éste se agota en los primeros 5 minutos del período isoelectrico<sup>30</sup>. Estudios recientes sugieren que el glucógeno puede ser utilizado como sustrato metabólico por períodos de tiempo más extensos cuando el aporte de glucosa cerebral es inadecuado<sup>31</sup>, o cuando se presentan episodios repetidos de hipoglucemia. Los aminoácidos constituyen también un sustrato endógeno que se agota rápidamente<sup>32</sup> ya que se pueden incorporar al ciclo de Krebs alterando su concentración tisular durante la hipoglucemia tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>33,34</sup>. Otros sustratos que se utilizan son los fosfolípidos, lo que conduce a un aumento en la concentración de ácidos grasos libres, entre ellos el ácido araquidónico cuyo metabolismo genera radicales libres, los cuales son tóxicos para la célula<sup>35</sup>. La lipólisis es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y el aumento de este ión promueve el metabolismo de los fosfolípidos lo que puede alterar las propiedades de la membrana plasmática, y por lo tanto las de las proteínas que están embebidas en ella.

La concentración de ATP se mantiene constante incluso durante la hipoglucemia moderada, y no es sino hasta que se presenta el estado de coma acompañado de los primeros cambios en las concentraciones iónicas (entrada de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), que los niveles de ATP disminuyen en un 40%<sup>36,37</sup>. Éstos disminuyen progresivamente conforme avanza el estado de coma, sugiriendo que éste se acompaña de una deficiencia de sustratos metabólicos tal que ocasiona un déficit energético severo en el tejido cerebral<sup>38</sup>. La concentración de ATP ha sido medida



también en estudios *in vitro* durante la privación de glucosa, y se ha observado una disminución importante no sólo de ATP sino de fosfocreatina<sup>25</sup>. La disminución de los niveles energéticos compromete el funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , impidiendo que la célula se repolarice y que los mecanismos de amortiguamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  funcionen adecuadamente. Así, se genera una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, la cual pierde su polaridad y su capacidad de producir ATP. Se ha observado que los niveles de ATP se mantienen disminuidos en el cerebro incluso 3 h después del restablecimiento de glucosa, subsecuente al coma hipoglucémico<sup>26</sup>.

### $\text{Ca}^{2+}$ y el daño hipoglucémico

Dado que entre los receptores a glutamato los del tipo NMDA son los mayormente permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , éstos son los que juegan un papel más importante en la muerte neuronal excitotóxica. En condiciones normales, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  está finamente regulada; es decir, existen incrementos transitorios de su concentración pero rápidamente ésta regresa a su nivel basal. Los mecanismos responsables de esta regulación incluyen proteínas citoplasmáticas con varios sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (ej. calsequestrina), bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  situadas en la membrana plasmática que lo destruyen de manera dependiente de ATP, así como la captura o secuestro de este ión en algunos organelos intracelulares (retículo endoplásmico y mitocondria). Cuando se pierde la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular debido a la falla en sus sistemas de extrusión o almacenamiento ocurre muerte neuronal. La activación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de proteasas, endonucleasas, fosfolipasas y de la óxido nítrico sintasa contribuirá al daño neuronal<sup>24</sup> (figura 2). La importancia del óxido nítrico será discutida más adelante.

Se conoce que la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  disminuye desde el inicio del periodo isopléctrico<sup>27</sup>, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular continúa aumentando durante el coma, para después regresar a su nivel basal tras la inyección de glucosa<sup>28</sup>. Por otro lado, trabajos *in vitro* de privación de glucosa han demostrado que en neuronas cultivadas ocurre un gran aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que está relacionado directamente con el daño neuronal<sup>29</sup>. El aumento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  y su escaso amortiguamiento provocan la entrada masiva de este ión a la mitocondria y esto desencadena la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, una interrupción de la síntesis de ATP y la apertura del

poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). El MPT es un poro situado en la membrana interna de la mitocondria que permite la salida de moléculas de un tamaño menor a 1500 KDa y que se ha involucrado en el daño asociado a eventos isquémicos e hipoglucémicos<sup>30</sup>. La composición del MPT aún no es muy clara aunque se acepta que el translocador de nucleótidos de adenina y el canal de aniones dependiente de voltaje forman parte de su estructura.

### Papel de la mitocondria

La mitocondria es un organelo intracelular donde se llevan a cabo importantes procesos metabólicos como el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, que tienen como fin último la síntesis de ATP. Esta síntesis está íntimamente ligada al potencial de membrana mitocondrial, y cuando éste se disipa la ATP sintetasa puede actuar en forma inversa y degradar ATP. Por su parte, la fosforilación oxidativa es una fuente constante de especies reactivas de oxígeno (ROS); que en condiciones normales son controladas por las defensas antioxidantes celulares. Cuando su generación aumenta éstas pueden contribuir de manera importante a la muerte neuronal hipoglucémica, como se discutirá más adelante. Como se mencionó anteriormente la entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , por el uniportador de este ión, despolariza a la mitocondria e induce la apertura del MPT. Se ha observado que el tratamiento con un inhibidor específico de este poro reduce el daño asociado a la hipoglucemia<sup>31</sup> sugiriendo la participación de la disfunción mitocondrial en el daño neuronal. Por otro lado, se sabe que la mitocondria libera factores proapoptóticos cuando se abre el MPT como son el citocromo C y el factor inductor de la apoptosis (AIF)<sup>32,33</sup>. Se ha reportado liberación de citocromo C y de AIF, así como activación de caspasa 3 asociadas a la hipoglucemia *in vivo*<sup>34</sup> (figura 2). Además, la despolarización mitocondrial induce el desacople de la cadena transportadora de electrones y con ello la generación de radicales libres, cuyo exceso llevará a la célula a un estado de estrés oxidativo. Por otro lado, se ha observado una disminución de la actividad de los complejos I y IV de dicha cadena, en todas las regiones cerebrales asociada a la hipoglucemia inducida en un modelo *in vivo*<sup>35</sup>. La disfunción mitocondrial puede deberse a la presencia de radicales libres, ya que éstos pueden dañar a los diferentes componentes de la cadena respiratoria<sup>36</sup>. La despolarización mitocondrial ha sido observada también *in*



in vitro en condiciones de privación de glucosa<sup>41</sup>.

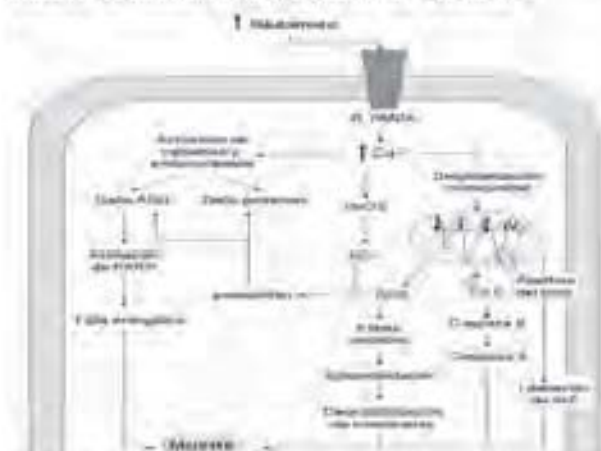


Figura 1 El aumento de la concentración extracelular de glutamato, así como la sobre-activación de sus receptores, principalmente los de tipo NMDA, induce muerte neuronal de tipo excitotóxica después de un periodo de hipoglucemia severa. La unión del glutamato a los receptores tipo NMDA (a) hace permeable a Ca<sup>2+</sup> y el aumento intracelular de este ión activa diversas enzimas. Por su acción activan endonucleasas y proteasas, como las calpainas. Las primeras provocan daño al ADN y las segundas se han asociado a la activación de algunas vías de muerte. Se activa a su vez la acción de las caspasas (b) que producen ácido nítrico (NO), el aumento de Ca<sup>2+</sup> es amortiguado por la mitocondria, pero al ésta se sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>, interviene la síntesis de ATP y se induce la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). A través del MPT pueden salir moléculas involucradas en algunas vías de muerte, como son el factor inductor de la apoptosis y el citocromo C. El citocromo C, forma parte de un complejo junto con la caspasa 9, que al ensamblarse se activa y es capaz de activar a la caspasa 3, que es ejecutora de la muerte apoptótica. La actividad de la familia transportadora de citocromos, en especial la de los complejos I y IV disminuye, además de que aumenta la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS reaccionan en el citosol con el NO produciendo peróxido nítrico, el cual es capaz de causar daño al ADN. El daño al ADN activa a la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa, la cual al sobre-activarse con NAD<sup>+</sup> y ATP (consumiendo sus altas energías) las ROS generan un estado de estrés oxidativo que favorece la lipoperoxidación que contribuye al daño hipoglucémico.

### La apoptosis: activación de caspasas y calpainas en la hipoglucemia

La apoptosis es un tipo de muerte ordenado dependiente de energía, en el cual la integridad de la membrana plasmática se conserva evitando una respuesta inflamatoria. Hay activación de proteasas específicas ya sea de caspasas o de calpainas que hidrolizan distintos sustratos<sup>42</sup>. Además, existen otras proteínas involucradas en las cascadas de muerte apoptótica, así como en su regulación; la familia de Bcl-2, la familia de los AIF y la de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), entre otras<sup>43</sup>. Las caspasas se clasifican en iniciadoras y ejecutoras, las más estudiadas son la caspasa 9 que es iniciadora y

la caspasa 3 que es ejecutora. La caspasa 9 que forma parte de un complejo protéico constituido por la asociación del citocromo C, dATP, el AIF-1 y la procaspasa 9, que al unirse se auto-activa y así puede activar a la procaspasa 3. Durante el coma hipoglucémico no hay ATP para formar dicho complejo, pero después, es decir, después de la administración de glucosa los niveles de ATP se recuperan y se activa la caspasa 9. La actividad de la caspasa 3 ocurre hasta 3 h después de iniciado el periodo de recuperación. En cambio la liberación del citocromo C ocurre a los 30 min de iniciado el periodo isoelectrico, y la translocación al núcleo del AIF ocurre 30 min después de iniciada la recuperación. En este modelo *in vivo* también se ha observado la activación de la calpaina, la cual es miembro de una familia de proteasas que se cree están involucradas en la activación de algunas caspasas y por tanto en la muerte apoptótica<sup>44</sup>.

### Oxido nítrico, radicales libres y estrés oxidativo en la hipoglucemia

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en el último orbital, lo que los hace altamente reactivos pues tienden ya sea a donar ese electrón a alguna molécula vecina o bien a remover un electrón de otra para que su último orbital quede completo. Si las defensas antioxidantes celulares se ven sobrepasadas por la generación de radicales libres, ya sea por la producción excesiva de éstos, por la pérdida de los mecanismos antioxidantes o por ambas, se crea una situación conocida como estrés oxidativo. Una de las principales consecuencias del estrés oxidativo es que daña a algunas macromoléculas indispensables para la viabilidad celular como son: los lípidos de membrana, el ADN, y las proteínas. *In vivo* se ha observado que la hipoglucemia induce lipoperoxidación de la membrana plasmática aún antes del periodo isoelectrico<sup>45</sup>, lo que sugiere que es un evento temprano en la lesión hipoglucémica y que puede ocurrir aún en presencia de niveles bajos de glucosa. También se ha observado lipoperoxidación de las membranas mitocondriales y daño al ADN de este organelo en condiciones de glucosa baja<sup>46</sup>, lo que sugiere que los radicales dañan directamente a la mitocondria. *In vitro* se ha observado que la privación de glucosa aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>47</sup> y que el daño en estas condiciones es prevenido con antioxidantes como la vitamina E<sup>48</sup>. La actividad de algunas enzimas encargadas de amortiguar a ciertas ROS, como son la superóxido dismutasa y la catalasa se



encuentra aumentada en condiciones de hipoglucemia<sup>5</sup>, lo que indica de manera indirecta la presencia de superóxido y de peróxido. El mecanismo de daño oxidativo en la hipoglucemia ha sido poco explorado, ya que no se sabe cuales son las principales fuentes de radicales libres.

Una de las principales defensas antioxidantes celulares es el glutatión, el cual es un tripéptido compuesto por glicina, glutamato y cisteína, que funciona como un amortiguador del estado redox de la célula. En condiciones normales, el glutatión se encuentra en su estado reducido, pero en presencia de ROS pasa a su estado oxidado que consiste en dos moléculas de glutatión unidas por un enlace disulfuro. Se ha observado que en el modelo de hipoglucemia inducida por insulina los niveles de glutatión reducido no se encuentran disminuidos, pero la actividad de las enzimas encargadas tanto de su síntesis como de su reciclaje se encuentran aumentadas. Esto sugiere que hay producción de radicales que consumen el glutatión reducido, y que la actividad aumentada de estas enzimas hace que los niveles del glutatión reducido se mantengan constantes, pudiendo ser éste un mecanismo adaptativo ante la lesión hipoglucémica<sup>6</sup>.

El óxido nítrico es un mensajero celular de vida media corta que está involucrado en diversos procesos celulares, tiene poca reactividad como radical pero cuando se combina con el superóxido se genera peroxinitrito y éste es un radical altamente reactivo con una vida media muy corta que oxida moléculas cercanas. *In vitro*, se ha observado que un inhibidor de la óxido nítrico sintasa previene el daño en condiciones de privación de glucosa<sup>6</sup>. Por otro lado *in vivo*, se ha observado que en condiciones de hipoglucemia aumenta la inmunoreactividad a la nitrotirosina en algunas zonas cerebrales<sup>6</sup>. La nitrotirosina se genera a partir de la reacción del peroxinitrito con los residuos de tirosina y por lo tanto es un buen marcador de la presencia de ese radical libre, lo que indica su producción en estas condiciones. En ese mismo trabajo se demuestra que la administración de un inhibidor de la sintasa neuronal del óxido nítrico (nNOS) durante el periodo isoelectrico, disminuye la presencia de nitrotirosina y reduce el daño hipoglucémico.

El daño al ADN causado por radicales libres, activa a la polimerasa de poli-ADPribosa (PARP). Esta enzima normalmente repara el ADN pero su sobreactivación conduce a la muerte por un proceso que involucra el consumo de ATP y la liberación de factores pro-apoptóticos. Experimentos tanto *in vivo*

como *in vitro* han demostrado que un inhibidor específico de la PARP protege a las células del daño hipoglucémico, incluso cuando éste es administrado dos horas después de la recuperación de los niveles de glucosa sanguínea<sup>6</sup>. Estos resultados sugieren que la activación de la PARP, posiblemente mediada por el peroxinitrito, es fundamental en la muerte neuronal observada en condiciones de hipoglucemia, y que posiblemente su activación sea un evento tardío y determinante para la generación de la muerte. Evidencias recientes, sugieren que el zinc es otro factor importante en la activación de la PARP, y que éste es liberado de las fibras musculosas en condiciones de hipoglucemia, y acumulado en las neuronas de la región CA1 del hipocampo. El mecanismo de entrada del zinc a la célula aún se desconoce, pero el tratamiento con un quelante de zinc reduce no sólo la activación de la PARP sino el daño neuronal subsecuente a la hipoglucemia<sup>6</sup>.

El cerebro tiene un alto contenido de lípidos poli-insaturados, entre ellos el ácido araquidónico, el cual al metabolizarse a eicosanoides produce radicales libres, los cuales como ya se mencionó pueden participar en el daño a los componentes celulares. En condiciones de hipoglucemia se ha demostrado un aumento en la concentración de ácidos grasos libres, siendo el ácido araquidónico el que más aumenta<sup>11</sup>.

Aunque a la fecha se conocen algunos de los eventos involucrados en la muerte neuronal hipoglucémica, su temporalidad y secuencia aún no es muy clara. Asimismo se desconoce si estos eventos son parte de una sola cascada de muerte, o si son mecanismos paralelos que conforman señales redundantes de muerte. Se sabe que muchos de estos mecanismos de muerte se presentan en otras patologías como la isquemia, por lo que es importante un conocimiento más profundo de estos procesos con el fin de encontrar alternativas terapéuticas para disminuir la lesión cerebral y contribuir a la recuperación de los pacientes. En conclusión, el aumento en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores, la pérdida de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>, la deficiencia energética, la disfunción mitocondria y el estrés oxidativo son todos componentes importantes de la muerte que se presenta en condiciones de hipoglucemia. En la figura 2, se resumen los diversos componentes que participan en el desarrollo del daño neuronal asociado a la hipoglucemia.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo PAPIIT (IN222803), a Lourdes Mastren y una beca CONACYT No181312 y DGEP-UNAM a Ma. Luisa Haces. Los autores agradecen a el Dr. J. Morán y al Dr. C. Sánchez por sus comentarios a este trabajo.



REFERENCIAS

1. Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 1984; 64:177-81.
2. Sommerfeld AJ, Dewey LJ, Mcnulty V, Frier BM. Moderate hypoglycemia impairs multiple memory functions in healthy adults. *Neurophysiol* 2003; 17:125-32.
3. Akyal A, Kuyucu N, Bolukbaşı D, Güreş E, Yurekli Y. Repeated hypoglycemia and cognitive decline. A case report. *Neuroendocrinol Lett* 2003; 24:54-6.
4. Camol MF, Surge MR, Schade DS. Severe hypoglycemia in adults. *Rev End Metab Dis* 2003; 4:149-57.
5. Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK. Hypoglycemic brain injury in the rat: Correlation of density of brain damage with EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 1984; 33:1090-3.
6. Lucce D, Newhouse J. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957; 55:193-201.
7. Drury J. Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 1994; 15:256-63.
8. Choi D. Excitotoxic cell death. *J Neurosci* 1992; 23:1261-76.
9. Gegelashvili G, Schousboe A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* 1998; 45:233-8.
10. Sandberg M, Nystrom B, Hamberger A. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 1986; 47:179-84.
11. Engelsen B, Westerberg E, Fornum F, Wieloch T. Effect of insulin-induced hypoglycemia on the concentrations of glutamate and related amino acids and energy metabolites in the intact and decorticated rat neocortex. *J Neurochem* 1986; 47:1634-41.
12. Gundeman V, Fornum F, Olsen OP, Storm-Mathisen J. Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunogold study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:41-51.
13. Honnegger P, Brusaferri O, Herry H, Boullet O, Bachmann C, Zurich MG, et al. Alteration of amino acid metabolism in neuronal aggregate cultures exposed to hypoglycemic conditions. *J Neurochem* 2002; 51:1141-51.
14. Takata T, Hirai H, Shigemoto T, Okada Y. The release of glutamate and accumulation of intracellular calcium in the guinea pig hippocampal slices during glucose deprivation. *Neurosci Lett* 1995; 189:21-4.
15. Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *J Neurochem* 1998; 54:2262-72.
16. Sánchez-Carbente M, Massieu L. Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem* 1999; 27:129-38.
17. Massieu L, Gómez-Rodríguez N, Moratín T. *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 2000; 165:257-67.
18. Wieloch T, Engelsen B, Westerberg E, Auer R. Lesions of the glutamatergic cortico-striatal projections in the rat ameliorate hypoglycemic brain damage in the striatum. *Neurosci Lett* 1995; 58:25-30.
19. Wieloch T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 1985; 230:681-3.
20. Nelligard B, Wieloch T. Cerebral protection by AMPA- and NMDA-receptor antagonists administered after severe insulin-induced hypoglycemia. *Exp Brain Res* 1992; 92:259-88.
21. Papagapiov MP, Auer RN. Regional neuroprotective effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in hypoglycemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10:270-8.
22. Morner H, Goldberg MP, Choi DW. Glucose deprivation neuronal injury in cortical culture. *Brain Res* 1989; 483:347-54.
23. Norberg K, Siesjö BK. Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia. *J Neurochem* 1976; 26:345-52.
24. Höllinger BR, Bryan RM. b-receptor-mediated increase in cerebral blood flow during hypoglycemia. *Am J Physiol* 1987; 253:940-55.
25. Dieguéz G, Fernández N, García JL, García-Vitellón AI, Monge L, Gómez B. Role of nitric oxide in the effects of hypoglycemia on the cerebral circulation in awake goats. *Eur J Pharmacol* 1997; 330:185-93.
26. Honnaka N, Artz N, Jähle J, Takahashi S, Kennedy C, Sokoloff L. Examination of potential mechanisms in the enhancement of cerebral blood flow by hypoglycemia and pharmacological doses of dextroglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17:54-63.
27. Krolnick L, Leniger-Follat E. Oxygen supply of the brain cortex (rat) during severe hypoglycemia. *Pflügers Arch* 1980; 397:121-216.
28. Agardh CD, Chapman AG, Nilsson B, Siesjö BK. Endogenous substrates utilized by rat brain in severe insulin-induced hypoglycemia. *J Neurochem* 1981; 36:490-500.
29. Choi Y, Seoquist ER, Gruetter R. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism *in vivo*. *J Neurosci Res* 2003; 72:25-32.
30. Agardh CD, Folbergrová J, Siesjö BK. Cerebral metabolic changes in profound insulin-induced hypoglycemia, and in the recovery period following glucose administration. *J Neurochem* 1978; 31:1135-42.
31. Wieloch T, Harris RJ, Symon L, Siesjö BK. Influence of severe hypoglycemia on brain extracellular calcium and potassium activities, energy and phospholipid metabolism. *J Neurochem* 1984; 49:160-8.
32. Lewis LD, Ljunggren B, Ratcherson RA, Siesjö BK. Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia related to blood glucose and to EEG. *J Neurochem* 1974; 21:673-9.
33. Brookes KJ, Porteous R, Bachelard HS. Effects of hypoglycemia and hypoxia on the intracellular pH of cerebral tissue as measured by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *J Neurochem* 1989; 52:604-10.
34. Reynolds I. Intracellular calcium and magnesium: critical determinants of excitotoxicity? En. Olsen O, Langmoen L, Gjerstad I, editors. *Progress in brain research*. Elsevier Science; 1998. 116:225-45.
35. Uematsu D, Greenberg JH, Ravich M, Karp A. Cytosolic free calcium, NAD/NADH redox state and hemodynamic changes in the cat cortex during severe hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:149-55.
36. Cheng B, McMahon DG, Mittson MP. Modulation of calcium current, intracellular calcium levels and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. *Brain Res* 1993; 607:275-85.
37. Friberg H, Wieloch T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochemie* 2002; 84:241-50.
38. Friberg H, Farnard-Drake M, Bengtsson F, Halasz AP, Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 1998; 18:5151-9.
39. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 1998; 89:147-57.
40. Susan SA, Zamzani N, Casteda M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic

- protease. *J Exp Med* 1998; 184:331-3141.
41. Ferand-Drake M, Changlin Z, Gunilla G, Hansen AJ, Karlsson J-O, Bahr BA, et al. Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem* 2003; 85:31-42.
42. Bhardwaj SK, Sharma ML, Gulati G, Chhabra A, Kaushik R, Sharma P, et al. Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver and kidney. *Mol Cell Chem Neuropathol* 1998; 34:157-62.
43. Ballesteros JR, Mahra OP, McGowan JE. Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol Neonate* 2003; 84:159-63.
44. Lu Y, Xiao-Dong S, Liu W, Zhang T-Y, Zuo J. Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* 2003; 7:49-55.
45. McConkey D. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998; 99:442-9.
46. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-5.
47. Palockova J, Mahol P, Turnova E, Krsiak M, Folyta R, Stipek S, et al. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res* 2003; 52:131-5.
48. Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia or oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1405-7.
49. Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Mitsuemon Y, Gum E, et al. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 2003; 23:10381-90.
50. Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y, Swanson RA. Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 2004; 16:638-45.

## **Artículo 2**

“Changes in the antioxidant defense machinery associated with ischemia and hypoglycemia. In vivo studies in the central nervous system.”

María L. Haces and Lourdes Massieu

En: “Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications”

2009: ISBN: 978-81-308-0308-1

Editores: Mauricio Díaz–Muñoz y Abel Santamaría del Angel.

Editorial: Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023,  
Kerala, India





Research Signpost  
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Pro-Oxidant Reactions: Physiological and Pathological Implications, 2009:  
ISBN: 978-81-308-0308-1 Editors: Mauricio Díaz – Muñoz and Abel Santamaría del Angel

3

## **Changes in the antioxidant defense machinery associated with ischemia and hypoglycemia. In vivo studies in the central nervous system**

**María L. Haces and Lourdes Massieu**

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 04510, AP 70-253, México D.F. México

### **Abstract**

*Substantial evidence supports the presence of oxidative stress during ischemia, particularly during the reperfusion period, and its role in the development of ischemic brain damage has been suggested. Recently, oxidative stress has also been suggested to occur during hypoglycemia. An enhanced production*

Correspondence/Reprint request: Dr. María Luna Haces del Blanco, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, CP 04510 México D.F., México. E-mail: lhaces@ifc.unam.mx

*of reactive oxygen species (ROS), a diminished antioxidant defense, or a combination of both, may participate in the induction of oxidative stress during these pathological conditions. The antioxidant brain defense comprises soluble antioxidants, enzymatic systems, and iron-related molecules. Low molecular weight antioxidants are molecules such as glutathione (GSH), ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol, that are capable of reacting directly with reactive species, acting as scavengers. Enzymatic defenses include superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx) and catalase, which detoxify superoxide or hydrogen peroxide. On the other hand, iron-related molecules control the availability of free iron. These constitute an important antioxidant mechanism since iron ions can catalyze the production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide or superoxide. Hydroxyl radical is one of the most reactive species, which initiate damaging processes such as lipoperoxidation. The manipulation of the antioxidant machinery represents a widespread experimental approach used to prevent oxidative neuronal damage associated with diverse pathological conditions. Throughout this review we will discuss relevant studies concerning changes in the antioxidant defenses during ischemia/ reperfusion and hypoglycemia in animal models, as well as different experimental procedures aimed to confer neuroprotection through the modulation of the antioxidant systems.*

## **Introduction**

Brain functioning is highly dependent on an adequate blood supply of nutrients, mainly glucose, since its energetic reserves are scarce. The interruption of blood flow during ischemia, or a marked decrease in blood glucose concentration throughout hypoglycemia can lead to neuronal damage. Cerebral ischemia in humans might be the consequence of head trauma, subarachnoid hemorrhage, stroke or cardiac arrest, and it constitutes the second most common cause of death in the industrial countries and one of the major causes of disability. Hypoglycemia is normally a transitory state due to the extensive regulatory mechanisms controlling blood glucose concentration but can be a chronic problem in patients with hormonal alterations [1], insulinomas or type 1 diabetics exceeding the correct insulin dose [2].

Ischemia can be classified in global or focal. In the former condition there is a complete loss of blood flow such as in cardiac arrest, while the second is related to the local obstruction of blood supply to the brain due to blockage of an artery, while collateral vessels remain intact. This leads to the formation of an ischemic core, where cells are committed to die, and is surrounded by a "penumbra" region, which might be rescued by opportune intervention, and which is the target of therapeutic treatments. Animal models have been developed to mimic ischemia and hypoglycemia, in order

to study the mechanisms of neuronal death associated with these conditions. The most common models of global ischemia consist in the occlusion of both the bilateral common carotid arteries and the vertebral arteries (four-vessel occlusion model), or the induction of cardiac arrest, while focal ischemia is generally induced by either the transient or permanent occlusion of the middle cerebral artery (MCAO). Hypoglycemia is generally induced by the administration of insulin, which leads to the reduction of blood glucose. When glucose concentration falls below 20 mg/dl, cessation of brain electric activity takes place, a condition known as the isoelectric period. Brain activity is restored by the intravenous administration of glucose. Hypoglycemia-induced brain damage occurs when this period is prolonged for at least 10 min [3].

Brain is particularly vulnerable to oxidative stress, due to its high rate of oxygen consumption, its elevated content of polyunsaturated fatty acids, the presence of an elevated concentration of iron, and its limited antioxidant capacity [4].

Oxidative stress develops when there is an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant cell defenses. ROS include hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ), and peroxynitrite (ONOO $\cdot$ ). Some ROS are free radicals containing an unpaired electron in their last orbital conferring these molecules a high reactivity. These radicals tend to stabilize thermodynamically abstracting electrons or hydrogen atoms from adjacent molecules.

Physiologically some ROS, such as  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$ , are produced during mitochondrial metabolism and are scavenged by superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx) and catalase, which constitute the enzymatic antioxidant cell defense [5]. When these molecules are not adequately scavenged, other reactive species are produced such as ONOO $\cdot$  and  $\bullet OH$ . Unlike  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$ , these compounds are capable of reacting directly with lipids, proteins and DNA, damaging these macromolecules. ONOO $\cdot$  results from the reaction of  $O_2^{\bullet-}$  with nitric oxide while  $\bullet OH$  is produced from  $H_2O_2$  and  $O_2^{\bullet-}$  in the presence of transition metals, mainly  $Fe^{2+}$  (Figure 1). The systems involved in the proper handling of this metal are essential for the prevention of hydroxyl radical production, and the development of oxidative damage. Thus, they are considered as part of the cell antioxidant machinery.

Other pathways for ROS production in the CNS, which might contribute to oxidative stress during ischemia and hypoglycemia include:

- Arachidonic acid metabolism: Phospholipase  $A_2$  activation by intracellular calcium releases the unsaturated fatty acid, arachidonic acid, which is then

metabolized by cyclooxygenase and lipoxygenase leading to the formation of  $O_2^{\bullet-}$  [6].

- Purine metabolism: excessive ATP degradation leads to the accumulation of purine metabolites such as xanthine and hypoxanthine. During ischemic conditions, xanthine dehydrogenase is converted by a  $Ca^{2+}$ -dependent process to xanthine oxidase [7]. During reperfusion, xanthine oxidase catalyses  $O_2^{\bullet-}$ -formation by its reaction with the purine substrates, xanthine and hypoxanthine [8].

- NADPH oxidase: is a  $O_2^{\bullet-}$ -generating enzyme that has long been recognized as crucial for the bactericidal function of neutrophils [9]. Recently, it has been described in brain [10; 11; 12], where it may participate in physiological redox signaling [13]. Under ischemic conditions  $O_2^{\bullet-}$  formed through the pathways described above, can increase intravascular permeability leading to an inflammatory response. NADPH oxidase in neutrophils or neurons can kill neighboring cells, leading to exacerbated ischemic damage [14; 15; 16]. A crucial role of this enzyme in the development of hypoglycemic damage has recently been described [17].

In addition to enzymatic defenses there are low molecular weight defense systems against ROS, known as antioxidants. These are present within the cell, and on entering into redox reactions they provide an electron to neutralize free radicals converting them in non-reactive species (Figure 1). Many chemicals could serve this purpose because the high reactivity of free radicals results in extracting an electron from almost any available molecule. However, an efficient biological antioxidant is supposed to do more than simply react with free radicals: (a) it must be present in an adequate amount in the cell, (b) it must react with a variety of free radicals, and (c) it must be suitable for regeneration [18]. Some molecules that fulfill these criteria include the dietary free-radical scavengers, such as ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol, and the endogenous tripeptide glutathione (GSH).

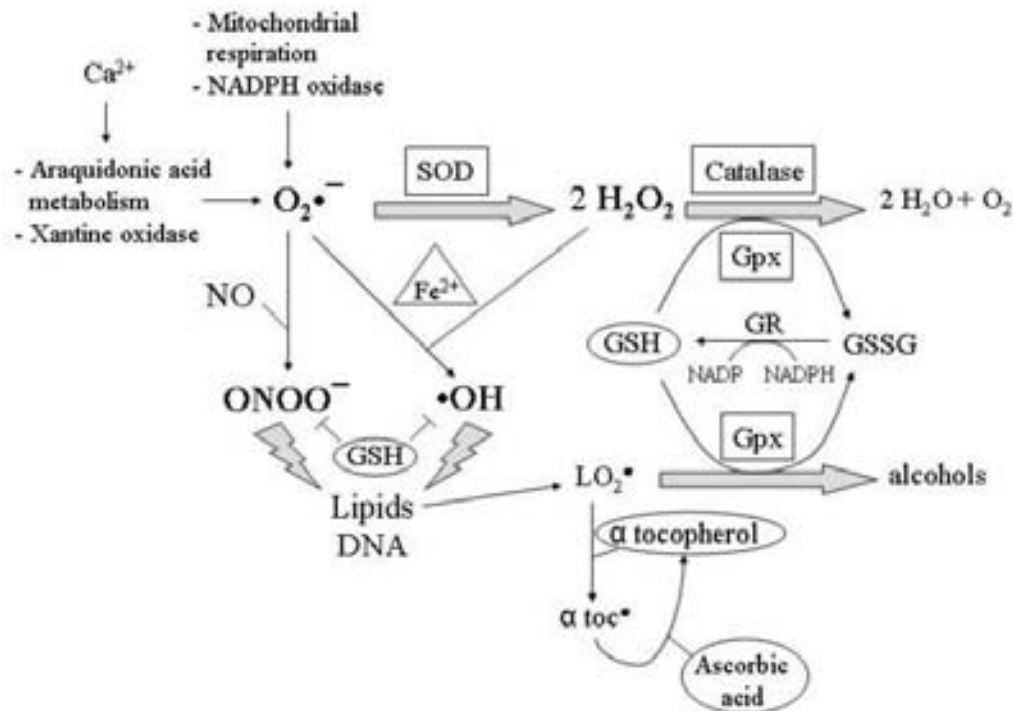
Here, we will describe the state of knowledge concerning the changes in the antioxidant cell defense associated with ischemia and hypoglycemia, focusing in *in vivo* models. Different strategies aimed to prevent oxidative damage through the modulation of the antioxidant machinery, will also be revised.

## **Non-enzymatic antioxidant defenses**

### **Glutathione (GSH)**

GSH functions as an antioxidant by directly scavenging ROS or by removing toxic peroxides via reactions catalysed by Gpx. It also provides the reducing power for the maintenance of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol levels





**Figure 1.** Interrelation between ROS production and the antioxidant defense systems within the cell. Whenever ROS production exceeds the antioxidant machinery, a state known as oxidative stress develops. It is suggested that during ischemia and hypoglycemia a pro-oxidant state prevails and that some of the cellular defense systems are deeply affected. Three types of antioxidant defenses are shown: enzymes with an antioxidant activity (shown in squares), low molecular weight antioxidants (indicated in circles) and systems regulating  $\text{Fe}^{2+}$  concentration.  $\text{Fe}^{2+}$  (triangles) catalyzes the generation of  $\bullet\text{OH}$  and  $\text{ONOO}^-$ , which directly attack cellular components leading to oxidative damage.

[19]. The synthesis of GSH consists of two consecutive steps catalysed by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) and GSH synthetase (GS). Initially,  $\gamma$ -GCS forms a peptide bond between cysteine and the  $\gamma$ -carboxyl group of glutamate, instead of the  $\alpha$ -carboxyl group usually involved in peptide bonds. This unusual peptide bond protects the dipeptide from hydrolysis by peptidases. In the next step, GS adds glycine to form the tripeptide GSH [20]. The first step in the synthesis is non-allosterically inhibited by GSH. At least two additional factors regulate the *de novo* synthesis of GSH: the intracellular level of  $\gamma$ -GCS and the availability of its substrates.

Under oxidative stress, GSH is oxidized to its disulfide GSSG. GSSG is reduced back to GSH by glutathione reductase (GR), which utilizes reducing equivalents of NADPH (Figure 1). The recycling of GSH is linked to the glucose pentose pathway as the source of NADPH. Normally, the brain

maintains a high ratio of GSH/GSSG as antioxidant defense. This is achieved by both the recycling of GSSG and *de novo* synthesis of GSH.

Because of its crucial role as a free radical scavenger and a substrate for Gpx, an increasing number of studies have focused on the changes in the GSH/GSSG ratio during ischemic conditions. In this regard, it has been shown that GSH levels are significantly reduced soon after the end of the ischemic period and the onset of reperfusion in focal ischemia models [21; 22; 23; 24], and that they remain low for the following 21 days [22]. Shivakumar et al. [25] observed that GSH is present associated with proteins rather than soluble, leading to the loss of protein thiols. This change is accompanied with a reduction in the activity of some enzymes in brain like GR, which decreases significantly after 1 h of reperfusion [25]. In global cerebral ischemia, either with or without reperfusion, it has been also found that GSH levels are significantly decreased [26; 27; 28; 29; 30]. It is known that GSH synthesis is dependent on ATP levels, which is in short supply during ischemia. It has therefore been suggested that the decrease in GSH observed after ischemia is due to an imbalance between its synthesis and its degradation.

Other approaches have been conducted to further study the role of GSH during ischemia. Unexpectedly, GSH depletion during ischemia increased survival rates and reduced tissue damage [31; 32], while administration of GSH analogues prevented neuronal damage in both, global and focal cerebral ischemia models [33; 34]. This discrepancy might be explained because besides its well-known antioxidant effect, GSH might play a role in the glutamate cascade [31].

The study of the changes in GSH levels during hypoglycemia has received less attention. One study demonstrates that brain GSH levels are not changed in insulin-treated rats before the onset of the isoelectric period, but increased activities of the enzymes involved in the synthesis ( $\gamma$ -GCS) and recycling of GSH (GR) was observed [35]. These observations suggest that GSH is consumed but its levels are unaltered because of an increased turnover. Studies concerning the changes in GSH and its related enzymes during and after the hypoglycemic coma are still missing.

### **Ascorbic acid**

Plants and most animals can synthesize ascorbate from glucose, but humans, other primates, guinea pigs and fruit-bats lack the enzyme required for the last step of the pathway. These species need to have an ascorbate-rich diet in order to be healthy. The deficiency of this vitamin causes scurvy, a well-known disease common long ago in sailors, characterized by bleeding

gums. Ascorbic acid is needed as a cofactor for at least eight enzymes, such as proline hydroxylase and lysine hydroxylase which are involved in collagen synthesis, and dopamine- $\beta$ -hydroxylase which converts dopamine into noradrenaline. Ascorbic acid is found in large amounts in the central nervous system. Neurons and glia have an active transport that concentrates ascorbic acid intracellularly. Ascorbic acid can be considered as an efficient antioxidant and consequently an efficient free radical scavenger, but in the presence of transition metals it can generate free radicals, having a pro-oxidant effect [19].

Several studies have revealed decreased levels of ascorbic acid in brain after transient focal ischemia followed by different periods of reperfusion (from 1-24 h) [21; 22; 36]. According to Lyrer et al. [21] not all cerebral regions showed the same degree of reduction. The decrease was more pronounced in cortex and striatum rather than the hippocampus and cerebellum. On the other hand, results obtained using a global ischemia model without reperfusion, showed gender differences in the reduction of ascorbate levels. In male brain, a moderate reduction was present only in the hippocampus and cerebellum, while no differences were observed in any cerebral region of female rats [27]. In addition, no significant reductions in ascorbate levels were found at any reperfusion time after global cerebral ischemia [26]. Ascorbate levels have not been evaluated during or after hypoglycemia.

Since ascorbic acid is not synthesized in the brain but is transported into the brain by an active energy-dependent mechanism, this process might be affected by ischemia. The contribution of this mechanism to decreased ascorbate levels associated with focal ischemia remains to be tested. Some groups have suggested a neuroprotective effect of ascorbate against ischemic/reperfusion damage [37; 38], however, its therapeutic use would be limited by its well-known pro-oxidant action.

### **$\alpha$ -tocopherol**

$\alpha$ -tocopherol is the most active form of vitamin E and the major inhibitor of the free-radical chain reaction of lipid peroxidation [39]. This relies in the rapid constant rate of its reaction with lipid peroxils; each molecule of  $\alpha$ -tocopherol is capable of terminating two peroxidation chains.  $\alpha$ -tocopheryl radicals are reduced back to  $\alpha$ -tocopherol mainly by ascorbate. It can also react directly with  $^1\text{O}_2$  and might protect membranes against this species. Short-term depletion of this vitamin does not cause any specific disease.

Studies on ischemic patients, reported that plasma levels of most antioxidants, including vitamin E, are reduced immediately after an acute



ischemic stroke [40; 41]. However, it is not clear whether  $\alpha$ -tocopherol levels are modified after ischemia/reperfusion. Using animal models, some authors observed a marked reduction in  $\alpha$ -tocopherol [7; 42; 43], while another group did not find any significant reduction either in focal or global ischemia models [44]. The role of the dietary consumption of vitamin E on the outcome after focal ischemia has been evaluated. Results indicate that rats subjected to regular vitamin E diet showed a reduced infarction size as compared to rats treated with a vitamin E deficient diet [45].

The protective effect of  $\alpha$ -tocopherol treatment before global or focal ischemia is well-documented [30; 46; 47], but the therapeutic window is very narrow. In order to improve it, one study used a vitamin E analogue observing that rats treated after focal cerebral ischemia still showed reduced neuronal damage [48]. The neuroprotective role of vitamin E might be associated with its capacity to prevent the reduction in GSH levels and lipoperoxidation induced by ischemia [30; 49]. Other groups have tested vitamin E neuroprotective effects in combination with other antioxidants, such as lipoic acid. Treatment with these two compounds resulted in improved neurological function, lower glial reactivity, reduced cerebral damage, and diminished levels of serum oxidative markers after ischemia [50; 51]. Besides its antioxidant effect, it has been recently suggested that  $\alpha$ -tocopherol-mediated neuroprotective effect in focal cerebral ischemia might be related to its capacity to induce target genes of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [52].

The role of vitamin E on *in vivo* hypoglycemic conditions has not been investigated; however, recent studies from our group have shown protection by vitamin E against neuronal death induced by hypoglycemic-mimicking conditions in cultured neurons [53; 54]. These results are in accordance with recent studies suggesting that oxidative stress takes place during hypoglycemia even before the isoelectric period [55].

## Enzymatic antioxidant defenses

### Superoxide dismutase (SOD)

SOD catalyzes the dismutation reaction of toxic  $O_2^{\cdot-}$  to molecular oxygen and  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  has the potential to generate  $\cdot OH$ , so the activity of SOD must be coordinated with either that of catalase or Gpx in order to completely detoxify  $O_2^{\cdot-}$  (Figure 1).

Three unique and highly compartmentalized mammalian SOD has been biochemically and molecularly characterized. SOD-1, or CuZn-SOD, was the first enzyme described, it is a homodimer that uses copper and zinc as cofactors, and is found almost exclusively in the cytoplasm. SOD-2 or Mn-

SOD contains a leader peptide, which targets this manganese-containing enzyme exclusively to the mitochondrial matrix where it is present as a tetramer. SOD-3 or EC-SOD, is the most recently characterized SOD occurring as a copper and zinc-containing tetramer, containing a signal peptide that directs this enzyme exclusively to the extracellular space [for review see 56].

Total SOD activity has been evaluated in both global and focal cerebral ischemia. SOD activity after global cerebral ischemia is not altered [57]. In agreement, studies on the focal cerebral ischemia model did not find any significant reduction [57; 58] before 24 h [57] but at 7 days postischemia significant decreases were observed [59]. A more detailed study, evaluated SOD activity in the ischemic core and the penumbral zone. Interestingly they found increased SOD activity from 6 to 24 h postischemia in the penumbra and no difference in the core, suggesting that antioxidant activity is differentially affected by the intensity of ischemic challenge [60]. By immunohistochemistry, Liu et al. [61] found an early loss of SOD-1 and SOD-2 immunoreactivity in the ischemic core after reperfusion, while in the penumbra, a decline in SOD-2 was observed after 24 h. In contrast, using the same methodology, Ohtsuki et al. found early increases in both enzymes, which remained elevated during the following 2 days in the hippocampus [62]. The discrepancy between the observations of these studies might be explained by differences in the animals used (rats vs guinea pigs) and in the duration of the ischemic insult.

The potential therapeutic use of SOD as an efficient antioxidant is limited by its rapid removal from blood, in addition to its poor permeability across the blood brain barrier. In accordance, intact SOD administration has failed to protect neurons against ischemic damage [63; 64]. In order to surpass these limitations, several methodological strategies have been proposed. Liposome-entrapped SOD has been effective in reducing ischemic damage [65; 66]. Polyethylene glycol-conjugated SOD has proven to be effective against tissue damage induced by focal cerebral ischemia/reperfusion injury, either alone [67] or when administered in combination with catalase [68]; although others have obtained negative results [69]. Lecithin-bound SOD improves the outcome and attenuates focal cerebral ischemic injury [70], and polyamine-modified SOD was neuroprotective in a global ischemia model even when administered after the ischemic period [71]. Other groups have successfully prevented ischemic damage using synthetic analogues of SOD [72; 73; 74].

Transgenic animals have been a useful tool to clarify the role of SOD during ischemia. For this purpose animals expressing human SOD-1 have been developed. In transient focal ischemia models reduced infarct areas are observed in SOD transgenic animals as compared to controls [75; 76; 77].

This effect is accompanied with the preservation of GSH levels in the striatum [75] and reduced edema [76; 78]. Other pathways are affected by SOD-1 overexpression during transient focal ischemia, including reduced ERK activity [79], delayed activation of the transcription factor, activator protein-1 (AP-1) [80]; activation of the Akt cell survival pathway [81], and reduced release of cytochrome c from mitochondria [82]. In addition, studies on SOD-1 knockout (KO) animals showed increased mortality, and enhanced damage after focal cerebral ischemia/reperfusion [83]. Overall, overexpression of SOD-1 leads to reduced apoptotic cell death and increases survival signals. Taken together, these results suggest that oxidative stress plays a role in cell death signaling in ischemia/reperfusion models. In contrast, no protection was observed in a permanent focal ischemia model in SOD-1 overexpressing animals [84]; and SOD-1 KO mice did not show enhanced vulnerability to ischemic neuronal damage [85]. These results suggest that SOD-1 plays a role mainly during the reperfusion period when most of ROS are produced. In accordance, in a global ischemic model followed by reperfusion, overexpression of SOD-1 reduced tissue damage and prevented the expression of apoptotic markers [86; 87].

Regarding SOD-2, studies have been performed using mutant mice with a heterozygous KO gene (*Sod2*  $-/+$ ), encoding mitochondrial manganese superoxide dismutase. Increased mitochondrial  $O_2^{\bullet-}$  production, augmented infarct size and increased cytochrome c release were observed in these animals after permanent cerebral ischemia [88; 89]. Similar results were obtained using a focal ischemia/reperfusion model [90; 91], accompanied with increased caspase-9 activation [90]. In accordance, overexpression of SOD-2 significantly reduced the infarct volume, lipoperoxidation levels and the number of nitrotyrosine positive cells in an ischemia/reperfusion model [92]. Taken together, these results suggest that normal activity of SOD-2 is required to prevent excessive mitochondrial  $O_2^{\bullet-}$  production, which is directly involved in the triggering of the apoptotic death cascade and development of the ischemic damage.

The role of SOD-3 in ischemic damage has received less attention, but the overexpression of this enzyme in mice correlated with an enhanced tolerance to focal [93] and global cerebral ischemia [94]. On the contrary, SOD-3 KO mice showed a worse outcome [95]. These results suggest a role of extracellular ROS in ischemic damage.

### **Glutathione peroxidase (Gpx)**

Gpx participates in the reduction of  $H_2O_2$  and a large variety of hydroperoxides (such as DNA peroxides and lipid peroxides) into water and alcohols, respectively (Figure 1). There are at least five Gpx isoenzymes in

mammals. Although their expression is ubiquitous, the levels of each isoform vary depending on the tissue type [96]. In brain, cytosolic and mitochondrial Gpx-1 contribute to most of the Gpx activity. In addition, neurons show particularly low levels of the antioxidant enzyme catalase [96], relying primarily on Gpx-1 the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxides. Gpx-1 is thought to play a protective role against oxidative stress in neurons [96; 97].

Overexpression of human Gpx-1 confers better protection to transgenic mice against ischemia/reperfusion damage induced by focal cerebral ischemia [98], as well as a reduced inflammatory response and glial activation [99; 100]. Gene therapy has proven to be useful to evaluate the potential neuroprotective effect of Gpx-1 in a focal ischemia model. It was found that increased Gpx-1, even when this enzyme was transfected postischemically, reduced neuronal damage as well as apoptosis-related markers [101]. In the same model of ischemia, Crack et al. have shown that Gpx-1 KO mice have a larger infarct volume, impaired neurological responses and exacerbated apoptosis as compared with their wild-type counterparts [102]. With respect to the activity of Gpx during ischemia, it has been shown that it remains unaltered until a significant increase is reached 72 h after reperfusion [29].

There is only one report regarding Gpx activity in hypoglycemic conditions. This study showed that, before the onset of coma, Gpx activity is reduced in brain homogenates [35]. Studies performed during and after the isoelectric period are still lacking.

### **Catalase**

Catalase is present in peroxisomes of every aerobic cell, but its activity is very low in brain. Catalase prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damaging effects by catalyzing its breakdown in molecular oxygen and water. Recently, a study has shown that overexpression of catalase, prior to the ischemic insult, can protect neurons in a rat model of transient focal cerebral ischemia [103]. In insulin-induced hypoglycemia it has been found that catalase activity is increased in all brain regions studied (cerebral hemisphere, cerebellum and brain stem) [35].

### **Iron-related antioxidant defense**

Iron is found throughout the brain. Important iron-containing proteins in brain include cytochromes, ferritin, aconitases, and tyrosine and tryptophan hydroxylase, which catalyze the first steps in the synthesis of dopamine and serotonin, respectively [104]. Iron crosses the blood-brain barrier through a receptor-mediated mechanism specific for transferrin. Internalization of iron-containing transferrin is followed by the release of iron within endosomes and transport to the cytosol via divalent metal transporter I (DMT1), which is expressed in neurons. In the extracellular space iron can be released from



transferrin due to the interaction with other molecules such as ATP and citrate [for review see 105]. A slight decrease in pH also favors the displacement of iron from transferrin [106]. Brain iron is coupled to ferritin in oligodendrocytes and microglia however the concentration of ferritin in neurons is very limited. Interestingly, neurons that do not contain iron bounded to ferritin (such as substantia nigra and pars compacta) are prone to damage, linking the accumulation of free iron with cellular damage. Neurons contain ferroportin, a membrane-bound protein probably mediating ferrous iron export through the cell membrane. This finding together with the low neuronal concentration of ferritin suggests that neurons export residual iron from the cytosol rather than storing it [105].

Iron is necessary for normal neural function, but it must be stringently regulated to prevent iron-induced oxidative injury. Under damaging situations, iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) released from heme-containing proteins is capable of catalyzing free radical reactions, such as  $\cdot\text{OH}$  formation from  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lipid peroxidation and autoxidation of neurotransmitters [107].

A possible damaging role of iron during ischemia has been suggested, since stroke patients show high ferritin levels in serum and CSF within the first 24 h after acute ischemic stroke, which correlate with a poor outcome and are associated with early neurologic deterioration [108; 109]. In experimental studies, increasing iron concentrations either by an iron-rich diet [110; 111] or by intraperitoneal injection [112], before the onset of permanent ischemia enhances brain damage. By contrast, no exacerbation of damage was found by Millerot and co-workers despite increased serum iron and ferritin levels [113]. On the other hand, upon an iron-deficient diet depletion of iron tissue stores, attenuated brain edema following focal cerebral ischemia and reperfusion as effectively as an iron-chelator treatment [114]. Iron chelating agents, such as deferoxamine and 2,2'-Dipyridyl, prevent post-ischemic neuronal injury [115; 116] even if deferoxamine is administered 24 h after the insult [117]. Recently it has been shown that deferoxamine not only chelates iron but also has a stabilizing effect on HIF-1 expression [117]. HIF-1 increases the expression of many genes involved in cell survival, therefore it is unclear if protection observed with deferoxamine is related to its antioxidant capacity or to an HIF-1 mediated mechanism.

Iron deposits after ischemia are found mainly in brain regions where delayed damage will occur, such as hippocampal CA<sub>1</sub> area [118; 119] and the corpus striatum [119], even in the neonatal brain [120]. Iron deposits might reflect abnormal brain iron metabolism or iron release from damaged cells. These deposits are accompanied with increased transferrin and ferritin-positive gliosis [118; 121] suggesting the activation of iron handling systems during the postischemic period. Brain ischemia may also lead to augmented



iron supply to neurons, as transferrin receptor expression in brain capillary endothelial cells is increased [122].

The possible role of iron in hypoglycemic damage has not been explored. Although advances have been done, more studies are needed in order to know the role of iron-handling systems in brain, how they operate and their possible contribution to ischemic and hypoglycemic damage. This knowledge will eventually help to figure out the potential manipulation of these system as a protection strategy against neuronal damage.

## Conclusion

A deep knowledge of the activity of the endogenous antioxidant defense systems in the CNS during brain injury will provide useful information aimed to offer new therapeutic strategies. The manipulation of the antioxidant system to prevent oxidative damage is not restricted to ischemic or hypoglycemic damage, since oxidative stress is associated with diverse pathological states in the CNS, including neurodegenerative diseases.

## Acknowledgments

This work was supported by 48645-Q CONACYT grant to LM and 181312 CONACYT fellowship to MLH.

## References

1. Davidson, M.B. 2002, *Manual of endocrinology and metabolism*, N. Lavin (Ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 489.
2. Cryer, P.E., Davis, S.N., and Shamoon, H. 2003, *Diabetes Care*, 26, 1902.
3. Auer, R.N., Olsson, Y., and Siesjo, B.K. 1984, *Diabetes*, 33, 1090.
4. Halliwell, B., 1992, *J. Neurochem.*, 59, 1609.
5. Chan, P.H. 1996, *Stroke*, 27, 1124.
6. Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. 2006, *Free Rad. Biol. Med.*, 40, 376.
7. Kinuta, Y., Kimura, M., Itokawa, Y., Ishikawa, M. and Kikuchi, H., 1989, *J. Neurosurg.*, 71, 417.
8. McCord, J.M. 1985, *N. Engl. J. Med.*, 312, 159.
9. Decoursey, T.E., and Ligeti, E. 2005, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2173.
10. Serrano, F., Kolluri, N.S., Wientjes, F.B., Card, J.P., and Klann, E. 2003, *Brain Res.*, 988, 193.
11. Tejada-Simon, M.V., Serrano, F., Villasana, L.E., Kanterewicz, B.I., Wu, G.Y., Quinn, M.T., and Klann, E. 2005, *Mol. Cell. Neurosci.*, 29, 97.
12. Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., Michel, J.P., and Szanto, I. 2005, *Neuroscience*, 132, 233.
13. Rhee, S.G. 2006, *Science*, 312, 1882.
14. Watson, B.D., and Ginsberg, M.D. 1989, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 559, 269.

15. Walder, C.E., Green, S.P., Darbonne, W.C., Mathias, J., Rae, J., Dinauer, M.C., Curnutte, J.T., and Thomas, G.R. 1997, *Stroke*, 28, 2252.
16. Kim, Y.H., and Koh, J.Y. 2002, *Exp. Neurol.*, 177, 407.
17. Suh, S.W., Gum, E.T., Hamby, A.M., Chan, P.H., and Swanson, R.A. 2007, *J. Clin. Inv.*, 117, 914.
18. Arrigoni, O., and De Tullio, M.C. 2002, *Biochim. Biophys. Acta*, 1569, 1.
19. Meister, A. 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 9397.
20. Njalsson, R., and Norgren, S. 2005, *Acta Paediatr.*, 94, 132.
21. Lyrer, P., Landolt, H., Kabiersch, A., Langemann, H., and Kaeser, H. 1991, *Brain Res.*, 567, 317.
22. Uemura, Y., Miller, J.M., Matson, W.R., and Beal, M.F. 1991, *Stroke*, 22, 1548.
23. Shivakumar, B.R., Kolluri, S.V., and Ravindranath, V. 1992, *Mol. Cell Biochem.*, 111, 125.
24. Park, E.-M., Choi, J.-H., Park, J.-S., Han, M.-Y., and Park, Y.-M. 2000, *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 6, 25.
25. Shivakumar, B.R., Kolluri, S.V., and Ravindranath, V. 1995, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 274, 1167.
26. Cooper, A.J., Pulsinelli, W.A., and Duffy, T.E. 1980, *J. Neurochem.*, 35, 1242.
27. Ferris, D.C., Kume-Kick, J., Ruso-Menna, I., and Rice, M.E. 1995, *Neuroreport*, 6, 1485.
28. Katz, L.M., Callaway C.W., Kagan, V.E., and Kochanek, P.M. 1998, *Neuroreport*, 9, 1587.
29. Namba, K., Takeda, Y., Sunami, K., and Hirakawa, M. 2001, *J. Neurosurg. Anesthesiol.*, 13, 131.
30. Onem, G., Aral, E., Enli, Y., Oguz, E.O., Coskun, E., Aybek, H., Ozcan, A.V., Sacar, M., Bir, L.S., Baltarli, A., and Baycu, C. 2006, *J. Surg. Res.*, 131, 124.
31. Vanella, A., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Russo, A., Castorina, C., Campisi, A., Renis, M., and Perez-Polo, J.R. 1993, *Neurochem. Res.*, 18, 1337.
32. Martinez, G., Carnazza, M.L., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Perez-Polo, J.R., and Vanella, A. 1998, *Neurochem. Res.*, 23, 961.
33. Poder, P., Zilmer, M., Starkopf, J., Kals, J., Talonpoika, A., Pulges, A., Langel, U., Kullisaar, T., Viiraid, S., Mahlapuu, R., Zarkovski, A., Arend, A., and Soomets, U. 2004, *Neurosci. Lett.*, 370, 45.
34. Gotoh, O., Yamamoto, M., Tamura, A., and Sano, K. 1994, *Acta Neurochir. Suppl.*, 60, 318.
35. Bhardwaj, S.K., Sharma, M.L., Gulati, G., Chhabra, A., Kaushik, R., Sharma, P., and Kaur, G. 1998, *Mol. Chem. Neuropathol.*, 34, 157.
36. Flamm, E.S., Demopoulos, H.B., Seligman, M.L., Poser, R.G., and Ransohoff, J. 1978, *Stroke*, 9, 445.
37. Ranjan, A., Theodore, D., Haran, R.P., and Chandy, M.J. 1993, *Acta Neurochir. (Wien)*, 123, 87.
38. Henry, P.T., and Chandy, M.J. 1998, *Acta Neurochir. (Wien)*, 140, 977.
39. Ikeda, K., Negishi, H., and Yamori, Y. 2003, *Toxicology*, 189, 55.
40. Chang, C.Y., Lai, Y.C., Cheng, T.J., Lau, M.T., and Hu, M.L. 1998, *Free Radic. Res.*, 28, 15.

41. Cherubini, A., Polidori, M.C., Bregnocchi, M., Pezzuto, S., Cecchetti, R., Ingegneri, T., di Iorio, A., Senin, U., and Mecocci, P. 2000, *Stroke*, 31, 2295.
42. Yoshida, S., Abe, K., Busto, R., Watson, B.D., Kogure, K., and Ginsberg, M.D. 1982, *Brain Res.*, 245, 307.
43. Hall, E.D., Pazara, B.A. and Braughton, J.M. 1988, *Stroke*, 19, 997.
44. Yue, T.L., Barone, F.C., Gu, J.L., and Feuerstein, G.Z. 1993, *Brain Res.*, 610, 53.
45. van der Worp, H.B., Bar, P.R., Kappelle, L.J., and de Wildt, D.J. 1998, *Stroke*, 29, 1002.
46. Chaudhary, G., Sinha, K., and Gupta, Y.K. 2003, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 17, 703.
47. Hara, H., Kato, H., and Kogure, K. 1990, *Brain Res.*, 510, 335.
48. van der Worp, H.B., Thomas, C.E., Kappelle, L.J., Hoffman, W.P., de Wildt, D.J., and Bar, P.R. 1999, *Exp. Neurol.*, 155, 103.
49. Aabdallah, D.M., and Eid, N.I. 2004, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 18, 273.
50. Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castaneda, R.E., Huerta, M., Luquin, S., Gomez-Pinedo, U., Sanchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A., and Garcia-Estrada, J. 2002, *Neurosci. Lett.*, 321, 100.
51. Garcia-Estrada, J., Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castaneda, R.E., Martinez-Contreras, A., Luquin, S., de la Mora, P.G., and Navarro-Ruiz, A. 2003, *Neurosci. Res.*, 47, 219.
52. Zhang, B., Tanaka, J., Yang, L., Yang, L., Sakanaka, M., Hata, R., Maeda, N., and Mitsuda, N. 2004, *Neuroscience*, 126, 433.
53. Massieu, L., Montiel, T., del Rio, P., Hernández, K., Haces, M.L., Garcia, O., Camacho, A., Mejía, J. 2003, *Recent Res. Dev. Neurochem.*, S.G. Pandalai (Ed.), *Research Signpost*, Kerala, India, 6, 81.
54. Hernández-Fonseca, K., and Massieu, L. *J. Neurosci. Res.*, in press.
55. Patočková, J., Marhol, P., Tumova, E., Krsiak, M., Rokyta, R., Stipek, S., Crkovičská, J., and Andel, M. 2003, *Physiol. Res.*, 52, 131.
56. Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. 2002, *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 337.
57. Tokuda, Y., Uozumi, T., and Kawasaki, T. 1993, *Neurochem. Int.*, 23, 107.
58. Paschen, W., Linn, F., and Csiba, L. 1985, *Exp. Neurol.*, 90, 611.
59. Michowiz, S.D., Melamed, E., Pikarsky, E., and Rappaport, Z.H. 1990, *Stroke*, 21, 1613.
60. Toyoda, T., and Lee K.S. 1997, *Neurosci. Lett.*, 235, 29.
61. Liu, X.H., Kato, H., Araki, T., Itoyama, Y., Kato, K., and Kogure, K. 1994, *Brain Res.*, 644, 257.
62. Ohtsuki, T., Matsumoto, M., Suzuki, K., Taniguchi, N., and Kamada, T. 1993, *Brain Res.*, 620, 305.
63. Forsman, M., Fleischer, J.E., Milde, J.H., Steen, P.A., and Michenfelder, J.D. 1988, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 32, 152.
64. Schürer, L., Gröfwaard, B., Gerdin, B., and Arfors, K.E. 1990, *Acta Neurochir.*, 103, 163.
65. Imaizumi, S., Woolworth, V., Fishman, R.A., and Chan, P.H. 1990, *Stroke*, 21, 1312.
66. Stanimirovic, D.B., Markovic, M., Micic, D.V., Spatz, M., and Mrsulja, B.B. 1994, *Neurochem. Res.*, 19, 1473.

67. He, Y.Y., Hsu, C.Y., Ezrin, A.M., and Miller, M.S. 1993, *Am. J. Physiol.*, 265, H252.
68. Liu, T.H., Beckman, J.S., Freeman, B.A., Hogan, E.L., and Hsu, C.Y. 1989, *Am. J. Physiol.*, 256, H589.
69. Haun, S.E., Kirsch, J.R., Helfaer, M.A., Kubos, K.L., and Traystman, R.J. 1991, *Stroke*, 22, 655.
70. Tsubokawa, T., Jadhav, V., Solaroglu, I., Shiokawa, Y., Konishi, Y., and Zhang, J.H. 2007, *Stroke*, 38, 1057.
71. Wengenack, T.M., Curran, G.L., and Poduslo, J.F. 1997, *Brain Res.*, 754, 46.
72. Shimizu, K., Rajapakse, N., Horiguchi, T., Payne, R.M., and Busija, D.W. 2003, *Brain Res.*, 963, 8.
73. Mollace, V., Iannone, M., Muscoli, C., Palma, E., Granato, T., Modesti, A., Nistico, R., Rotiroli, D., and Salvemini, D. 2003, *BMC Pharmacol.*, 3, 8.
74. Sharma, S.S., and Gupta, S. 2007, *Eur. J. Pharmacol.*, 561, 72.
75. Kinouchi, H., Epstein, C.J., Mizui, T., Carlson, E., Chen, S.F., and Chan, P.H. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 88, 11158.
76. Chan, P.H., Kinouchi, H., Epstein, C.J., Carlson, E., Chen, S.F., Imaizumi, S., and Yang, G.Y. 1993, *Prog. Brain Res.*, 96, 97.
77. Yang, G., Chan, P.H., Chen, J., Carlson, E., Chen, S.F., Weinstein, P., Epstein, C.J., and Kamii, H. 1994, *Stroke*, 25, 165.
78. Kokubo, Y., Matson, G.B., Derugin, N., Hill, T., Mancuso, A., Chan, P.H., and Weinstein, P.R. 2002, *Brain Res.*, 947, 1.
79. Noshita, N., Sugawara, T., Hayashi, T., Lewen, A., Omar, G., and Chan, P.H. 2002, *J. Neurosci.*, 22, 7923.
80. Huang, C.-Y., Fujimura, M., Chang, Y.-Y., and Chan, P.H. 2001, *Stroke*, 32, 741.
81. Noshita, N., Sugawara, T., Lewen, A., Hayashi, T., and Chan, P.H. 2003, *Stroke*, 34, 1513.
82. Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Noshita, N., Sugawara, T., Kawase, M., and Chan P.H. 2000, *J. Neurosci.*, 20, 2817.
83. Kondo, T., Reaume, A.G., Huang, T.T., Carlson, E., Murakami, K., Chen, S.F., Hoffman, E.K., Scott, R.W., Epstein, C.J., and Chan, P.H. 1997, *J. Neurosci.*, 17, 4180.
84. Chan, P.H., Kamii, H., Yang, G., Gafni, J., Epstein, C.J., Carlson, E., and Reola, L. 1993, *Neuroreport*, 5, 293.
85. Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Copin, J., Yoshimoto, T., and Chan, P.H. 2001, *Brain Res.*, 889, 208.
86. Chan, P.H., Kawase, M., Murakami, K., Chen, S.F., Li, Y., Calagui, B., Reola, L., Carlson, E., and Epstein, C.J. 1998, *J. Neurosci.*, 18, 8292.
87. Sugawara, T., Noshita, N., Lewen, A., Gasche, Y., Ferrand-Drake, M., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., and Chan, P.H. 2002, *J. Neurosci.*, 22, 209.
88. Murakami, K., Kondo, T., Kawase, M., Li, Y., Sato, S., Chen, S.F., and Chan P.H. 1998, *J. Neurosci.*, 18, 205.
89. Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Kawase, M., Copin, J.C., Calagui, B., Epstein, C.J., and Chan, P.H. 1999, *J. Neurosci.*, 19, 3414.

90. Noshita, N., Sugawara, T., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., and Chan, P.H. 2001, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 21, 557.
91. Kim, G.W., Kondo, T., Noshita, N., and Chan, P.H. 2002, *Stroke*, 33, 809.
92. Keller, J.N., Kindy, M.S., Holtsberg, F.W., St Clair, D.K., Yen, H.C., Germeyer, A., Steiner, S.M., Bruce-Keller, A.J., Hutchins, J.B., and Mattson, M.P. 1998, *J. Neurosci.*, 18, 687.
93. Sheng, H., Bart, R.D., Oury, T.D., Pearlstein, R.D., Crapo, J.D., and Warner, D.S. 1999, *Neuroscience*, 88, 185.
94. Sheng, H., Kudo, M., Mackensen, G.B., Pearlstein, R.D., Crapo, J.D., and Warner, D.S. 2000, *Exp. Neurol.*, 163, 392.
95. Sheng, H., Brady, T.C., Pearlstein, R.D., Crapo, J.D., and Warner, D.S. 1999, *Neurosci. Lett.*, 267, 13.
96. de Haan, J.B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R.D., Cheung, N.S., Bronson, R.T., Silvestro, M.J., Wild, S., Zheng, S.S., Beart, P.M., Hertzog, P.J., and Kola, I. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 22528.
97. Klivenyi, P., Andreassen, O.A., Ferrante, R.J., Dedeoglu, A., Mueller, G., Lancelot, E., Bogdanov, M., Andersen, J.K., Jiang, D., and Beal, M.F. 2000, *J. Neurosci.*, 20, 1.
98. Weisbrot-Lefkowitz, M., Reuhl, K., Perry, B., Chan, P.H., Inouye, M., and Mirochnitchenko, O. 1998, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 53, 333.
99. Ishibashi, N., Prokopenko, O., Weisbrot-Lefkowitz, M., Reuhl, K.R., and Mirochnitchenko, O. 2002, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 109, 34.
100. Ishibashi, N., Prokopenko, O., Reuhl, K.R., and Mirochnitchenko, O. 2002, *J. Immunol.*, 168, 1926.
101. Hoehn, B., Yenari, M.A., Sapolsky, R.M., and Steinberg, G.K. 2003, *Stroke*, 34, 2489.
102. Crack, P.J., Taylor, J.M., Flentjar, N.J., de Haan, J., Hertzog, P., Iannello, R.C., and Kola, I. 2001, *J. Neurochem.*, 78, 1389.
103. Gu, W., Zhao, H., Yenari, M.A., Sapolsky, R.M., and Steinberg, G.K. 2004, *Neuroreport*, 15, 413.
104. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 727.
105. Moos, T., and Morgan, E.H. 2004, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1012, 14.
106. Morgan, E.H. 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, 580, 312.
107. Carbonell, T., and Rama, R. 2007, *Curr. Med. Chem.*, 14, 857.
108. Davalos, A., Fernandez-Real, J.M., Ricart, W., Soler, S., Molins, A., Planas, E., and Genis, D. 1994, *Stroke*, 25, 1543.
109. Davalos, A., Castillo, J., Marrugat, J., Fernandez-Real, J.M., Armengou, A., Cacabelos, P., and Rama, R. 2000, *Neurology*, 54, 1568.
110. Castellanos, M., Puig, N., Carbonell, T., Castillo, J., Martinez, J., Rama, R., and Davalos, A. 2002, *Brain Res.*, 952, 1.
111. Gamez, A., Carbonell, T., and Rama, R. 2003, *J. Physiol. Biochem.* 59, 249.
112. Mehta, S.H., Webb, R.C., Ergul, A., Tawfik, A., and Dorrance, A.M. 2004, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, R283.



113. Millerot, E., Prigent-Tessier, A.S., Bertrand, N.M., Faure, P.J., Mossiat, C.M., Giroud, M.E., Beley, A.G., and Marie, C. 2005 *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 25, 1386.
114. Patt, A., Horesh, I.R., Berger, E.M., Harken, A.H., and Repine, J.E. 1990, *J. Pediatr. Surg.*, 25, 224.
115. Rosenthal, R.E., Chanderbhan, R., Marshall, G. and Fiskum, G. 1992, *Free Radic. Biol. Med.*, 12, 29.
116. Demougeot, C., Van Hoecke, M., Bertrand, N., Prigent-Tessier, A., Mossiat, C., Beley, A., and Marie, C. 2004, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311, 1080.
117. Freret, T., Valable, S., Chazalviel, L., Saulnier, R., Mackenzie, E.T., Petit, E., Bernaudin, M., Boulouard, M., and Schumann-Bard, P. 2006, *Eur. J. Neurosci.*, 23, 1757.
118. Kondo, Y., Ogawa, N., Asanuma, M., Ota, Z., and Mori, A. 1995, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 216.
119. Danielisova, V., Gottlieb, M., and Burda, J. 2002, *Neurochem. Res.*, 27, 237.
120. Palmer, C., Menzies, S.L., Roberts, R.L., Pavlick, G., and Connor, J.R. 1999, *J. Neurosci. Res.*, 56, 60.
121. Ishimaru, H., Ishikawa, K., Ohe, Y., Takahashi, A., Tatemoto, K., and Maruyama, Y. 1996, *Brain Res.*, 726, 23.
122. Omori, N., Maruyama, K., Jin, G., Li, F., Wang, S.J., Hamakawa, Y., Sato, K., Nagano, I., Shoji, M., and Abe, K. 2003, *Neurol. Res.*, 25, 275.

### 2.3 Avances recientes en el campo de la hipoglucemia.

Se ha sugerido la presencia de estrés oxidativo durante la hipoglucemia (Patočková y col, 2003), aunque en sí la fuente de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la temporalidad de su producción no se ha dilucidado. En este sentido, trabajos recientes utilizando el modelo en roedores de hipoglucemia severa, con un periodo isoeléctrico de 30 min, han tratado de establecer un orden secuencial de eventos involucrados en el desarrollo del daño hipoglucémico. A través de diversas estrategias experimentales han conseguido obtener resultados que sugieren que la principal fuente de  $O_2^{\bullet-}$  durante la hipoglucemia severa es la enzima NADPH oxidasa. Para ello utilizaron tanto la administración de un inhibidor específico de la NADPH oxidasa en animales hipoglucémicos como animales transgénicos que carecen de una subunidad de esta enzima. En ambos casos observaron una importante reducción del daño hipoglucémico (Suh y col, 2007b). Además en este trabajo observaron que la lesión hipoglucémica se da principalmente durante el periodo de reperfusión y que está ligada a la reintroducción de glucosa sugiriendo que su utilización en el ciclo de las pentosas conlleva a la generación de NADPH, el cual activaría a la NADPH oxidasa (Suh y col, 2007b).

Anteriormente se había sugerido la participación del  $Zn^{2+}$  en el daño hipoglucémico, ya que un quelante de este ión previene la muerte neuronal (Suh y col, 2004). Recientemente un estudio relacionó la liberación de  $Zn^{2+}$  con la activación de la NADPH oxidasa. Para ello se utilizaron tanto quelantes de este ión, como ratones transgénicos deficientes del transportador vesicular de este catión. Con ambas estrategias se observó una menor producción de  $O_2^{\bullet-}$  y una reducción considerable de la muerte neuronal (Suh y col, 2008). Estos resultados sugieren que la presencia de  $Zn^{2+}$  es necesaria para la activación de la NADPH oxidasa. Así mismo utilizaron un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa, que previene la síntesis de óxido

nítrico (NO), al inicio de la reperfusión de glucosa en animales hipoglucémicos. Esta estrategia permitió observar que el NO está involucrado en la liberación vesicular de  $Zn^{2+}$  (Suh y col, 2008).

Adicionalmente, se ha visto que la administración de un inhibidor de la polimerasa de poli-ADP ribosa (PARP) administrado en el periodo de reperfusión, previene eficazmente el daño hipoglucémico (Suh y col, 2003). Una expresión aumentada de la superóxido dismutasa (SOD-1) no tiene ningún efecto sobre la liberación del  $Zn^{2+}$ , sin embargo, previene la activación de la PARP, lo que sugiere que el  $O_2^{\bullet-}$  participa en la activación de la PARP (Suh y col, 2008). En conjunto, estas observaciones apuntan a que el daño después de un periodo de coma hipoglucémico ocurre como consecuencia de la reintroducción de glucosa. La reintroducción de ésta conlleva la producción de NO, el cual induce la liberación vesicular de  $Zn^{2+}$ . Una vez en la post-sinapsis este catión activa a la NADPH oxidasa que produce ROS. Estas especies contribuyen a la activación de la PARP-1 lo que conlleva a la muerte neuronal.

Por otra parte, se ha observado un aumento en la producción de ROS en mitocondrias aisladas de animales neonatos sometidos a hipoglucemia (McGowan y col, 2006). Estos resultados sugieren que la producción de ROS mitocondriales también aumenta en esta condición, y podrían estar contribuyendo al daño oxidativo.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De los trabajos expuestos anteriormente se desprende que el estrés oxidativo es un factor asociado a la muerte neuronal inducida por el coma hipoglucémico, y que éste se desencadena principalmente por mecanismos activados después de la reperfusión de glucosa. Sin embargo, algunos estudios sugieren que el estrés oxidativo puede presentarse incluso en ausencia del período isoelectrico, o antes de que éste se presente (Patočková y col, 2003; Singh y col, 2004). Por lo que en el presente estudio decidimos investigar si el estrés oxidativo (monitoreado a través de la presencia de lipoperoxidación y proteínas nitrosiladas) puede presentarse tempranamente durante la hipoglucemia, o si necesariamente ocurre después de la reperfusión con glucosa. Por otra parte de acuerdo a los estudios descritos en la sección anterior, se conoce que la magnitud del daño hipoglucémico depende de la duración del periodo isoelectrico y que está relacionada con los eventos que se presentan en dicho período como es la liberación de aminoácidos excitadores, cambios iónicos, depleción energética, etc. Además, está claro que la muerte hipoglucémica en el cerebro ocurre de manera selectiva, siendo más susceptibles algunas regiones cerebrales que otras. Sin embargo, a la fecha, se desconoce si puede ocurrir muerte o daño neuronal después de un periodo de hipoglucemia en ausencia de coma y cuáles serían los mecanismos asociados a ésta. En este sentido, decidimos estudiar si puede ocurrir muerte neuronal selectiva después de un periodo de hipoglucemia, en ausencia de coma, y si ésta correlaciona con la presencia de estrés oxidativo, producido ya sea antes o después de la reperfusión de glucosa. De ser el estrés oxidativo un factor importante en la producción del daño hipoglucémico se espera encontrar un aumento en sus marcadores (lipoperoxidación y proteínas nitrosiladas) solamente en las regiones cerebrales vulnerables.

Por otra parte, en la introducción se mencionó el papel protector que tienen los cuerpos cetónicos ante la muerte neuronal inducida por diversas condiciones neurotóxicas. En estudios anteriores hemos demostrado que los cuerpos cetónicos pueden prevenir la muerte neuronal excitotóxica mediada por glutamato e inducida en condiciones de inhibición glucolítica (Massieu y col, 2003; Mejía-Toiber y col, 2006) tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, conocemos que un importante componente de la muerte neuronal en estas condiciones es la producción de ROS (Mejía-Toiber y col, 2006; Hernández-Fonseca y col, 2008). Por esta razón, en el presente trabajo decidimos estudiar el efecto de los cuerpos cetónicos sobre el daño oxidativo asociado a la hipoglucemia, a través de la determinación de los niveles de lipoperoxidación en distintas regiones del cerebro. Además, se estudió si el efecto de los cuerpos cetónicos podría deberse a su utilización en el metabolismo cerebral, en condiciones de baja glucosa, o si podrían en sí tener una acción antioxidante. Para esto se utilizaron ambos isómeros del BHB.



## **HIPÓTESIS**

La condición hipoglucémica, en ausencia de coma, generará daño oxidativo y muerte neuronal en regiones discretas y vulnerables del cerebro. Los cuerpos cetónicos reducirán el daño oxidativo.

## **OBJETIVOS**

1. Investigar la presencia de estrés oxidativo en regiones cerebrales vulnerables (corteza, estriado e hipocampo) y resistentes (cerebelo) al daño hipoglucémico, a diferentes tiempos antes y después de la reintroducción de glucosa, en animales sometidos a hipoglucemia inducida por insulina.
2. Investigar la presencia de daño neuronal en regiones cerebrales vulnerables (corteza, estriado e hipocampo) y resistentes (cerebelo) al daño hipoglucémico, en animales sometidos a hipoglucemia inducida por insulina.
3. Evaluar el efecto de los cuerpos cetónicos, sobre el daño oxidativo a lípidos inducido por hipoglucemia en diferentes regiones cerebrales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En esta sección se describirán de manera muy general los protocolos y técnicas utilizadas en este trabajo, ya que una descripción detallada se presenta en cada uno de los artículos incluidos en la sección de resultados.

En el presente trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (320-350 g). Para inducir la condición de hipoglucemia los animales fueron tratados i.p. con 30 U de insulina y sacrificados a diferentes tiempos después de esta administración (Fig. 4). La disminución de los niveles sanguíneos de glucosa fue monitoreada cada hora después de la administración de insulina utilizando un glucómetro (Abbott Lab, Bedford, MA) hasta terminar la infusión de glucosa. Para ello, la sangre fue obtenida a través de una incisión hecha en la punta de la cola de las ratas.

Algunos animales fueron utilizados para evaluar los cambios en la actividad eléctrica cerebral durante la hipoglucemia, evaluada a través del EEG (Fig. 4A). Una vez establecido el modelo, algunos animales recibieron glucosa i.v. para prevenir el inicio del periodo isoelectrico. El protocolo de administración de glucosa ha sido previamente descrito (Suh y col, 2004) y consiste en una inyección rápida de 200  $\mu$ l de glucosa al 50% seguida de un infusión lenta de glucosa al 25% que dura 3 h (flujo 1.5ml/h). La administración de glucosa se inicio aproximadamente 2 h después de recibir la insulina, al presentarse la pérdida del reflejo de enderezamiento (PRE) en estos animales. Se ha descrito que la PRE antecede al coma hipoglucémico (Gundersen y col, 2001). Tras la infusión de glucosa, los animales se recuperaron gradualmente y fueron sacrificados a diferentes tiempos, como se muestra en la Figura 4B. El tiempo representado en el esquema indica el periodo transcurrido desde que los animales recibieron la infusión de glucosa (aprox. 2 h después de la inyección de insulina), y periodos variables de recuperación a partir de este momento (6, 12, 24, 48 h). Únicamente en los

experimentos de lipoperoxidación se utilizaron tiempos cortos previos a la PRE. Los animales cuya actividad cerebral fue monitoreada con EEG fueron sacrificados 24 h después y sus cerebros utilizados para evaluar la presencia tanto de muerte neuronal con la tinción de FJB como de proteínas nitrosiladas por inmunohistoquímica. Para los experimentos donde se evaluó la capacidad de los cuerpos cetónicos para reducir el daño oxidativo a los lípidos, los animales fueron sacrificados al presentarse la PRE, ya que en ese momento se detectó el aumento de la lipoperoxidación en los animales hipoglucémicos (Fig. 4C).

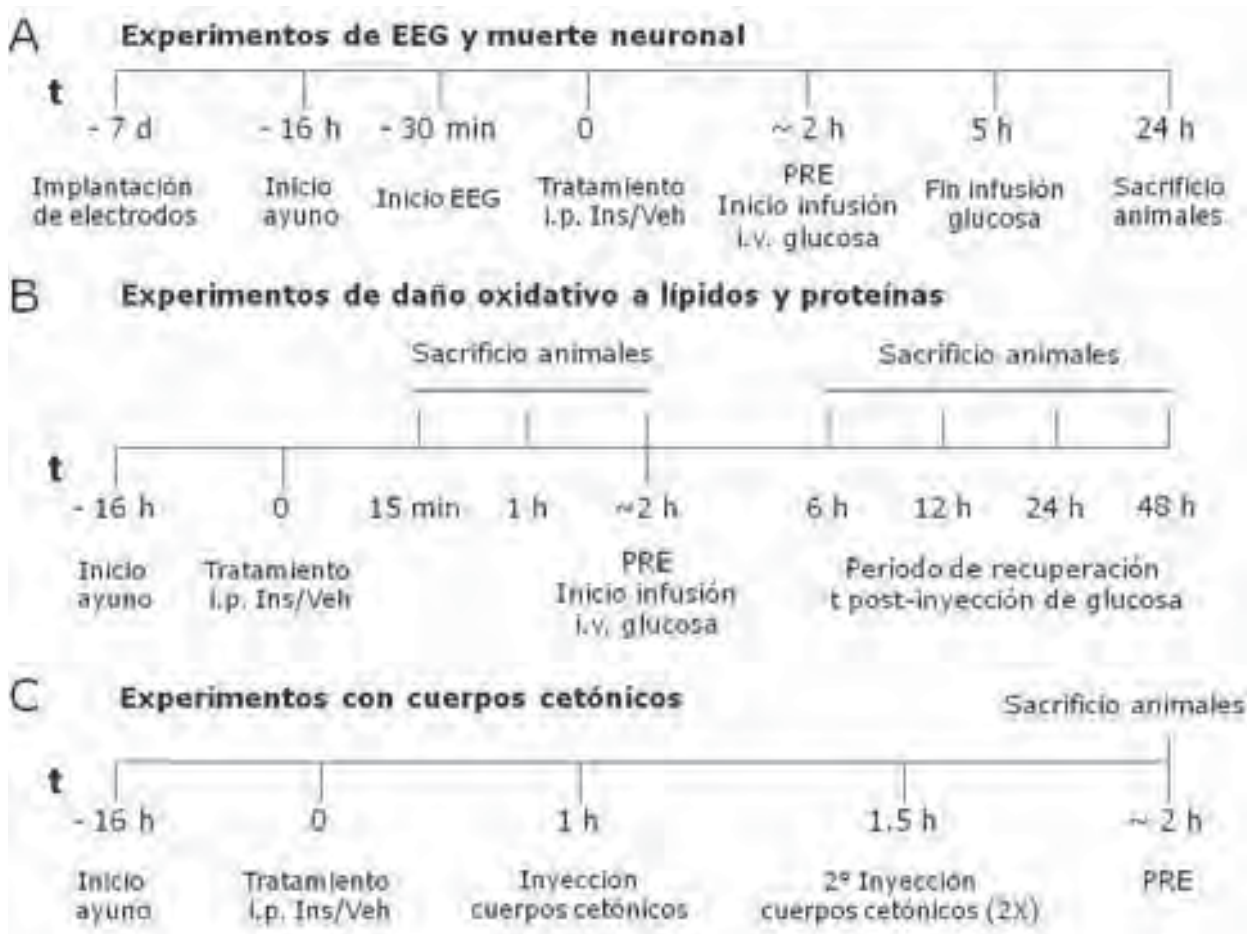


Figura 4. Esquema representativo de las diferentes estrategias y protocolos de administración utilizados en los experimentos con los animales hipoglucémicos. A) experimentos para establecer los cambios en la actividad cerebral por EEG y determinar la muerte neuronal por FJB; B) protocolos seguidos para la evaluación del daño oxidativo a

lípidos y proteínas; C) protocolo para evaluar el efecto protector de los cuerpos cetónicos contra el daño oxidativo.

En la Figura 5 se esquematizan los diferentes métodos llevados a cabo con las muestras (alícuotas de sangre, cortes y homogenados de cerebro) obtenidas a partir del sacrificio de los animales. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos tal como se muestra en la Figura 4. Una descripción más detallada de cada técnica está incluida en los artículos que forman la sección de resultados de la presente tesis. Básicamente se evaluó la presencia de daño oxidativo tanto en lípidos (lipoperoxidación) como en proteínas (proteínas nitrosiladas) de cerebros de animales hipoglucémicos. Para los experimentos de lipoperoxidación se utilizaron homogenados de cada región cerebral de interés (hipocampo, corteza, estriado y cerebelo) y se determinó la presencia de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcador de oxidación lipídica. Mientras que para observar el daño oxidativo en las proteínas se utilizaron homogenados (para Western blot (WB)) y cortes coronales (para inmunohistoquímica) de las regiones antes mencionadas. Otro marcador de daño oxidativo utilizado consistió en detectar la presencia de proteínas modificadas por el 4-hidroxinonenal (4-HNE), para ello se hicieron WB de los hipocampos de los animales hipoglucémicos. Por su parte, la muerte neuronal en esta condición fue evaluada con FJB en cortes cerebrales. La sangre de los animales fue utilizada para determinar la concentración de glucosa y de cuerpos cetónicos.



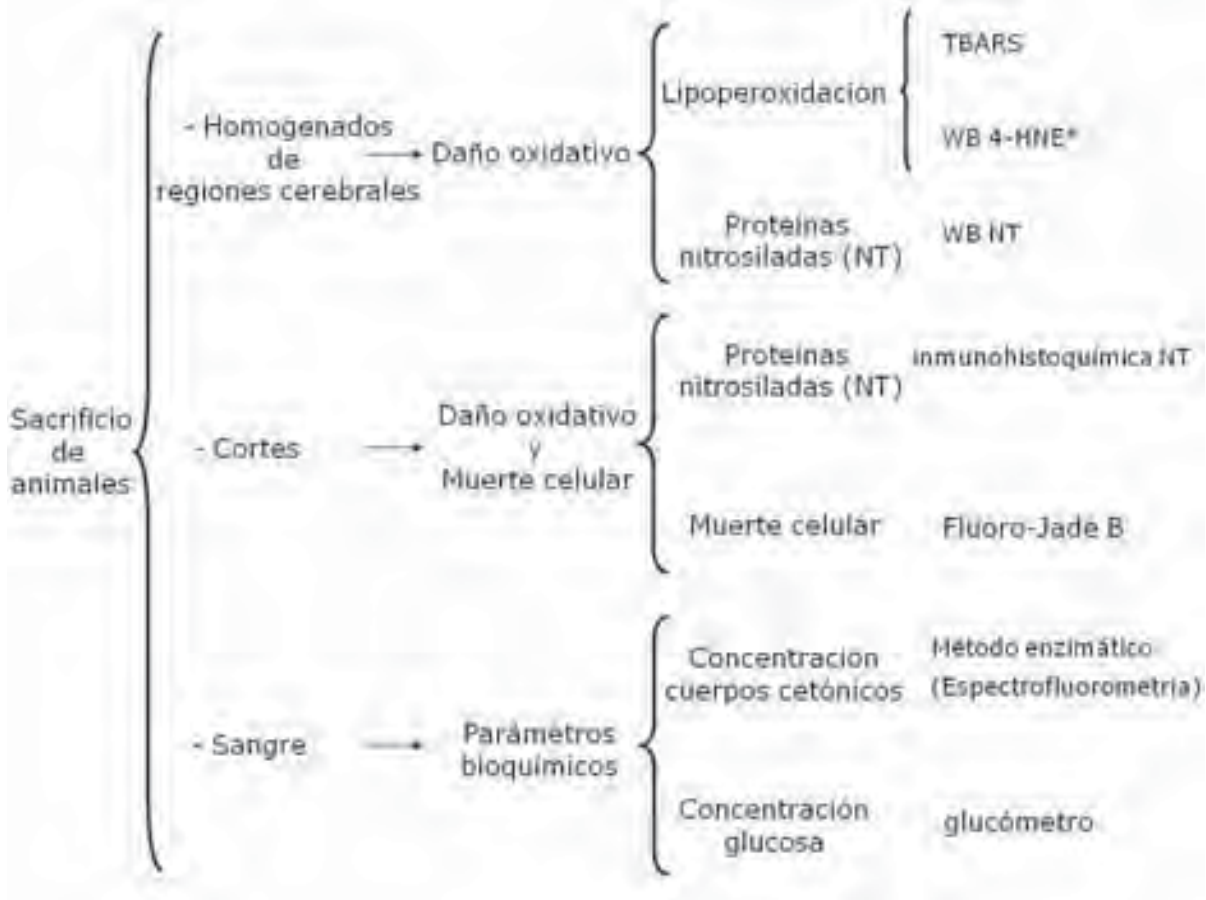


Figura 5. Los resultados de la presente tesis fueron obtenidos a partir de homogenados cerebrales, cortes de cerebro y muestras de sangre. Los homogenados fueron usados tanto para la técnica de TBARS como para llevar a cabo Western blots (WB) donde se analizaron la presencia de proteínas modificadas por el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (# solamente en el hipocampo) o de proteínas nitrosiladas (NT). A partir de los cortes cerebrales se realizó la técnica de inmunohistoquímicas para proteínas nitrosiladas y Fluoro-Jade (FJB) para evaluar la presencia de células dañadas. La sangre fue utilizada para determinar la concentración de glucosa y de cuerpos cetónicos.

## **RESULTADOS**

1. Vulnerabilidad cerebral selectiva al daño oxidativo y su relación con la muerte neuronal en condiciones de hipoglucemia.

La presencia de daño oxidativo fue evaluada tanto en lípidos como en proteínas obtenidas de diferentes regiones cerebrales de animales hipoglucémicos. Esto nos permitió conocer si existe una distribución diferencial de estrés oxidativo entre regiones vulnerables a la hipoglucemia en comparación con el cerebelo que es más resistente. Además decidimos estudiar la temporalidad con que aparece el daño oxidativo en los lípidos y en las proteínas, incluyendo animales que fueron sacrificados antes de la PRE y otros que recibieron glucosa y tuvieron tiempos variables de recuperación. La presencia de daño fue evaluada por el método de FJB. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación en el artículo 3.

### **Artículo 3**

“Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia”.

María L. Haces, Teresa Montiel, Lourdes Massieu.

Aceptado en Neuroscience (2009).



Please cite this article in press as: Haces ML, et al. Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.003

*Neuroscience* 161 (2009) xxx

## SELECTIVE VULNERABILITY OF BRAIN REGIONS TO OXIDATIVE STRESS IN A NON-COMA MODEL OF INSULIN-INDUCED HYPOGLYCEMIA

M. L. HACES, T. MONTIEL AND L. MASSIEU\*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, CP 04510, AP 70253, México D.F., México

**Abstract**—Insulin-induced hypoglycemia causes the death of neurons in particular brain regions including the cerebral cortex, the striatum and the hippocampus, while the cerebellum and the brain stem are more resistant. The mechanisms underlying this selective vulnerability to hypoglycemic damage are unknown. In the present study we have analyzed the presence of lipoperoxidation products and nitrosilated protein residues in different rat brain regions during and after the induction of hypoglycemia. Insulin-injected hypoglycemic rats were sacrificed before the onset of the isoelectric period or infused with glucose to end hypoglycemia, and then sacrificed at different times. Increased lipoperoxidation levels were observed before the onset of the isoelectric period, while 3-nitrotyrosine (NT) residues in proteins and NT-positive cells were only observed after glucose reperfusion. These changes were found only in vulnerable brain regions, while none of them was evident in the cerebellum, suggesting a correlation between oxidative damage and vulnerability to hypoglycemic neuronal death in selective brain regions. Results suggest that a pro-oxidant state is promoted in certain brain regions during hypoglycemia and after the glucose reperfusion phase, which might result from the activation of several oxidative stress pathways and may be related to subsequent cell death. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** cerebral cortex, lipoperoxidation, nitrotyrosines, oxidative damage.

Severe hypoglycemia is a serious complication of insulin therapy in diabetic patients exceeding insulin administration, and hypoglycemic episodes are frequent in many people with type 1 diabetes mellitus and advanced type 2 diabetes mellitus (Cryer, 2004). Furthermore, the ability to sense a reduction in blood glucose levels and the counter-regulatory mechanisms responsible of its correction are impaired in patients with type 1 diabetes, which make them susceptible of suffering from hypoglycemia (Becker and Ryan, 2000; Jones and Davis, 2003; Cryer, 2006). Hypo-

glycemic episodes in diabetic patients might induce cognitive impairment in children (Ryan et al., 1985; Rowell et al., 1987; Jones and Davis, 2003; Naguib et al., 2009) and adults (Akyol et al., 2003; Carroll et al., 2003; Roberts et al., 2008), and in rodent models of hypoglycemia and type 1 diabetes hippocampal damage has been associated with impairment in learning and memory tests (Suh et al., 2003; Alvarez et al., 2009). Brain ischemia is another pathological condition associated with severe impairment of glucose brain supply due to the disruption of cerebral blood flow, and hypoglycemia has been suggested to be an important component of the ischemic neuropathology (Suh et al., 2008a).

Insulin administration in rodents is the most common experimental model of hypoglycemia (Auer et al., 1984a). In these animals, when blood glucose concentration is reduced to 20 mg/dl or less, brain activity ceases and the hypoglycemic coma (also known as isoelectric period) takes place. This period is terminated by the i.v. infusion of glucose. After 30–60 min of isoelectricity, neuronal damage develops in selective brain areas such as the cortex, the hippocampus and the caudo-putamen, while other areas like the cerebellum and the brain stem are more resistant (Auer et al., 1984b; Auer, 1985). However, the mechanisms underlying the differential brain vulnerability to hypoglycemic damage have not been elucidated. Pioneer studies associated hypoglycemic neuronal death with the massive release of the excitatory amino acids, aspartate and glutamate, accompanied by energy failure and ionic imbalance, early after the onset of the isoelectric period (Wieiach, 1984; Harris et al., 1984; Sandberg et al., 1986). However, the biochemical events preceding isoelectricity, which might contribute to the later development of selective brain damage, have not been completely elucidated. Data obtained from animals sacrificed before the onset of coma, reported no changes in brain ATP levels (Goreff et al., 1976), while increased aspartate levels in hippocampal and striatal nerve endings were found (Gundersen et al., 2001). On the other hand, Patočková et al. (2003) showed the presence of lipoperoxidation in mouse brain homogenates before the initiation of coma. However, whether these changes correlate with the regional brain vulnerability to hypoglycemic damage still remains unknown.

Oxidative stress is known to be present in different pathological conditions in the CNS such as ischemia and various neurodegenerative diseases (for review see: Margall et al., 2005; Hallwell, 2006). The presence of oxidative stress during hypoglycemia has been recently sug-

\*Corresponding author. Tel: +52-5556-22-57-61; fax: +52-5556-22-56-07; E-mail address: lmassieu@icf.unam.mx (L. Massieu).  
Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraic acid; EEG, electroencephalogram; FITC, fluorescein isothiocyanate; FJB, fluoro-jade B; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NT, 3-nitrotyrosine; PBS, phosphate buffer saline; ROS, reactive oxygen species; NPI, righting reflex; SEM, standard error of the mean; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

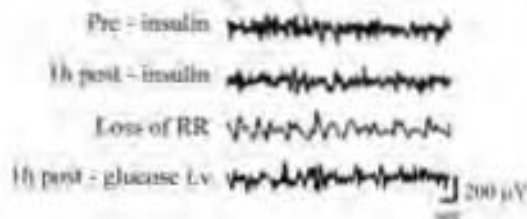


gested (Patočková et al., 2003; Singh et al., 2004; Suh et al., 2007), although its temporality and regional distribution in brain have not been explored in detail. Recent studies show that oxidative stress develops mainly after the isoelectric period during the glucose perfusion phase, and that its presence is related to the subsequent death of neurons (Suh et al., 2007). However, it is not known whether oxidative stress can be triggered by severe hypoglycemia in the absence of isoelectricity, and if it is related to the vulnerability of certain brain regions to hypoglycemic damage. Thus, in the present study we have evaluated the presence of two oxidative stress markers, lipoperoxidation and 3-nitrotyrosine (NT) modified protein residues in a model of insulin-induced hypoglycemia without isoelectricity. The presence of these markers was evaluated at different times before the onset of the isoelectric period and after glucose reperfusion, in the vulnerable regions, hippocampus, cortex and striatum as well as in the more resistant region, the cerebellum. Results suggest a correlation between oxidative stress and selective brain vulnerability to hypoglycemic damage.

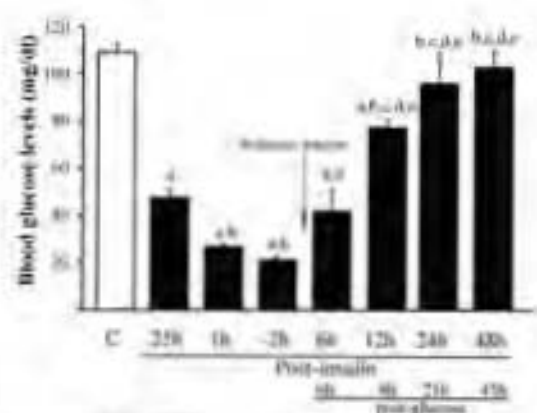
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

Male Wistar rats (320–380 g) obtained from the animal house at the Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México) were used throughout the study. They were handled according with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 80-23) revised 1996, and with the local Animal Care Committee approval. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Rats were housed under controlled conditions of temperature and light (12 h cycle) with ad libitum access to food and water, unless otherwise stated. To induce hypoglycemia rats were fasted overnight and received an i.p. injection of 30 U bovine insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA) as described (Hanon et al., 2008). Blood obtained from the tip of the tail was used to monitor blood glucose concentration with a glucometer (Abbott Laboratories, Bedford, MA, USA) at different intervals after insulin administration and before glucose infusion: 15 min, 1 h and 2, 0–3.0 h (Fig. 2), every hour during the 3 h glucose infusion period (not shown in Fig. 2), and 0, 9, 21 and 45 h after the end of glucose infusion (corresponding to 6, 12, 34 and 48 h post-insulin in Fig. 2).

Inferotemporal electroencephalogram (EEG) recordings were obtained from rats ( $n=6$ ) implanted with epidural electrodes



**Fig. 1.** Representative EEG recording showing the changes in brain electrical activity during hypoglycemia. Rats were implanted with epidural electrodes 1 week before insulin treatment. The day of the experiment a control EEG was obtained before insulin administration and electrical activity was followed once glucose infusion was completed. At the time of the loss of the righting reflex (RR) high amplitude and low frequency waves were present. After glucose infusion the normal electrical activity is recovered.



**Fig. 2.** Blood glucose levels in control and insulin-treated animals before and after glucose infusion. Blood levels throughout course of animals that received only insulin or insulin+glucose infusion to prevent the isoelectric period. The white bar represents control animals. Samples were obtained at the indicated times ( $n=5-8$  animals per group). \*  $P<0.05$  relative to control animals. #  $P<0.05$  relative to 15 min after insulin administration. &#x2013;  $P<0.05$  relative to 1 h after insulin injection. &#x2013;  $P<0.05$  relative to the time of the loss of the RR ( $-2$  h). &#x2013;  $P<0.05$  relative to insulin-treated animals analyzed 6 h after insulin administration.

1 week before insulin injection. The EEG was recorded before and after insulin injection and was followed until the end of glucose infusion. The EEG of the hypoglycemic animals exhibited all the progressive stages characteristic of hypoglycemia, as described by others (Auer et al., 1964a; Suh et al., 2003). Between 2 and 3 h after insulin injection, electrical brain activity was impaired, revealing an increase in the amplitude and a slowing of the theta (4–8 Hz) and delta (1–4 Hz) waves (compare lines 1 and 2 with line 3 in Fig. 1). At this stage animals are very drowsy and loose the righting reflex (RR), as previously reported (Quinderson et al., 2001). At this moment the rat hind limb is firmly held, a polyethylene catheter is rapidly inserted through the femoral vein and fixed with adhesive tape for glucose infusion. The surgery takes about 2–5 min and glucose is infused through a perfusion pump (Harvard Apparatus 22, South Natick, MA, USA) (0.2 ml of 50% glucose followed by continuous infusion of 25% glucose, 1.5 ml/h for 3 h, as reported by Suh et al. (2004)). Animals were ambulatory about 20 min after the initiation of glucose administration, and recovery of normal brain electrical activity was observed 1 h after the loss of the RR (Fig. 1). When glucose infusion is finished and animals are completely recovered, the catheter is removed and the animals are left in separate cages. A 4.5 $\pm$ 0.3 min ( $n=6$ ) period elapsed between the loss of the RR and the i.v. glucose infusion. Only one out of six animals receiving glucose infusion showed an isoelectric period of 5.25 min characterized by the complete absence of electrical brain activity (flat or isoelectric EEG), while the rest of the animals never showed a flat EEG. EEG recordings were taken again 24 h later in order to verify the normal pattern of the EEG at this site (not shown). Afterwards, brains were extracted and sections obtained for Fluoro-Jade B (FJB) and Hoechst staining, and for glial fibrillary acidic protein (GFAP), NT and NeuN immunohistochemistry (see below).

## Lipoperoxidation

In a separate group of animals we assessed the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), which are products of lipid peroxidation, in tissue homogenates, according to Gluck et al. (2000) as described in Hanon et al. (2008). Animals were sacrificed at different times after insulin injection (0.25 and

1 h), at the time of the loss of the RR (approximately 2 h after insulin injection) and at 0, 21 and 45 h after the end of glucose infusion ( $n=5-9$ ). Briefly, hippocampus, cortex (parietal-temporal cortex at the level of the hippocampus), striatum and cerebellum were dissected on ice. In animals sacrificed at the time of the loss of the RR and 0, 21 and 45 h after glucose infusion, brain regions were dissected from one hemisphere, while the other was used for NT determinations by Western blot (see below). Tissue was homogenized in 0.5 ml of 1.15% KCl/0.4 mM sodium acetate and incubated at 37 °C for 15 min. Then, trichloroacetic acid (20%) was added and samples were centrifuged at 14,000 g for 10 min. Supernatants were collected, mixed with an equal volume of thiobarbituric acid (0.78%, Merck, Darmstadt, Germany) and samples were incubated at 50 °C for 20 min. Absorbance was read at 532 nm and TBARS levels were calculated using a standard curve of malondialdehyde bis-(dimethyl) acetal. Data are expressed as nmoles of TBARS/mg protein. The protein concentration was calculated in 20  $\mu$ l homogenate by the Bradford's method (Bradford, 1976), using albumin as standard.

#### Determinations of 3-nitrotyrosine (NT) modified proteins

NT-positive proteins were analyzed by Western blot and immunohistochemistry. For the former, we took one hemisphere from five brains of the same animals used for superoxidation studies, except for an additional group of animals which was sacrificed 9 h after glucose infusion. Animals were sacrificed at the time of the loss of the RR and at 0, 21, and 45 h after the glucose infusion ( $n=5-9$ ). Brain regions were homogenized in phosphate buffer containing 1% Triton, 1 mM EDTA and 0.2% of a cocktail of protease-inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and stored at -70 °C until used. After determination of protein concentration, 50  $\mu$ g per sample were resolved in 7.5% acrylamide gel electrophoresis and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked and then incubated overnight with NT antibody (1:1500, Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA). Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:2000, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) was used as secondary antibody. Chemiluminescence reaction using the ECL kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) was carried out for 1 min followed by 20 min exposure to Konica Minolta medical film (Tokyo, Japan). To normalize by protein content, membranes were washed and then stained with Coomassie Brilliant Blue (0.1%) for 10 min and washed with a solution containing 50% methanol and 7% acetic acid, for 30 s. A 100 kDa protein band stained with Coomassie Blue was chosen as loading control. The optical density of the bands was quantified by means of the Image J software (NIH). Results are expressed as optical density (OD) of total positive-NT proteins/OD of the Coomassie Blue stained band.

#### Immunohistochemistry

For immunohistochemistry and FJB studies animals were sacrificed under deep anesthesia at the time of the loss of the RR ( $n=4$ ) or 21 h after glucose infusion ( $n=6$ ). They were transcardially perfused with 200 ml 0.9% saline followed by 200 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Brains were removed and transferred to a 20%–30% sucrose gradient (24 and 48 h respectively), and coronal sections were cut in a cryostat. Floating sections (25  $\mu$ m) were blocked with phosphate buffer saline (PBS)/albumin 5%/triton 0.3% for 1 h. Then sections were incubated with NT monoclonal antibody (1:150, Alpha Diagnostic Intl., San Antonio, TX, USA) and GFAP polyclonal antibody (1:500, Dako, Denmark).

Sections were washed and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse IgG (1:200, Zymed-Invitrogen, Carlsbad, CA) and Texas-Red-conjugated anti-rabbit IgG

(1:250, Vector, CA) diluted in PBS/salt/min for 2 h. Sections were washed, mounted and counterstained with the nuclear dye Hoechst (0.001% in PBS for 15 min) to facilitate the identification of NT-positive cells. Sections were washed and covered with fluoromount-G (EMS, Hatfield, PA, USA). Slides were observed under an epifluorescence Olympus microscope using U-MNB2 (universal mirror narrow blue) (395–590 nm), U-MNG2 (universal mirror narrow green) (528–605 nm) and U-MNU2 (universal mirror narrow ultraviolet) (355–465 nm) filters for FITC, Texas-Red and Hoechst, respectively, and positive cells were identified in the different brain regions. Negative control slides were prepared by omitting the primary antibodies (not shown).

#### Fluoro-Jade B experiments

FJB (Chemicon, Temecula, CA, USA) staining was performed as described by Estrada-Sánchez et al. (2009), in animals sacrificed at the time of the loss of the RR ( $n=5$ ) or 21 h after glucose infusion ( $n=6$ ). Briefly, slide-mounted coronal brain sections (20  $\mu$ m) were dried at 50 °C for 30 min, afterward 1% NaOH solution diluted in ethanol 90% was added, and 5 min later it was replaced by 70% ethanol. Slides were covered with potassium permanganate 0.06% for 10 min, immediately washed and incubated with 0.004% FJB solution dissolved in acetic acid 0.1% for 20 min. Finally, sections were washed with water, dried at 50 °C, washed with xylene during 2 min and covered with permount. Sections were observed under an epifluorescence microscope (using U-MNG2 filter) and total positive cells in each brain region were counted in 10 sections per rat by a blinded observer. Cells were counted in both hemispheres. Sections were separated by 250  $\mu$ m from each other. A series of sections was double stained for FJB and the neuronal marker NeuN. For this purpose they were incubated with monoclonal antibody NeuN (1:300 Chemicon, Temecula, CA, USA) for 72 h at 4 °C; they were washed and incubated with DyLight 594-conjugated anti-mouse IgG (1:200 Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 2 h. After washing sections were covered with potassium permanganate (0.06% for 5 min, they were washed again and incubated with 0.001% FJB for 20 min. Finally sections were washed and covered with fluoromount-G. Slides were observed under an epifluorescence Olympus microscope using U-MNB2 (395–590 nm) and U-MNG2 (528–605 nm) FITC and DyLight 594.

#### Statistical analyses

All data are expressed as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean) and were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least multiple comparison test.

## RESULTS

The electroencephalographic brain activity was recorded before (control) and during the hypoglycemic condition. A representative recording is shown in Fig. 1. Normal activity is still observed 1 h after insulin administration even though glucose levels are low, as shown in Fig. 2. Approximately 2 h after insulin injection, electrical brain activity is impaired and high amplitude and low frequency waves appear (Fig. 1 line 3), as described by others (Auer et al., 1984a). At this stage animals are very drowsy and loose their RR. Glucose is infused through the femoral vein to prevent the isoelectric period, and about 20 min after the initiation of glucose administration animals are ambulatory. The EEG normal wave pattern is recovered 1 h after glucose infusion (Fig. 1 line 4) and remains normal during the following 24 h (not shown). In five out of six animals glucose infusion successfully prevented the



isoelectric period, while in one animal despite glucose infusion was already started, an isoelectric period of 5.25 min was present. In this animal brain electrical activity was gradually recovered as glucose was infused (not shown).

Blood glucose levels were monitored in insulin-treated animals at different times. As shown in Fig. 2, they were half of control values 15 min after insulin administration and decreased further after 1 h. At this time glucose levels were similar to those observed at the time of the loss of the RR ( $-2$  h in Fig. 2). In rats receiving glucose infusion, blood glucose levels slowly raised. By the time glucose infusion was ended, blood glucose levels were significantly higher than those observed at the time of the loss of the RR, although they were still low (40 mg/dl) (Fig. 2). These levels increased further 9 h after glucose infusion but normoglycemia was not restored until 21 h (Fig. 2).

To study the effect of hypoglycemia on oxidative damage to brain lipids, lipoperoxidation levels were evaluated in different brain regions at several times after insulin administration and after glucose infusion. No increase in oxidized lipids was observed 15 min post-insulin administration, when a moderate hypoglycemic condition is present, in any of the regions studied (Fig. 3). Similar results were obtained 1 h after insulin administration, when glucose levels are already

very low. At the time of the loss of the RR ( $-2$  h in Fig. 3), animals showed a significant increase in lipoperoxidation levels in all brain regions except for the cerebellum. In rats receiving a glucose infusion, lipoperoxidation levels were similar to control values immediately after glucose reperfusion and remained low during the following 21 and 45 h in all regions studied.

The presence of NT residues in proteins of brain homogenates of hypoglycemic animals was analyzed by Western blot. Brains were extracted at the time of the loss of the RR, or at 0, 9, 21 and 45 h after glucose infusion. Based on the lipoperoxidation results, the presence of NT residues was not analyzed before the loss of the RR. Fig. 4 shows the levels of nitrated proteins in Western blots obtained from the different brain regions. In contrast to the changes observed in oxidized lipids, no significant increases in NT residues were found in insulin-treated animals at the time of the loss of the RR ( $-2$  h in Fig. 4) in any of the brain regions studied, although a non-significant increase was observed in the cortex and the striatum (Fig. 4B, C). Nonetheless, the levels of NT-modified proteins were significantly augmented by the end of glucose infusion (6 h post-insulin) in the striatum and the cerebral cortex, and remained elevated for the following 21 and 45

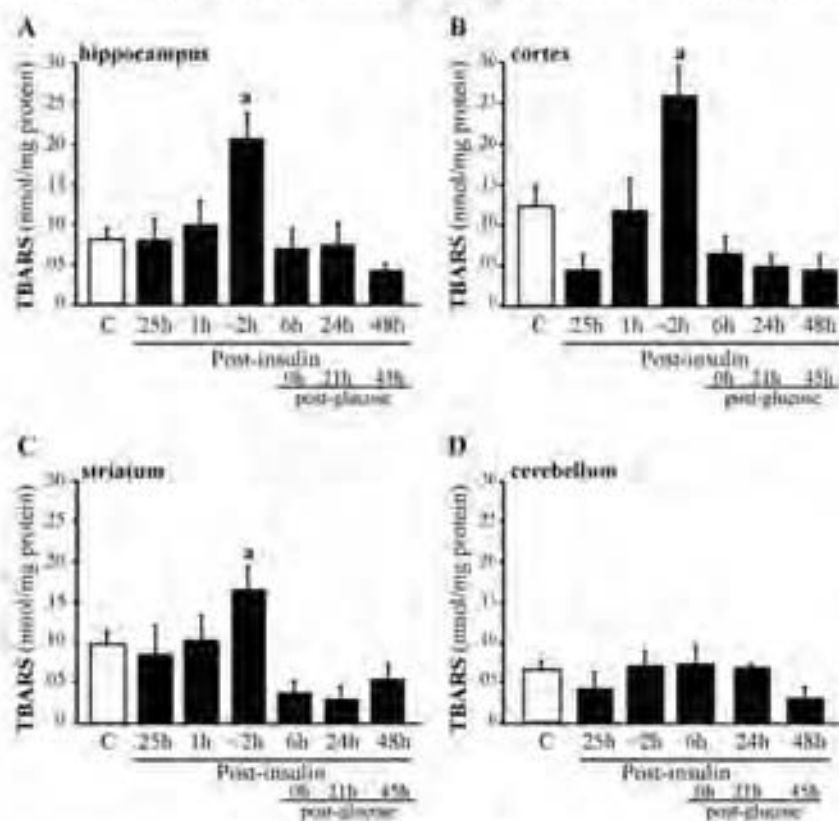


Fig. 3. Effect of insulin-induced hypoglycemia on lipoperoxidation levels in different brain regions. The hippocampus (A), cortex (B), striatum (C) and cerebellum (D) were dissected from brains of control animals (white bars) and animals treated with insulin or with insulin + glucose infusion (black bars) at the indicated times. Lipoperoxidation was determined by the TBARS method.  $n = 5-8$  animals per group.  $^* P < 0.05$  relative to control animals.

45 h, respectively after glucose administration (Fig. 4B, C). In the hippocampus significant increases were observed at later times, 9 and 21 h after glucose administration, and basal levels were recovered at 45 h (Fig. 4A). No significant changes in NT residues were observed in the cerebellum (Fig. 4D). Representative Western blots of NT-containing proteins are shown in Fig. 4. It can be observed that most of the bands are darker in the insulin-treated animals after glucose infusion in all regions studied except for the cerebellum. The Comassie Blue-stained band used as loading control is shown below each blot.

Immunohistochemical analyses were performed in brain sections to identify the presence of NT-modified proteins in cells of control and hypoglycemic rats, 24 h after glucose infusion. Immunopositive cells to NT were observed in all animals studied. They were observed mainly in the cingulate cortex and the superficial layers of the frontal, parietal and temporal cortices (Fig. 5). They were also observed in the hilar and the CA4 regions of the hippocampus (not shown), while no NT-positive neurons were observed in the striatum and cerebellum in any of the animals studied. No positive cells were found in tissue sections from the animals sacrificed at the time of the loss of the RR, nor in control animals, in any of the brain regions studied (Fig. 5). Double immunolabeling revealed that many of the NT-positive cells are not immunoreactive to GFAP antibody suggesting they are not glial cells (Fig. 5).

The presence of damaged cells was identified by FJB staining. Damaged cells were clearly observed in the animal showing a 5.25 min of isoelectricity, mainly in the cerebral cortex 21 h after the end of glucose infusion. The number of FJB-positive cells quantified in 10 brain sections from this animal was 277 in the cortex, 19 in the striatum and none in the hippocampus. Damaged cells were also observed in the brains of two out of five animals not showing isoelectricity. One of these animals showed 16 FJB-positive cells while the other showed 84 in the cerebral cortex in 10 brain sections analyzed, while no stained cells were present in the striatum, nor in the hippocampus. In the three animals showing damaged cells, these were observed in the frontal, insular, parietal and temporal cortices mainly in the superficial layers, although stained cells were also observed in the deep layers (Fig. 6). FJB-positive cells show immunoreactivity to NeuN suggesting they are neurons (Fig. 6B–D). These results are consistent with previously published data showing neuronal death associated with hypoglycemia in the absence of coma, mainly in the cerebral cortex (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008). Control animals and animals sacrificed at the time of the loss of the RR showed very few FJB-stained cells (control = 4.83 ± 1.9,  $n = 6$ ; RR = 3.5 ± 1.5,  $n = 4$  cerebral cortex). No FJB-positive cells were identified in any of the cerebellar sections analyzed, either in control or insulin-treated animals.

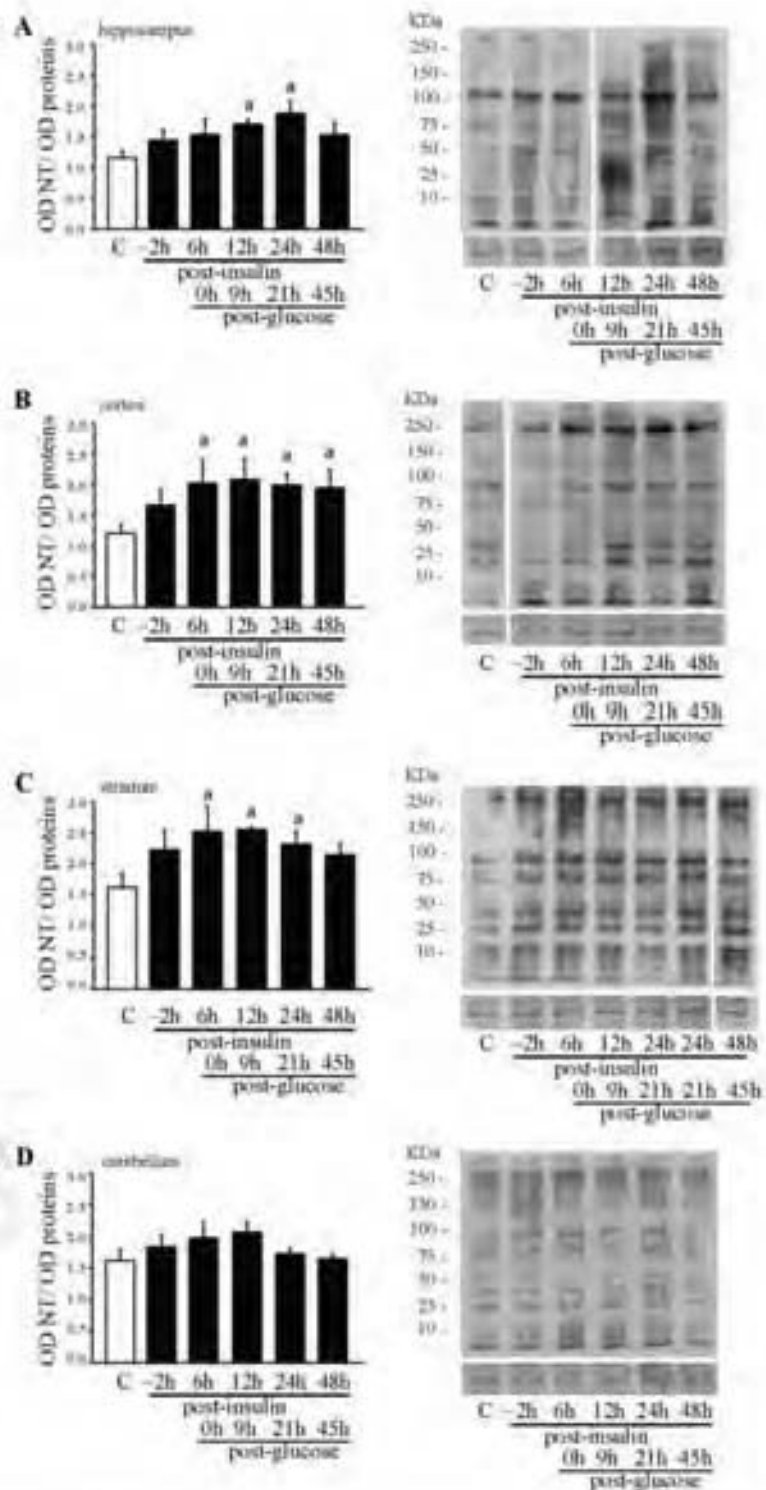
## DISCUSSION

Intensive insulin therapy in patients with type 1 diabetes mellitus is commonly associated with hypoglycemia. Pa-

tients might suffer from symptomatic hypoglycemia as frequently as twice per week and from one episode of severe hypoglycemia per year (Cryer, 2004, 2007). In addition, an impaired counter-regulatory response to hypoglycemia is frequently associated with the presence of hypoglycemic episodes in type 1 diabetic patients (Jones and Davis, 2003; Cryer, 2006). Acute brain hypoglycemia is a condition also associated with cerebral ischemia. Transient disruption of brain blood supply causes the death of neurons after reperfusion, and it is well accepted that oxidative stress is involved in the ischemic neuropathology (Margall et al., 2005). Recent studies suggest that hypoglycemic damage also involves the generation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (NOS), particularly during the glucose reperfusion phase (Suh et al., 2007, 2008b). Thus, oxidative ischemic damage might be the result of the ROS and NOS generated during oxygen and glucose reperfusion. The contribution of glucose deprivation and reintroduction to the ischemic neuropathology is still not well understood, but a recent study suggests that superoxide production induced during glucose reintroduction plays an important role (Suh et al., 2008a).

The induction of selective brain damage after a 30–60 min period of severe hypoglycemia accompanied with isoelectricity, has been known for a long time. Among the most vulnerable brain regions are the II and III superficial layers of the cerebral cortex, the dentate gyrus, the subiculum and the CA1 regions in the hippocampus, and the caudate–putamen, while hindbrain regions like the cerebellum and the brain stem are less susceptible (Auer et al., 1984b, 1995a,b; Auer, 1986). The mechanisms underlying brain differential vulnerability to hypoglycemia are far from being understood, but oxidative stress might have a role. On the other hand, recent studies have suggested the presence of cell damage in adult animals after periods of 75–210 min of relatively moderate hypoglycemia (30–35 mg/dl blood glucose) without coma, mainly in the cerebral cortex and in a lesser extent in the striatum and hippocampus (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008). The present study was aimed to investigate whether oxidative stress can be triggered by severe hypoglycemia in highly vulnerable brain regions, in the absence of isoelectricity. For this purpose, we used an insulin-induced model of hypoglycemia, and analyzed the presence of oxidative stress markers in different brain regions at different times before the onset of the isoelectric period, and after glucose infusion in animals not subjected to isoelectricity. This approach enabled us to study the early events taking place during hypoglycemia before isoelectricity, and those that develop after glucose reperfusion.

Insulin-treated animals showed a progressive reduction in blood glucose levels reaching  $<20$  mg/dl 1 h after insulin administration. This low level was sustained until the loss of the RR (about 2 h after insulin injection). Nonetheless, oxidative damage to brain lipids was observed only at the time the animals lost the RR in vulnerable regions, while no change was observed in the cerebellum. Results show similar increases in lipoperoxidation levels in the hippocampus and cortex (160% and 112%, respec-





tively), while a more moderate elevation was found in the striatum (71%). These results suggest that oxidative damage to brain lipids occurs as a consequence of the sustained reduction in glucose levels, independently of the events associated with the isoelectric period or with glucose reperfusion. Blood glucose levels slowly recovered after glucose administration, achieving moderate hypoglycemic levels (40 mg/dl) after the end of glucose reperfusion, when lipoperoxidation returned to basal values. Thus, it seems that brain cells are capable of removing oxidized lipids once animals receive glucose. This effect might be due to the availability of NADPH to generate reduced glutathione, whenever there is enough glucose to be oxidized by the phosphate pentose pathway (Dnnggen, 2000). These data are the first to show increased lipoperoxidation during hypoglycemia in discrete regions of the forebrain, highly susceptible to the hypoglycemic condition. These results agree with others showing the same effect in homogenates of whole cerebral hemispheres (Patočková et al., 2003; Singh et al., 2004), and with previous data from our group showing increased lipoperoxidation in the hippocampus of hypoglycemic rats (Haces et al., 2008).

The presence of NT residues in proteins was also studied. NT is produced as a result of the peroxyntrite reaction with tyrosine residues and thus is a useful marker of oxidative damage related to peroxyntrite formation (Beckman and Koppenol, 1996). Peroxyntrite is formed from the reaction of NO with superoxide, and it is a highly reactive radical. Here, we show increased NT-modified proteins, both by Western blot and immunohistochemistry. An increased content of nitrosylated proteins was evident only after glucose reperfusion. The earliest time examined was immediately after the end of glucose administration, when significant increases were found in the cortex and the striatum, while in the hippocampus significance was not achieved until 9 h after glucose infusion. In a previous study, increased NT residues were observed in the hippocampus at earlier times (1 and 3 h) after glucose reperfusion in hypoglycemic animals subjected to a 30 min isoelectric period suggesting that acute hypoglycemia might anticipate the appearance of oxidative stress which precedes neuronal death, at least in this cerebral region (Suh et al., 2003).

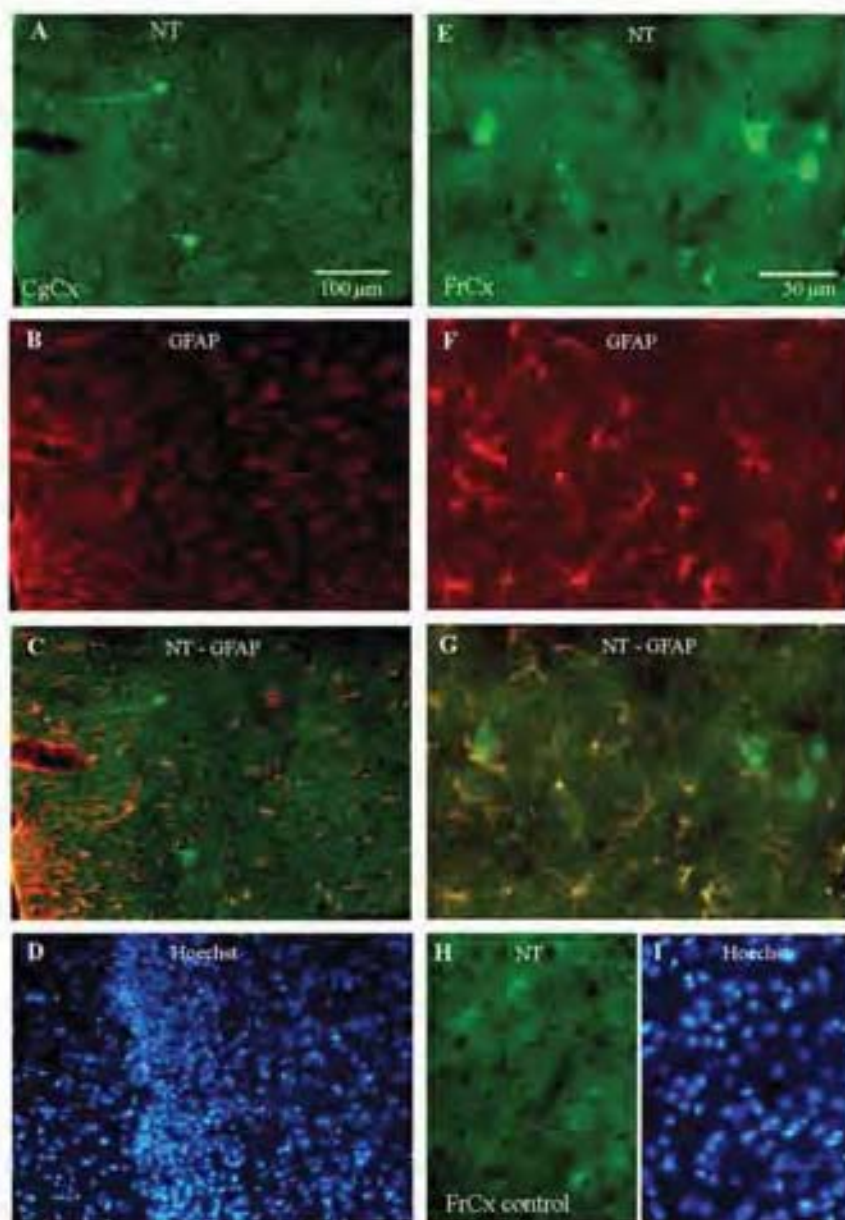
The presence of immunopositive cells to NT was detected mostly in the cerebral cortex, although positive cells were observed in the hippocampus, mainly in the hilus, as analyzed 21 h after glucose infusion. NT-positive cells were found in the six animals analyzed, while only in two of them, not reaching isoelectricity, and one of them showing a 5.25 min period of isoelectricity, damaged cells positive to FJB were observed. In these animals damaged neurons

were mainly present in the cerebral cortex, the main region showing NT-positive cells. According to doublelabeling studies FJB-positive cells correspond to neurons, since they are immunoreactive to the neuronal marker NeuN. NT-positive cells show no immunoreactivity to the glial protein GFAP, suggesting they are neurons. These results place the cerebral cortex as a highly vulnerable region to hypoglycemia-induced oxidative damage and are in agreement with previous observations showing FJB positive neurons in the cerebral cortex, after a single period of relatively moderate hypoglycemia without isoelectricity (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008). It is worth to note that in the present experimental conditions neuronal damage is very moderate relative to that reported in animals subjected to a 30–60 min of isoelectricity (Auer et al., 1985b; Suh et al., 2003). In the present study damaged neurons were observed only in two out of five hypoglycemic animals, which showed 16 and 84 FJB-positive cells, respectively (as measured in 10 brain sections) in the cerebral cortex, while a larger number of cells was present in the animal experiencing a short period of coma (277 cells). In contrast to the present results, previous studies in animals subjected to 30–60 min of isoelectricity, show severe damage in the hippocampus comprising the entire CA1 region, the subiculum and the dentate gyrus. In particular the crest of the dentate, the cerebral cortex and the striatum (Auer et al., 1985b; Suh et al., 2003). In the present conditions we did not observe any damage in the hippocampus or the striatum, suggesting that the damage induced by severe hypoglycemia without isoelectricity is quite moderate as compared to that found in rats showing hypoglycemic coma.

According to Western blot data, the content of NT-modified proteins increases significantly from 0 to 45 h after glucose reperfusion, suggesting that positive cells to NT might be present at earlier times, and that NT-modification of proteins might be an early event after glucose reperfusion. In the striatum, no NT-positive cells could be detected. However, when an enriched protein fraction from this brain region was analyzed by Western blot, the presence of NT-modified protein residues was found. These results, together with lipoperoxidation data, suggest the presence of oxidative damage related to hypoglycemia in this brain region; an observation not described before.

On the other hand, no NT- or FJB-positive cells were found at the time of the loss of the RR in any of animals studied, despite increased lipoperoxidation at this time, suggesting that oxidative damage to lipids is associated with the hypoglycemic condition and not with glucose infusion, and that it precedes NT protein modification and cell death.

**Fig. 4.** Effect of hypoglycemia on nitrosylated proteins in different brain regions (A–D). Brain regions were dissected from control (white bars) or hypoglycemic animals treated with insulin or with insulin + glucose infusion (black bars) at the indicated times. Data represent the optical density (OD) of total NT-positive bands/OD of the 100 kDa Coomassie Blue-stained band (used as loading control), as determined by Western blot analysis.  $n = 5–9$  animals per group. \*  $P < 0.05$  relative to control animals. Representative Western blots showing NT-modified protein adducts in brain regions from control and insulin-treated animals are also shown. Proteins of different molecular weight are shown in the upper panel while the 100 kDa band stained with Coomassie Blue is shown in the bottom. Samples in each panel were run in the same membrane. In (A–C) some lanes were eliminated because they were empty (E) or because samples were poorly transferred (A, C).

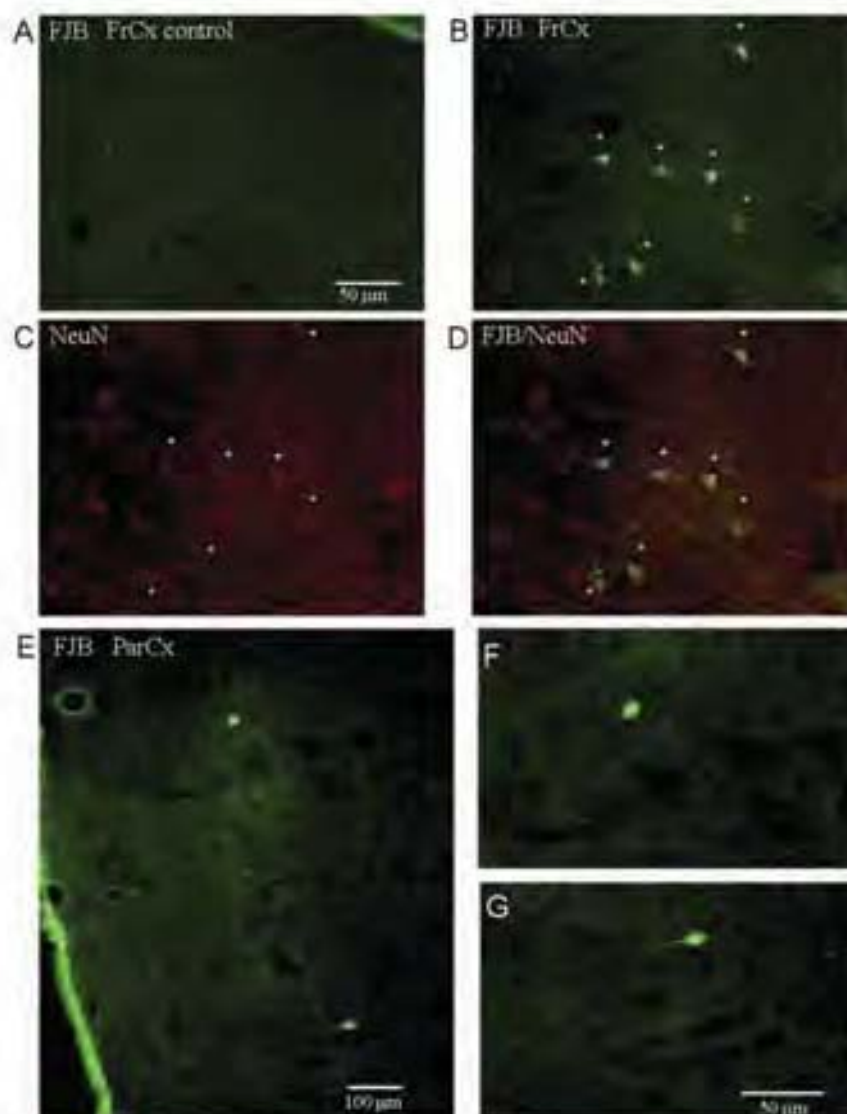


**Fig. 5.** Immunohistochemical analyses of NT-positive cells. Brain sections were obtained from control and hypoglycemic animals 21 h after glucose infusion. They were processed for immunohistochemistry as described in the methods section. NT-positive cells (green) are shown in the cingulate (A) and frontal (E) cortices of hypoglycemic animals. No NT-positive cells were found in sections from control animals (H). Cells were counterstained with Hoechst (blue) (D, I) and GFAP (red) (B, F). NT-positive cells show no immunoreactivity to GFAP (C, G).

The differential temporality observed in lipoperoxidation and NT results, suggests the production of different kinds of reactive-species. It has been shown that before hypoglycemic coma mitochondrial production of ROS, mainly superoxide is increased in brain (McGowan et al., 2006). Moreover, during moderate hypoglycemia the activity of Complex IV is reduced in brain, which might also promote ROS production (Bhard-

waj et al., 1998). By contrast, in our model increased NT formation was only observed after glucose administration, suggesting a correlation between peroxynitrite production and glucose reperfusion. Suh and co-workers have shown that the production of ROS after hypoglycemic coma is stimulated by glucose reperfusion, and that it is related to the activity of NADPH oxidase (Suh et al., 2007). Whether mito-





**Fig. 6.** Double labeling analysis for FJB and NeuN. Brain sections were obtained from control and hypoglycemic animals 21 h after glucose infusion. They were processed for NeuN immunohistochemistry (red) and were counterstained with FJB (green) as described in the methods section. FJB-positive cells were observed in the cortex (B) and they were immunoreactive to NeuN (D). No FJB-positive cells were observed in control animals (A). (B–D) shows brain sections from a hypoglycemic animal showing a short period of isoelectricity (5.5 min). (E–G) show representative sections from a hypoglycemic animal showing no isoelectricity.

chondria or increased activity of NADPH oxidase participate in ROS production in the present model, remains to be studied.

Oxidative stress occurs as a consequence of the imbalance between the production of reactive oxygen and nitrogen species and the cell capability to manage these toxic species. In homogenates of whole cerebral hemispheres, severe hypoglycemia (23 mg/dl) without coma induces changes in the activity of several antioxidant enzymes, while in the cerebellum superoxide dismutase activity is preserved (Singh et al.,

2004). This might contribute to the lack of oxidative damage observed in this cerebral region in the present study. In addition, it has been shown that the cerebellum is less prone to oxidative stress than the cortex (Sathiyasakumar et al., 2007), and that the basal activity of some antioxidant enzymes is higher in this brain region as compared to others (Sathiyasakumar et al., 2007; Hassoun et al., 2006). To date it is not known whether regional differences in the antioxidant machinery might help to explain the differential regional susceptibility of brain to hypoglycemic damage.

As a whole, these results suggests that transient hypoglycemia followed by glucose infusion, promotes a pro-oxidant ambient in vulnerable brain regions capable to modify lipids and proteins. Further studies are necessary to investigate the relationship between oxidative damage and cell death associated with non-coma hypoglycemia.

**Acknowledgments**—This work was supported by CONACyT 48845-Q grant to L. Malásku and 187312 CONACyT scholarship to M.L. Flores. The authors thank Mrs. Araceli Pastor and M. Gabriel Harqueles for their help in microscopy image analysis. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of M.L. Flores at the Universidad Nacional Autónoma de México.

## REFERENCES

- Akyl A, Kiyloglu N, Bektaşlıoğlu D, Güneş F, Yuzaklı Y (2003) Hemoislet hypoglycemia and cognitive decline: A case report. *Neuro Endocrinol Lett* 34:54–58.
- Avarez EO, Beatriz J, Rivas Y, Benzan A, Rieg P, De Nencia AF, Saravia F (2009) Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav Brain Res* 198:224–230.
- Auer RN (1986) Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 17:699–708.
- Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK (1985a) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 67:13–24.
- Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK (1985b) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol* 67:25–36.
- Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK (1984a) Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG bioelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 33:1090–1098.
- Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK (1984b) The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 64:177–181.
- Becker D, Ryan C (2000) Hypoglycemia: a complication of diabetes therapy in children. *Trends Endocrinol Metab* 11:198–202.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271:C1424–C1437.
- Bharthi SK, Sharma ML, Guler G, Chhakea A, Kaushik R, Sharma P, Kaur G (1995) Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Mol Chem Neuropathol* 34:157–166.
- Braeford MM (1975) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Carroll MF, Barga MR, Schade DS (2003) Severe hypoglycemia in adults. *Rev Endocr Metab Disord* 4:149–157.
- Cryer PE (2004) Diverse causes of hypoglycemia associated autonomic failure in diabetes. *N Engl J Med* 350:2272–2279.
- Cryer PE (2006) Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest* 116:1470–1473.
- Cryer PE (2007) Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J Clin Invest* 117:858–870.
- Dregler R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649–671.
- Ennis K, Tran PV, Seepikul ER, Rao R (2005) Postnatal age influences hypoglycemia induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res* 1234:119–126.
- Estévez-Sánchez AM, Morán T, Segovia J, Malásku L (2009) Glutamate toxicity in the striatum of the N63 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurosci Lett* 44:78–81.
- Glick MR, Jayatilaka E, Shah S, Rowan AJ, Herzigian Y (2000) CNS oxidative stress associated with kainic acid rat model of experimental epilepsy. *Epilepsy Res* 39:63–71.
- Greif JM, Dokost PH, Farnsworth JA (1978) Regional levels of glucose, amino acids, high energy phosphates, and cyclic nucleotides in the central nervous system during hypoglycemic stupor and behavioral recovery. *J Neurochem* 27:1043–1049.
- Gundersen V, Fossum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (2001) Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunocyto study. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:41–51.
- Hales ML, Hernández-Foreiro R, Medina-Campos ON, Morán T, Velázquez-Chavez J, Malásku L (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211:85–96.
- Halliday D (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1650.
- Hertz RJ, Wieloch T, Symon I, Siesjö BK (1984) Cerebral extracellular calcium activity in severe hypoglycemia: relation to extracellular potassium and energy state. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:187–193.
- Hesslein EA, Vothanel J, Holden B, Abushaban A (2006) The effects of nicotinic acid and vitamin E succinate on antioxidant enzymes activities and glutathione levels in different brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD. *J Toxicol Environ Health A* 69:381–393.
- Jones TW, Davis EA (2003) Hypoglycemia in children with type 1 diabetes: current issues and controversies. *Pediatr Diabetes* 4:140–150.
- Marcell I, Pótlós M, Lercsai D (2005) Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39:429–443.
- McGowan JE, Chen L, Gao D, Trush M, Wei C (2006) Increased mitochondrial reactive oxygen species production in newborn brain during hypoglycemia. *Neurosci Lett* 395:111–114.
- Nagab JA, Kulinskaya E, Lomas CL, Gamella ML (2005) Neurocognitive performance in children with type 1 diabetes—a meta-analysis. *J Pediatr Psychol* 34:271–282.
- Palocková J, Malhol P, Tjornová E, Krušák M, Rokytka R, Šlipák S, Orlovská J, Andel M (2003) Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res* 52:131–135.
- Roberts RD, Gieda YE, Krapman DS, Christianson TJH, Flanketz VJ, Bovee BF, Vella A, Rocca WA, Petersen RC (2008) Duration and severity of diabetes are associated with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 65:1066–1073.
- Rovet JF, Etlisch RM, Hoppe M (1987) Intellectual deficits associated with early onset of insulin-dependent diabetes mellitus in children. *Diabetes Care* 10:519–523.
- Ryan C, Vega A, Drash A (1985) Cognitive deficits in adolescents who developed diabetes early in life. *Pediatrics* 75:921–927.
- Sandberg M, Sällbom ST, Hagberg H (1986) Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47:175–184.
- Sathiyakumar KV, Swarna I, Rastogi PVB, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthil Kumaran B, Reddanna P (2007) Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res* 32:517–524.
- Singh P, Jain A, Kaur G (2004) Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem* 260:153–159.
- Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garner P, Matsunori Y, Ginn E, Liu J, Swanson RA (2003) Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 23:10681–10690.
- Suh SW, Garner P, Aoyama K, Chen Y, Swanson RA (2004) Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 16:538–545.

- Suh SW, Gum E, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117:310–318.
- Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoesler M, Brusa A, Yanari MA, Swanson RA (2008a) Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol* 64:654–663.
- Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Shelton CT, Chan PH, Swanson RA (2008b) Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1697–1706.
- Tkacz NC, Pan Y, Raghupathi R, Dams-Meynet AA, Levin BE (2005) Cortical neurojade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1645–1655.
- Welsh J (1984) Hypoglycemia induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683.

(Accepted 7 October 2009)



## 2. Papel de los cuerpos cetónicos en la prevención del daño oxidativo asociado a la hipoglucemia.

Como se mencionó en la introducción, los cuerpos cetónicos poseen propiedades neuroprotectoras. Estas propiedades se han asociado principalmente a su papel metabólico, aunque recientemente se ha sugerido que estos compuestos pueden prevenir el daño oxidativo (Mejía-Toiber y col, 2006; Kim y col, 2007). Dado que la hipoglucemia promueve un estado pro-oxidante que conlleva un aumento en los niveles de lipoperoxidación, quisimos evaluar si el BHB y el AcAc podrían prevenir este aumento. Para ello, utilizamos el D-BHB y el acetoacetato que son los cuerpos cetónicos que se incorporan al metabolismo y el L-BHB que es el isómero que carece de actividad metabólica.

### 2.1 Efecto de los cuerpos cetónicos sobre el daño oxidativo inducido por la hipoglucemia en el cerebro de la rata.

Los animales fueron sacrificados al perder el reflejo de enderezamiento, ya que como se mostró anteriormente en ese momento observamos el máximo aumento en los niveles de lipoperoxidación. En estos experimentos también analizamos varias regiones cerebrales. Como se muestra en la Figura 6, ambos isómeros del BHB previnieron el aumento en los niveles de lipoperoxidación de manera significativa tanto en la corteza (Fig. 6A), como en el estriado (Fig. 6B) de animales que recibieron una sola administración del BHB. Cuando los animales recibieron una inyección adicional de BHB, 30 min después de la primera, únicamente se observó una mayor disminución de la lipoperoxidación en el caso del L-BHB en el estriado (2 d en la Fig. 6). En el caso del D-BHB se observó el mismo efecto que con la administración de la dosis única. En la corteza cerebral la administración de dos dosis de L-BHB o D-BHB redujo los niveles de lipoperoxidación en la misma magnitud (Fig. 6 A), aunque el efecto de la dosis adicional de D-BHB

no resultó significativo. Los niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos alcanzados con nuestro protocolo de administración fueron cuantificados por espectrofluorimetría y están incluidos en la tabla 2 del artículo 4. Como puede observarse estos niveles incrementaron alrededor de 10 veces en animales intactos mientras que en animales hipoglucémicos se detectaron niveles 6 veces mayores 10 min después de su administración.

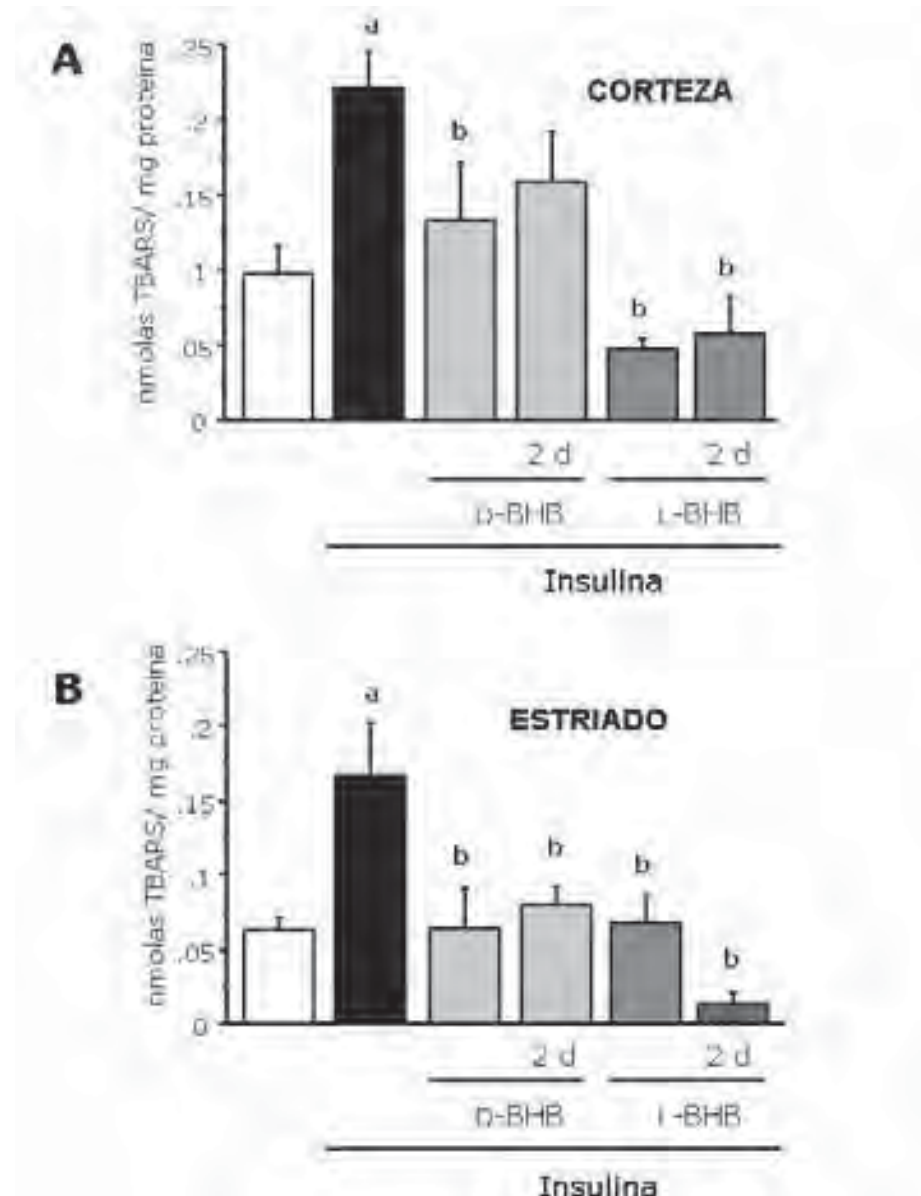


Figura 6. Efecto del BHB sobre los niveles de lipoperoxidación en condiciones de hipoglucemia. Los animales fueron tratados con insulina y recibieron una inyección de D-BHB o L-BHB (500 mg/Kg) 1 h después. Algunos animales fueron tratados con 2 dosis de BHB (2 d). Los animales fueron sacrificados cuando presentaron la PRE. La corteza (A) y el estradiol (B) fueron extraídos para obtener los homogenados con los que se llevó a cabo la

determinación del TBARS. (**a**=  $p < 0.05$  vs animales control; **b**=  $p < 0.05$  vs animales hipoglucémicos sacrificados en la PRE).

Por su parte, el AcAc no redujo los niveles de lipoperoxidación en la corteza (en nmolas de TBARS/mg proteína: control=  $0.007 \pm 0.002$ ; ratas hipoglucémicas=  $0.051 \pm 0.015$ ; ratas hipoglucémicas tratadas con AcAc=  $0.077 \pm 0.025$ .  $n=3-6$ ) a pesar que sus niveles sanguíneos aumentaron significativamente, de manera similar a los niveles de BHB (Tabla 2, art. 4).

En el caso del hipocampo se encontró que ambos isómeros del BHB previenen eficientemente el aumento en la lipoperoxidación, y el isómero D, también fue capaz de reducir el contenido de aldehídos de 4-HNE presentes en las proteínas, mientras que el isómero L tuvo un efecto mucho menor. Estos resultados fueron incluidos en el artículo 4 (Fig. 7) que se incluye a continuación.

#### **Artículo 4**

“Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions.”

Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L.

Exp. Neurol. 2008

Vol. 211 No 1: 85-96.



## Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions

Maria L. Haces<sup>a,1</sup>, Karla Hernández-Fonseca<sup>a,1</sup>, Omar N. Medina-Campos<sup>b</sup>, Teresa Montiel<sup>a</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>b</sup>, Lourdes Massieu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 04510, Apartado Postal 70-251, México D.F., México

<sup>b</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Edificio F Segundo Piso, Laboratorio 209, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 04510, México D.F., México

Received 1 September 2007; revised 10 December 2007; accepted 29 December 2007

Available online 26 January 2008

### Abstract

Ketone bodies play a key role in mammalian energy metabolism during the suckling period. Normally ketone bodies' blood concentration during adulthood is very low, although it can rise during starvation, an exogenous infusion or a ketogenic diet. Whenever ketone bodies' levels increase, their oxidation in the brain rises. For this reason they have been used as protective molecules against refractory epilepsy and in experimental models of ischemia and excitotoxicity. The mechanisms underlying the protective effect of these compounds are not completely understood. Here, we studied a possible antioxidant capacity of ketone bodies and whether it contributes to the protection against oxidative damage induced during hypoglycemia. We report for the first time the scavenging capacity of the ketone bodies, acetoacetate (AcAc) and both the physiological and non-physiological isomers of  $\beta$ -hydroxybutyrate (*D*- and *L*-BHB, respectively), for diverse reactive oxygen species (ROS). Hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) were effectively scavenged by *D*- and *L*-BHB. In addition, the three ketone bodies were able to reduce cell death and ROS production induced by the glycolysis inhibitor, iodoacetate (IOA), while only *D*-BHB and AcAc prevented neuronal ATP decline. Finally, in an *in vivo* model of insulin-induced hypoglycemia, the administration of *D*- or *L*-BHB, but not of AcAc, was able to prevent the hypoglycemia-induced increase in lipid peroxidation in the rat hippocampus. Our data suggest that the antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage in *in vitro* and *in vivo* models associated with free radical production and energy impairment.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Iodoacetate; Hypoglycemia; Oxidative stress; Acetoacetate;  $\beta$ -hydroxybutyrate; Brain; Antioxidant capacity; Scavenger

### Introduction

Ketone bodies,  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and acetoacetate (AcAc) constitute the main brain energy substrates during the suckling period. Upon maturation, as diet changes, blood levels of ketone bodies decrease and the adult brain becomes more dependent on glucose as the main energy fuel (for review see Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1997). However, the capacity to transport and use ketone bodies as alternative energy

substrates is preserved in the adult brain (Hawkins et al., 1971). Whenever ketone bodies' concentration increases, such as in prolonged starvation, an exogenous infusion or as a result of a ketogenic diet, their oxidation rate in the brain rises (Owen et al., 1967; Hawkins and Bichayek, 1979; Yudkoff et al., 2001). These strategies have been conducted to evaluate the potential protective effect of these compounds against diverse neurotoxic insults (reviewed by Smith et al., 2005). The ketogenic diet has been used effectively in the treatment of refractory epilepsy (Nordli et al., 2001; Yudkoff et al., 2001), and recently against neurotoxicity induced during hypoglycemia in young rats (Yamada et al., 2005). In addition, ketotic infusion prevents neuronal death associated with hypoxia, ischemia (Suzuki et al., 2001, 2002; Masuda et al., 2005), excitotoxicity

\* Corresponding author. Fax: +52 55 56 22 56 07.

E-mail address: [massieu@ic-unam.mx](mailto:massieu@ic-unam.mx) (L. Massieu).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



induced during metabolic inhibition (García and Massieu, 2001; Massieu et al., 2003), and in models of Parkinson's and Alzheimer's diseases (Kashiwaya et al., 2000; Tien et al., 2003). In all these studies either AcAc or D-(+)-hydroxybutyrate (D-BHB), the physiological isomer of BHB, was used and their neuroprotective effect attributed mainly to their incorporation into the Krebs cycle favoring ATP supply, leaving unexplored other neuroprotective mechanisms. We have recently reported that administration of D-BHB reduces the levels of lipoperoxidation and neuronal damage induced by glutamate in the rat striatum (Mejía-Toñer et al., 2006), and in cultured neurons AcAc has been shown to decrease glutamate-mediated production of reactive oxygen species (ROS) and cell death (Noh et al., 2006), suggesting an antioxidant effect of ketone bodies.

Neuronal damage induced during conditions of energy failure, such as ischemia and glycolysis inhibition involves oxidative damage (Love, 1999; Adibhatla and Hatcher, 2006; Tomaszewski et al., 2005; Uto et al., 1995; Rego et al., 1999; Malcolm et al., 2000), and ketone bodies can prevent neuronal death induced under these circumstances (Suzuki et al., 2001, 2002; Massieu et al., 2003; Izumi et al., 1998; Yamada et al., 2005). However, the contribution of a potential antioxidant effect to neuroprotection exerted by ketone bodies has not been elucidated. Recently, ROS production has been implicated in hypoglycemic neuronal death (Suh et al., 2003, 2007), and peroxidation of brain lipids has been observed during insulin-induced hypoglycemia (Pitocková et al., 2003; Ballesteros et al., 2003; Singh et al., 2004). The present study was conducted to investigate the scavenging capacity of ketone bodies against various ROS and its contribution to the prevention of oxidative damage. We performed the study in two experimental conditions known to involve oxidative damage and energy failure: *in vivo* insulin-induced hypoglycemia and *in vitro* glycolysis inhibition by iodoacetate (IOA), an inhibitor of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). We tested the effect of AcAc and of D- and L-BHB (the physiological and non-physiological isomers of BHB, respectively) on lipid peroxidation in the hippocampus after insulin administration. We also studied the effect of ketone bodies against ROS production and neuronal death in cultured hippocampal neurons exposed to IOA.

## Materials and methods

Several concentrations of D-BHB, L-BHB, and AcAc were used throughout this study (BHB sodium salt and AcAc lithium salt; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### *In vivo* determination of ROS scavenging capacity of ketone bodies

#### Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) scavenging assay

A 50  $\mu$ M solution of  $H_2O_2$  was mixed with different concentrations of either ketone body (1:1 v/v) and incubated for 4 h at room temperature. Immediately after,  $H_2O_2$  was measured as described previously (Medina-Campos et al., 2007) using the FOX reagent (xylenol orange, ammonium ferrous sulfate and  $H_2SO_4$ ). The concentration of  $H_2O_2$  was recorded at 560 nm.

Sodium pyruvate was used as a reference compound showing an  $IC_{50}=1.466\pm 0.062$  mM.

#### Hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) scavenging assay

The ability of either ketone body to scavenge  $\cdot OH$  was monitored in the  $Fe^{2+}$ -EDTA- $H_2O_2$ -deoxyribose system (Florian-Sánchez et al., 2006). The extent of deoxyribose degradation by the  $\cdot OH$  formed was measured directly in the aqueous phase by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay at 532 nm. Mannitol was used as a reference compound showing an  $IC_{50}=3.30\pm 0.19$  mM.

#### Hypochlorous acid (HOCl) scavenging assay

The HOCl scavenging capacity of ketone bodies was tested as previously described (Medina-Campos et al., 2007). This method is based on the inhibition of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) oxidation to 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) induced by HOCl. DTNB concentration was measured at 412 nm. Liponic acid was used as a reference compound showing an  $IC_{50}=0.858\pm 0.085$  mM.

#### Peroxonitrite (ONOO $^-$ ) scavenging assay

The ONOO $^-$  used in the assay was synthesized as previously described (Medina-Campos et al., 2007) mixing an acidic solution of  $H_2O_2$  with  $KNO_2$ . Concentrations of ONOO $^-$  were determined before each experiment at 302 nm using a molar extinction coefficient of  $1670 M^{-1} cm^{-1}$ . The ONOO $^-$  scavenging capacity of ketone bodies was performed spectrophotometrically at 500 nm according to a previously described method (Pedraza-Chaverrí et al., 2007) monitoring the oxidation of dihydrorhodamine-123 (DHR 123) to rhodamine. Penicillamine was used as a reference compound showing an  $IC_{50}=0.0306\pm 0.002$  mM.

#### Singlet oxygen ( $^1O_2$ ) scavenging assay

The production of  $^1O_2$  by sodium hypochlorite and  $H_2O_2$  was determined using a spectrophotometric method (Medina-Campos et al., 2007). The  $^1O_2$  scavenging assay is based on *N,N*-dimethyl-*p*-nitrosoaniline (DMNA) bleaching in the presence of  $^1O_2$ . The extent of  $^1O_2$  production and the effect of the ketone bodies on it were determined by measuring the decrease in the absorbance of DMNA at 440 nm. Liponic acid was used as a reference compound showing an  $IC_{50}=3.87\pm 0.23$  mM.

#### Superoxide radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) scavenging assay

The xanthine-xanthine oxidase system was used to determine the  $O_2^{\cdot -}$  scavenging capacity of ketone bodies (Medina-Campos et al., 2007). The  $O_2^{\cdot -}$  production and xanthine oxidase activity were measured as the reduction of nitro-blue tetrazolium (NBT) (at 560 nm) and uric acid production (at 295 nm), monitored every minute during a 3-minute period. Vitamin C was used as a reference compound with an  $IC_{50}=0.0187\pm 0.0021$  mM.

#### $IC_{50}$ calculation

The ROS scavenging capability of ketone bodies was expressed as 50% of the inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) as previously



described (Floriano-Sánchez et al., 2006).  $IC_{50}$  values denote the concentration of D-BHB, L-BHB or AcAc (mM) required for a 50% decrease in (a) NBT reduction (for  $O_2^{\cdot -}$ ), (b)  $H_2O_2$  concentration (for  $H_2O_2$ ), (c) TBARS production (for  $\cdot OH$ ), (d) the bleaching of DMNA (for  $\cdot O_2$ ), (e) TNB oxidation (for  $HOCl$ ), and (f) DHR 123 oxidation (for  $ONOO^{\cdot -}$ ), relative to the tube without sample.  $IC_{50}$  was calculated by the least square method. The lower the  $IC_{50}$  value the higher the scavenging capacity of the compound.

#### Indolacetic acid-induced neuronal damage

All animals used throughout this study were handled according to the Rules for Research in Health Matters (México) and with the local animal care committee approval. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Wistar rats were obtained from the local animal house at Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Rats were housed under controlled conditions of temperature and light (12 h cycle) with ad libitum access to food and water, unless otherwise stated.

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from Wistar rats embryos of 17–18 days of gestation as previously described (Hernández-Fonseca and Masera, 2005). Briefly, after dissection 10–12 hippocampi were chopped into 300  $\mu m$  cubes, incubated in 0.25% trypsin solution, and dispersed by trituration in a DNase and soybean trypsin inhibitor containing solution (0.08% and 0.52%, respectively). Cells were suspended in Neurobasal culture medium (Gibco/Life Technologies, Rockville, MD, USA) supplemented with B27 (Mimas AO; Gibco/Life Technologies), 0.5 mM L-glutamine, 20  $\mu g/ml$  gentamicin, and 0.2 mM glutamate, and plated at a density of  $260\text{--}290 \times 10^3/cm^2$  ( $3.5 \times 10^6$  cells/ml/well) in Costar 24-well plates (Cambridge, MA, USA), precoated with poly-L-lysine (5  $\mu g/ml$ ). Cells were cultured for 8 days *in vitro* at 37 °C in a humidified 5%  $CO_2/95\%$  air atmosphere. Glucose (5 mM) and cytosine arabinoside (10  $\mu M$ ) were added to cultures 4 days after plating. Neuronal population in these cultures was 95% as determined by immunocytochemistry against microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuronal and astrocytes cell markers, respectively (not shown).

#### Drug exposure and viability assays

Neuronal cultures were exposed to IOA (Sigma-Aldrich) during 30 min, at 50 or 100  $\mu M$  concentrations in Ringer Krebs medium containing (in mM): NaCl 154; KCl 5.6;  $CaCl_2$  2.3;  $KH_2PO_4$  1.2; HEPES 5.0;  $NaHCO_3$  3.6 and glucose 5.6, in the presence or absence of L-BHB, D-BHB or AcAc at different concentrations. After this period, medium was changed for conditioned medium containing the ketone bodies and neuronal survival was monitored at 24 h using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) reduction assay (Mosmann, 1983; Bezridge and Taz, 1993) as previously described (Hernández-Fonseca and Masera, 2005). Results are expressed as percent of control. The effect of IOA (100  $\mu M$ ) and ketone bodies on cell survival was corroborated by the live/dead kit (Invitrogen/Molecular Probes; Carlsbad,

CA, USA) as previously described (Guzán and Masera, 2001). Briefly, cells were grown on coverslips and exposed for 30 min to IOA in the presence or absence of the ketone bodies, 4 h later cells were incubated for 10 min with the fluorescent markers calcein-AM (green) and ethidium homodimer (red) for live and dead cells, respectively. Around 200 cells were counted per condition in ten different fields, randomly selected. The number of living neurons is expressed as the percentage of green-fluorescent cells (positive to calcein-AM) relative to the total number of cells (red- and green-fluorescent) in at least 3 independent experiments.

#### ATP determination

ATP levels were determined 4 h after IOA (50, 100  $\mu M$ ) exposure in the presence or absence of D-BHB, L-BHB or AcAc. ATP determinations were performed using previously described methodology (Masera et al., 2003). Briefly, cells were washed twice with pre-warmed Locke's solution and lysed by incubation in 125  $\mu l$  somatic cell ATP releasing agent (Sigma). Lysate (15  $\mu l$ ) were diluted in 85  $\mu l$  distilled water and placed in polyethylene tubes in a luminometer. The luminometer injected a 400  $\mu l$  volume of luciferin-luciferase reaction mixture (Invitrogen/Molecular Probes). The luminometer records chemiluminescence values in millivolts and ATP concentrations were calculated from readings obtained from an ATP standard curve (6.5–250 pmol). Aliquots of cell homogenates were kept for protein determination (Bradford, 1976), and data are expressed as pmol ATP/ $\mu g$  protein.

#### ROS determination

The presence of ROS was determined by means of oxidative-sensitive fluorescent markers. For this purpose dihydroethidium (HE; Invitrogen/Molecular Probes) and 5-(and-6) carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA; Invitrogen/Molecular Probes) were used. HE is oxidized by  $O_2^{\cdot -}$  to 2-hydroxyethidium (OH-Et) and to ethidium (Et) by non-superoxide-dependent cellular processes, such as  $H_2O_2$  through the activity of non-specific peroxidases, oxidases and cytochromes or by other ROS, such as  $ONOO^{\cdot -}$  and  $\cdot OH$  (Zhuo et al., 2007; Gomes et al., 2005; Robinson et al., 2006). Et binds within the cells' DNA, staining the nucleus with a bright-red fluorescence (Hradkovic et al., 1996). Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA is deacetylated, oxidized by ROS and converted to the fluorescent compound 5-(and-6) carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (carboxy-DCF), that stains the cell cytoplasm with a bright-green fluorescence (Huckenberg et al., 1993). Cells plated on coverslips were incubated with IOA and ketone bodies as previously described. 4 h later cells were exposed for 20 min to 3.2  $\mu M$  of HE and 5  $\mu M$  of carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA in Ringer Krebs medium. Cells were examined under an epifluorescence microscope equipped with argon laser (488 nm excitation and 535 nm emission for Et; 488 nm excitation and 530 nm emission for carboxy-DCF). Positive cells to both fluorescent markers were counted in ten different fields per condition in at least 4 independent experiments. The total number of cells was counted from bright-field images (~200 cells per coverslip) and results are expressed



as the percent of cells positive to each one of the oxidative-sensitive fluorescent markers.

#### *Insulin-induced in vivo hypoglycemia*

In order to induce a hypoglycemic condition, male Wistar rats (320–380 g) were fasted overnight and received an i.p. injection of 30 U bovine insulin (Sigma). Blood glucose concentration was measured with a glucometer (Abbott Lab, Bedford, MA, USA) before and every hour after insulin administration. Animals received a single i.p. injection of 500 mg/kg (250 mg/ml) of either D-BHB, L-BHB, or AcAc 1 h after insulin treatment. The final concentration of the solution was 1.98 mM for D-BHB and L-BHB and 2.3 mM for AcAc. Animals received between 0.65 and 0.76 ml of ketone body solution. We have previously shown that the i.p. administration of similar doses of AcAc or pyruvate are able to prevent glutamate-induced neuronal damage in the hippocampus *in vivo* (Massini et al., 2001, 2003). In a different group of animals a second administration of ketone body was given 30 min after the first one. Control animals received the vehicle solution (phosphate buffer). Approximately 2 h after insulin administration, when the rats lost the righting reflex and were close to the hypoglycemic coma, they were killed and their hippocampi dissected for lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) protein adducts determinations. We have previously determined that the loss of the righting reflex occurs minutes before the appearance of the isoelectric period as assessed electroencephalographically (not shown).

#### *TBARS assay*

We assessed the production of TBARS, which are products of lipid peroxidation, in tissue homogenates according to Gluck et al. (2000). Briefly, hippocampi were homogenized in 0.5 ml of 1.15% KCl/0.4 mM sodium azide and incubated at 37 °C for 15 min. Then, 20% trichloroacetic acid was added and samples were centrifuged at 14,000 ×g for 10 min. Supernatants were collected and mixed with an equal volume of 0.75% fluorobarbituric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and samples were incubated at 50 °C for 20 min. Optical density (OD) was read at 532 nm and TBARS levels were calculated using a standard curve of malondialdehyde bis-dimethyl acetal. Data are expressed as nmol of TBARS/mg protein. The protein concentration was calculated with 20 µl of the homogenates according to Bradford (1976) using albumin as standard.

#### *Determinations of HNE-protein adducts*

HNE adducts were analyzed by Western blot. For this purpose the hippocampi were homogenized in phosphate buffer containing 1% Triton, 1 mM EDTA and 0.2% of a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and stored at –70 °C until used. After determination of protein concentration, 50 µg per sample were resolved in 7.5% acrylamide gel electrophoresis and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked and then incu-

bated overnight with either HNE (1:1500, Alpha Diagnostic Intl., San Antonio, TX, USA) or  $\alpha$ -actin (1:2500, Sigma) antibodies. Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:4000, Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) or anti-mouse IgG (1:4000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) were used as secondary antibodies, respectively. Chemiluminescence reaction using the ECL kit (Amersham Bioscience) was carried out for 1 min followed by exposure to Kodak Minolta medical film (Tokyo, Japan). For the densitometric analysis of HNE-protein adducts, bands with a molecular weight between 60 and 150 kDa were considered and results are expressed as OD HNE/OD  $\alpha$ -actin.

#### *Determination of ketone bodies' plasma levels*

D-BHB and AcAc levels were determined by enzymatic assays in plasma of control and hypoglycemic rats treated with each ketone body. For this purpose, blood was collected in heparinized tubes, 10 min after administration of the ketone body or at the time the animals lost their righting reflex (~2 h after insulin administration), and left on ice until an equal volume of 10% perchloric acid was added. Samples were centrifuged at 3400 ×g for 10 min and the supernatant collected and stored at –20 °C until measured. Ketone body levels were determined according to Williamson and Mellanby (1965) and Mellanby and Williamson (1965), as previously reported (Massini et al., 2003). Plasma levels of D-BHB and AcAc were also examined in a control group non-treated with insulin, 10 min after ketone body i.p. administration. In order to discard a possible hepatic conversion of L-BHB to D-BHB, as suggested previously (Lincoln et al., 1987), D-BHB plasma levels were determined in L-BHB treated animals.

#### *Statistical analyses*

All data are expressed as means ± SEM and were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least multiple comparison test.

## Results

#### *In vitro ROS scavenging capacity of ketone bodies*

*In vitro* experiments were carried out to determine the ROS scavenging capacity of ketone bodies. For this purpose, different concentrations of each ketone body were used and the maximal concentration tested in each assay is shown in Table 1. Results show that both isomers of BHB were able to effectively neutralize  $\cdot$ OH, showing L-BHB a lower IC<sub>50</sub> value relative to that shown by D-BHB. The IC<sub>50</sub> values of L-BHB and D-BHB were similar to that of mannitol (3.30 ± 0.19 mM), which was used as reference compound (Fig. 1A). The  $\cdot$ OH scavenging capacity of AcAc was much lower (Fig. 1A). Both BHB isomers were ineffective for all the other ROS tested: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>, while AcAc was also capable of scavenging <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, HOCl, and ONOO<sup>-</sup> (Fig. 1B), although to a lesser extent (Table 1 and Fig. 1B).

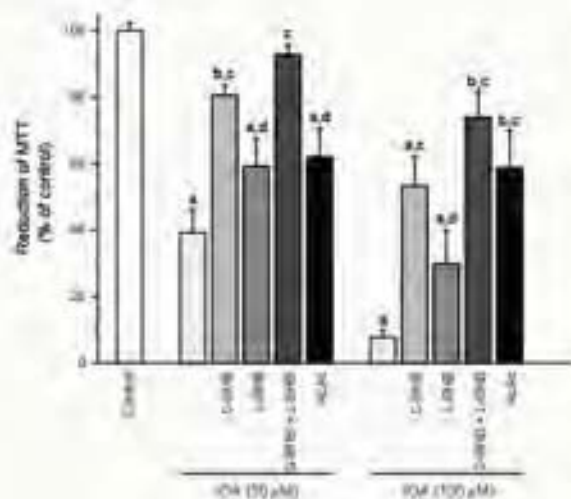
**Table 1**  
Scavenging capacity of D-BHB, L-BHB and AcAc for various ROS

ROS	Maximal concentration tested (mM)			Scavenging capacity	IC <sub>50</sub> (mM)		
	D-BHB	L-BHB	AcAc		D-BHB	L-BHB	AcAc
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75	20	40	None	–	–	–
•OH	15	34	60	All	3.2±0.41	2±0.47	51.3±5.07
HOCl	150	40	80	AcAc	–	–	66.8±0.71
ONOO	150	40	80	AcAc	–	–	49.0±2.94
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	75	20	40	AcAc	–	–	20.4±3.8
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	150	20	80	None	–	–	–

The radical scavenging capacity of ketone bodies was determined by *in vitro* assays. Data represent mean±SEM from 4 independent experiments.

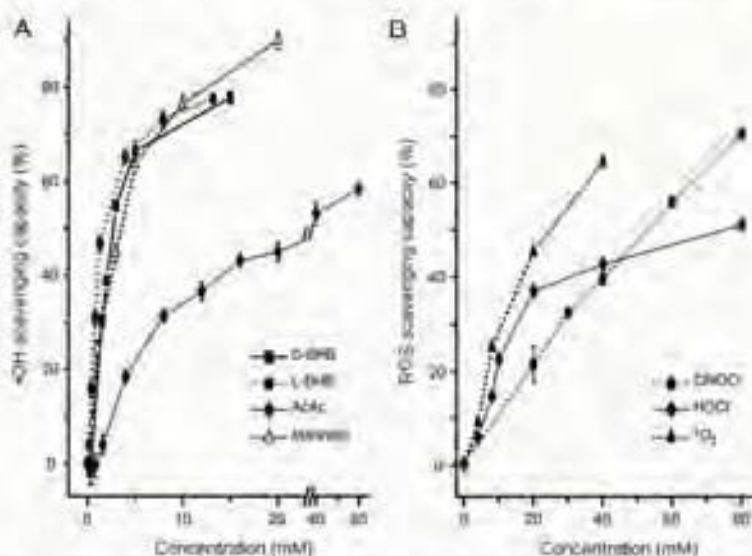
### Effect of ketone bodies on cell viability

To test the neuroprotective effect of these compounds we used an *in vitro* pharmacological model of hypoglycemia, exposing cultured hippocampal neurons to the glycolysis inhibitor IOA in the presence or absence of 10 mM of ketone bodies. Two concentrations of IOA (50 and 100 μM) were used in order to mimic moderate and severe hypoglycemic conditions, respectively, and cell viability was assessed 24 h after IOA exposure. As shown in Fig. 2, both concentrations of IOA caused substantial neuronal death. Cell survival was reduced in 60.7 and 92.2% after the exposure to 50 and 100 μM IOA, respectively. The non-physiological isomer of BHB, L-BHB, and AcAc were similarly effective in preventing neuronal death induced during moderate glycolysis inhibition, restoring cell viability to 59.1 and 62%, respectively, while in the presence of the physiological isomer D-BHB, 80.4% of the neuronal population was still viable. Co-incubation with both isomers of BHB prevented completely IOA-induced cell death restoring MTT



**Fig. 2.** Protective effect of ketone bodies against neuronal damage induced by IOA evaluated by the MTT reduction assay 24 h later. Cells were exposed to IOA for 30 min either alone or in the presence of the ketone bodies (10 mM). Ringer Krebs was replaced by culture media containing D-BHB, L-BHB, AcAc or D-BHB+L-BHB until viability was determined. Data are mean±SEM from 4 to 7 independent experiments, *a*  $p < 0.001$ , *b*  $p < 0.02$  vs control cultures, *c*  $p < 0.001$ , and *d*  $p < 0.05$  vs IOA-treated cultures.

reduction to control levels. In cultures treated with 100 μM IOA, L-BHB showed a significant protective effect ( $p < 0.030$  vs IOA-treated) but D-BHB and AcAc were more effective ( $p < 0.002$  for D-BHB and  $p < 0.003$  for AcAc vs IOA-treated). Co-incubation with both isomers of BHB showed better neuroprotection relative to that shown by L-BHB, and no significant difference was observed between the effects of D-BHB and D-BHB+L-BHB. The protective effect of ketone bodies, against



**Fig. 1.** ROS scavenging capacity of ketone bodies. (A) •OH scavenging capacity of ketone bodies. Mannitol was used as a reference compound. (B) ROS scavenging capacity of AcAc. IC<sub>50</sub> values were calculated from both curves and are depicted in Table 1. Data represent the mean±SEM of at least 4 independent experiments. In some points, the SEM values were too small that the SEM bars are not visible.



100  $\mu$ M IOA, was maintained even if their concentration was lowered to 5 and 2.5 mM (data not shown). At these concentrations ketone bodies showed no direct effect on MTT reduction in control conditions (in OD: control =  $0.215 \pm 0.003$ ; D-BHB(10 mM) =  $0.198 \pm 0.003$ ; L-BHB(10 mM) =  $0.194 \pm 0.002$ ; AcAc(10 mM) =  $0.225 \pm 0.002$ ,  $n=4$ ). Concentrations of 20 and 30 mM of AcAc, which are close to its  $IC_{50}$  to scavenge  $^{\circ}OH$  anions were also tested, however they showed no protection against IOA-induced neuronal death and were even toxic for control cultures reducing cell viability to  $51.05 \pm 5.88$  and  $38.15 \pm 4.96\%$ , respectively ( $n=4$  independent experiments).

Cell viability was also evaluated using fluorescent markers for living and dead cells 4 h after the exposure to 100  $\mu$ M IOA. Dead cells incorporate Et into DNA and nuclei appear red-fluorescent, while living cells incorporate the permeable fluorescent dye, calcein, and appear green-fluorescent. As shown in Fig. 3, control cultures show numerous living cells, while 4 h after IOA exposure the number of red cells notably increases with a concomitant reduction in the number of green cells. In agreement with MTT reduction data, cultures exposed to IOA plus

D-BHB, L-BHB or AcAc (10 mM) showed a significant higher number of living green-fluorescent cells relative to the IOA condition. Similar results were obtained when cells were incubated with 5 mM of each ketone body (data not shown).

#### Effect of ketone bodies on ATP levels

To assess the possible metabolic effect of each one of the ketone bodies, we evaluated the contribution of L-BHB, D-BHB or AcAc to the restoration of ATP levels during IOA exposure. Both moderate and severe glycolytic inhibition significantly reduced ATP levels. As expected, D-BHB and AcAc effectively prevented the decrease in ATP in both conditions restoring ATP levels to control values (Fig. 4). In contrast, L-BHB did not show any effect on IOA-induced decrease in ATP concentration.

#### Effect of ketone bodies on ROS levels

The effect of ketone bodies on the presence of intracellular ROS was tested. For this purpose, cultures were treated with

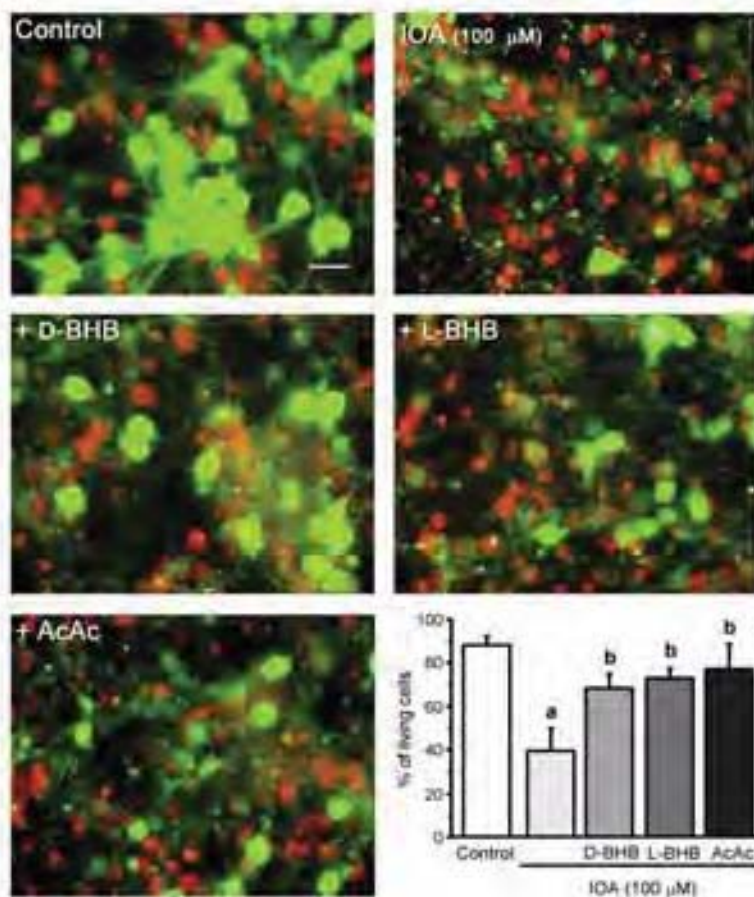


Fig. 3. The protective effect of 10 mM D-BHB, L-BHB and AcAc against neuronal damage induced by 30 min exposure to 100  $\mu$ M IOA evaluated 4 h later by live/dead kit. Living cells incorporate calcein and appear green, while the nuclei in dead cells is Et-labeled due to Et incorporation into DNA. Scale bar = 20  $\mu$ m. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least 4 independent experiments. Quantification of living cells in 4 independent experiments is shown.  $a, p < 0.02$  vs control cultures, and  $b, p < 0.03$  vs IOA-treated cultures.



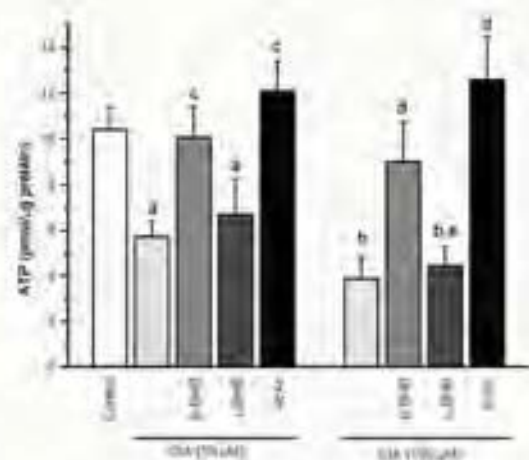


Fig. 4. Changes in ATP levels induced by 30 min exposure to IOA (50 or 100  $\mu$ M) in cultured hippocampal cells as evaluated 4 h after the exposure, and effect of ketone bodies (10  $\mu$ M) treatment. Data are means  $\pm$  SEM of 3–8 independent experiments. ATP levels were determined by the luciferin-luciferase assay.  $a$   $p < 0.01$ ;  $b$   $p < 0.001$  vs control cultures;  $c$   $p < 0.01$  vs 50  $\mu$ M IOA-treated cultures;  $d$   $p < 0.003$  vs 100  $\mu$ M IOA-treated cultures; and  $e$   $p < 0.05$  vs 100  $\mu$ M IOA + D-BHB-treated cultures.

either concentration of IOA in the presence or absence of ketone bodies, and the presence of ROS was monitored 4 h later by means of the fluorescent dyes HE and carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA. After oxidation of HE to Et it concentrates in the cell nucleus giving a red-bright fluorescence, while oxidation of carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA to carboxy-DCF leads to green-fluorescent cells. As shown in Fig. 5A, cultures treated with 50  $\mu$ M IOA showed a significant increase in the number of positive cells to both dyes (50.2% for Et and 38.2% for carboxy-DCF). The number of positive cells was significantly reduced, although not completely, in the presence of the three ketone bodies. After exposure to 100  $\mu$ M IOA, ROS production was significantly enhanced since the number of cells positive to Et and carboxy-DCF

increased up to 76.5% and 60.4%, respectively. Even in these conditions, ketone bodies reduced the number of cells positive to both markers (Et: 29.5–33.5%; carboxy-DCF: 24.5–27.8%) (Fig. 5B). A substantial effect of ketone bodies was observed during severe glycolysis inhibition, but a significant number of positive cells still remained. A representative experiment of cultures treated with 100  $\mu$ M IOA is shown in Fig. 6. The same microscopic field is observed in the three panels. Bright-field micrographs (left panel) show that neuronal cultures are severely affected after IOA exposure, neurons appear swollen with condensed nucleus (arrowheads), while the cytoplasm of many cells is no longer visible with only debris remaining. It can be observed, in the middle and right panels, that the number of positive cells to both ROS markers is markedly increased after IOA exposure. Some of the swollen cells were positive to both fluorescent markers (arrows). Control cultures show normal appearing neurons and are negative to both markers. Treatment with ketone bodies prevented cell swelling particularly D-BHB, and reduced the number of positive cells to Et and carboxy-DCF.

#### *In vivo* effect of ketone bodies on oxidative damage during hypoglycemia

In order to study the antioxidant action of ketone bodies in an *in vivo* model, an i.p. dose of 500 mg/kg of either D-BHB, L-BHB or AcAc was administered 1 h after inducing a hypoglycemic state through an insulin injection, and levels of lipoperoxidation in the rat hippocampus were evaluated. As shown in Fig. 7A, lipoperoxidation levels were 2-fold increased in the hippocampus of hypoglycemic animals as compared to control rats. D-BHB or L-BHB treatment prevented the increase in lipoperoxidation observed in the hypoglycemic animals (Fig. 7A). A similar effect was obtained in animals receiving two doses (the first 1 h and the second 1.5 h after insulin injection) of either isomer of BHB (in pmol TBARS/mg protein; control =  $0.091 \pm 0.012$ ; hypoglycemic group =  $0.183 \pm 0.074$ ; D-BHB-treated =  $0.103 \pm 0.019$ ; L-BHB-

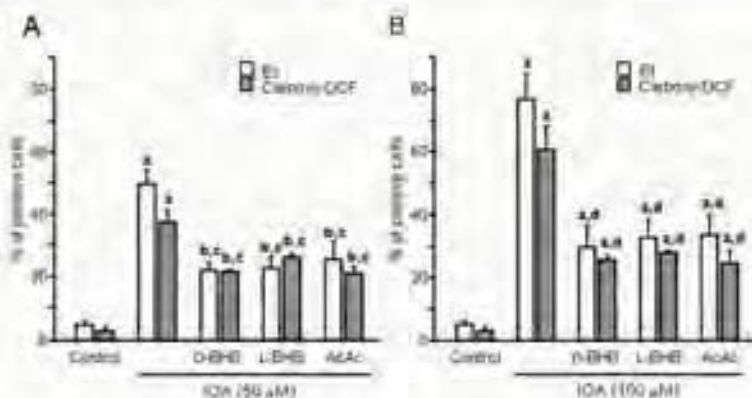


Fig. 5. Effect of ketone bodies on ROS levels induced during IOA treatment. White and gray bars represent the percent of cells positive to Et ( $O_2^{\cdot -}$ ) or to carboxy-DCF, respectively. Cultures were exposed to IOA (50  $\mu$ M (A) or 100  $\mu$ M (B)) in Ringer Krebs medium for 30 min in the presence or absence of D-BHB, L-BHB and AcAc (10  $\mu$ M). Ringer Krebs was removed and replaced by conditioned media containing the ketone bodies until fluorescent markers were added 4 h later. Ten fields per condition were analyzed (at least 3 independent experiments). Data are expressed as means  $\pm$  SEM.  $a$   $p < 0.001$ ;  $b$   $p < 0.05$  vs control values;  $c$   $p < 0.05$  vs cultures treated with IOA 50  $\mu$ M; and  $d$   $p < 0.0001$  vs cultures treated with IOA 100  $\mu$ M.

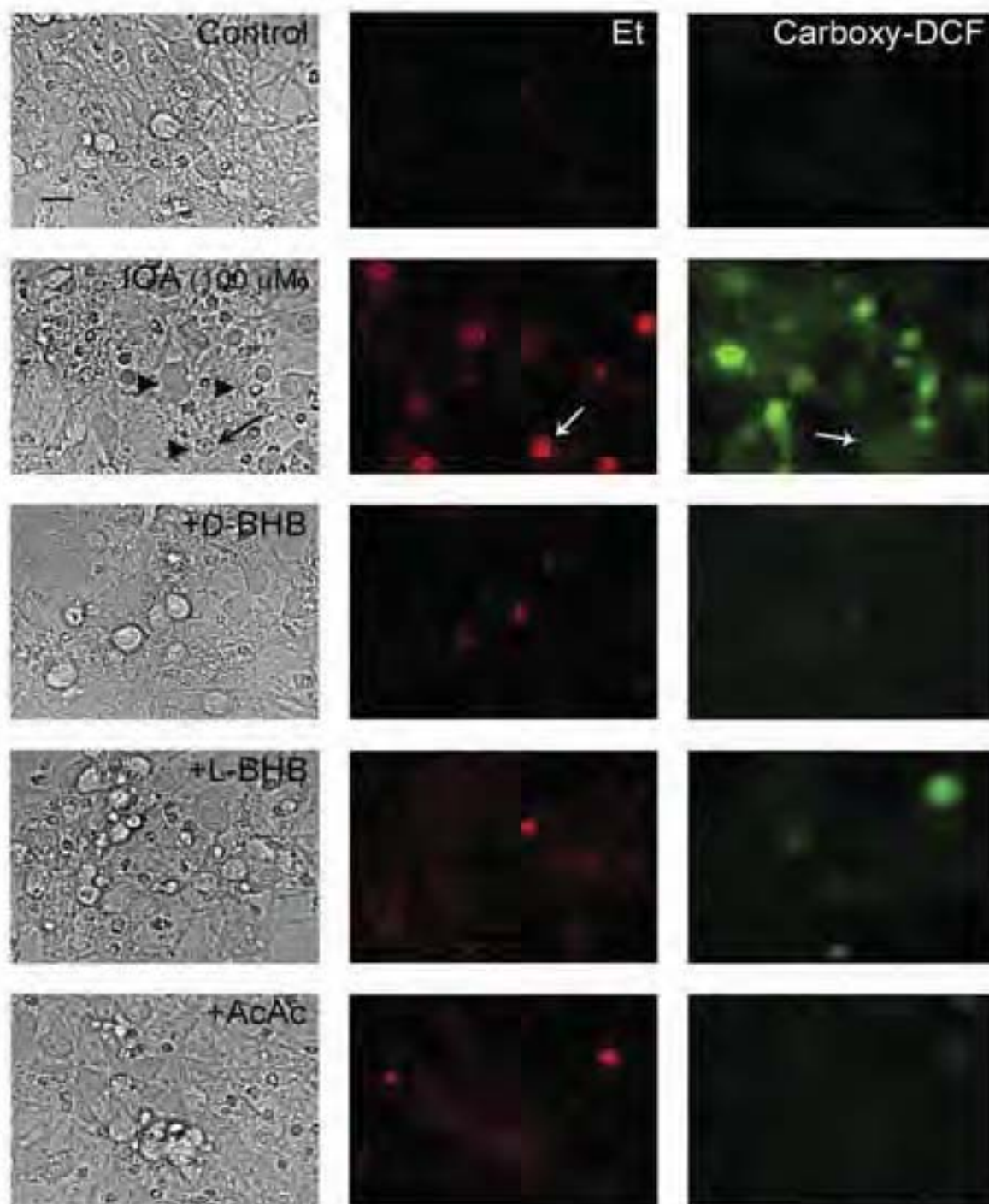
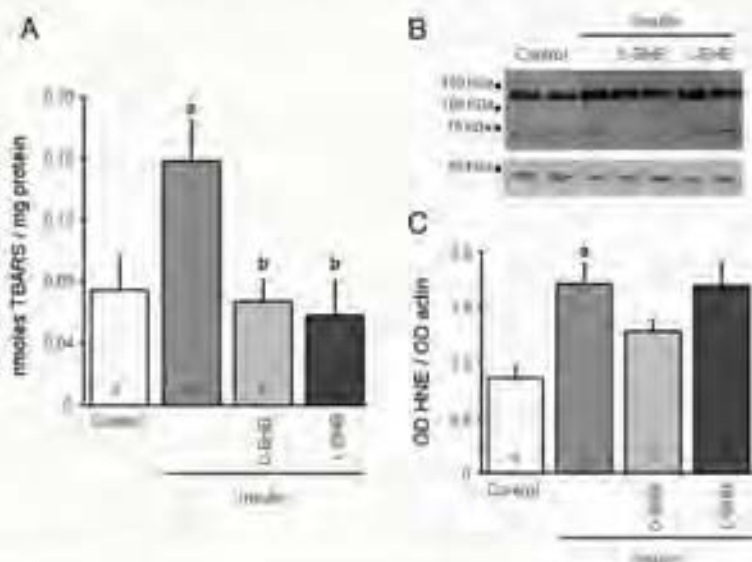


Fig. 6. Images from a representative experiment showing the effect of ketone bodies on ROS levels during IOA exposure. Bright-field images are shown in the left panel and Et and carboxy-DCF images in the middle and right panels, respectively. The same field is shown in each condition. Arrowheads (left panel) show swollen cells, some of them are positive to both oxidation-sensitive markers (arrows in middle and right panels). Scale bar = 20 μm.

$0.065 \pm 0.005$ ,  $n = 3-6$ ), despite a sustained increase in D-BHB plasma levels was observed at the time of sacrifice (Table 2). At this time D-BHB plasma levels were significantly higher relative to the control group in D-BHB-treated rats, and if determined

earlier, 10 min after D-BHB administration, higher levels were obtained (Table 2), suggesting that D-BHB is removed from blood during the hypoglycemic period. When D-BHB was administered to intact animals levels of D-BHB were even higher,





**Fig. 7.** *In vivo* effects of BHB on lipoperoxidation levels and HNE-protein adducts during insulin-induced hypoglycemia. 1 h after insulin injection, rats received an i.p. injection (500 mg/kg) of either isomer of BHB. Rats were killed when they lost the righting reflex and were close to coma, and their hippocampi dissected. (A) Lipoperoxidation levels in the different animal groups. Data are mean  $\pm$  SEM of at least 5 animals. *a*  $p < 0.05$  vs control animals, and *b*  $p < 0.05$  vs hypoglycemic animals. (B) Representative Western blot showing HNE-protein adducts in the different animal groups. HNE-protein adducts of different molecular weights are shown in the upper panel while  $\beta$ -actin immunoreactivity used as a loading control, is shown at the bottom. (C) Quantification of HNE-protein adducts. For the OD analysis of HNE adducts, mainly with a molecular weight between 60 and 150 kDa were considered. Data are mean  $\pm$  SEM of at least 5 animals. *a*  $p < 0.05$  vs control animals.

further suggesting that in hypoglycemic animals, ketone bodies are rapidly removed from blood. On the other hand *L*-BHB-treated animals did not show any increase in *D*-BHB plasma level discarding a possible conversion of the *L*-isomer into *D*-BHB (Table 2).

AcAc treatment had no effect on lipoperoxidation levels in hypoglycemic rats either after the administration of 1 or 2 doses (in pmoles TBARS/mg protein, control =  $0.024 \pm 0.006$ , hypoglycemic group =  $0.065 \pm 0.006$ , AcAc-treated (one dose) =  $0.075 \pm 0.016$ , AcAc-treated (2 doses) =  $0.084 \pm 0.035$ ,  $n = 4-7$ ). Failure of AcAc to reduce lipoperoxidation cannot be attributed to the lack of increase of the ketone body concentration in blood, since rats receiving AcAc showed significantly higher plasma levels of this ketone body as determined 10 min and  $-2$  h after insulin

administration (Table 2). Control animals receiving AcAc showed increased levels of this ketone body as compared to hypoglycemic animals (Table 2), suggesting AcAc removal from blood during the hypoglycemic period, as observed in BHB-treated animals.

Administration of either isomer of BHB or AcAc had no effect on the development of the hypoglycemic state. The latency to the loss of the righting reflex was not different in treated and control animals (data not shown). Consistently, there were no differences in glucose levels at the time of sacrifice between ketone body-treated groups and hypoglycemic animals. All rats that received insulin showed glucose levels  $\leq 20$  mg/dl at time of sacrifice.

Furthermore, we studied whether some proteins were modified by HNE, a lipoperoxidation product capable of reacting with thiol groups, lysine, histidine, serine and tyrosine residues of proteins (Esterbauer et al., 1991). As shown in Figs. 7B and C, hypoglycemia significantly increased HNE adducts in some proteins which was not prevented by treatment with *D*-BHB and *L*-BHB. The trend to diminish HNE products induced by *D*-BHB was not significant ( $p = 0.075$ ). AcAc had no effect on the production of HNE adducts (data not shown).

## Discussion

The full understanding of the mechanisms responsible for the neuroprotective effect of ketone bodies is of great relevance considering their therapeutic potentiality. The present study demonstrates that ketone bodies are capable of directly scavenging some ROS, and that this ability is preserved when they are administered to cultured neurons or to the animal *in vivo*, at least for BHB. In accordance, recently ketone bodies have been

**Table 2.** Effect of ketone bodies (KB, either AcAc or *D*-BHB) administration on KB plasma levels in control and insulin-treated rats

Treatment	<i>D</i> -BHB (nM)	AcAc (nM)
Control	$0.060 \pm 0.009$	$0.051 \pm 0.010$
KB*	$0.000 \pm 0.000^{a,b}$	$0.013 \pm 0.028^{a,b}$
Insulin	$0.092 \pm 0.013$	$0.077 \pm 0.019$
Insulin + KB*	$0.371 \pm 0.080^{a,b,c}$	$0.358 \pm 0.062^{a,b,c}$
Insulin + KB*	$0.186 \pm 0.050^{b,c}$	$0.218 \pm 0.061^{a,b,c}$
Insulin + KB 2 doses*	$0.326 \pm 0.079^{a,b,c}$	$0.243 \pm 0.062^{a,b,c}$
Insulin + <i>L</i> -BHB*	$0.098 \pm 0.003$	

Either *D*-BHB and AcAc levels were determined by enzymatic assays in plasma of control and hypoglycemic rats treated with each ketone body 10 min after the administration (\*), or when animals lost their righting reflex (\*). Data represent means  $\pm$  SEM from least 3 independent animals. *a*  $p < 0.05$  vs control, *b*  $p < 0.05$  vs insulin-treated animals, *c*  $p < 0.05$  vs all determinations performed 10 min after KB administration, and *d*  $p < 0.05$  vs intact animals that received KB.

shown to counteract ROS production induced by  $H_2O_2$  (Maslouf et al., 2007; Kim et al., 2007). We also provide new evidence suggesting that the antioxidant capacity of ketone bodies is involved in neuroprotection. To our knowledge this is the first study showing that the non-physiological isomer of BHB is capable of preventing oxidative damage independent of a metabolic effect, according to *in vitro* experiments. The mechanism by which ketone bodies scavenge directly several ROS is not clear at present. We are tempted to speculate that the hydroxyl group present in L-BHB and D-BHB may contribute to their scavenging capacity. In fact, the  $^{\bullet}OH$  scavenging capacity of D-BHB and L-BHB was clearly higher than that of AcAc, which lacks the hydroxyl group.

Previous studies have shown that metabolic inhibition induced by IOA leads to an important decrease in ATP levels, both in cultured neurons and retina (Zeevnik and Nicklas, 1990; Uto et al., 1995; Rega et al., 1997; Massieu et al., 2003), or when locally administered into the hippocampus (Massieu et al., 2003). On the other hand, it has been suggested that ROS production is an important component of neurotoxicity induced during this condition, since treatment with antioxidants effectively prevents neuronal death (Uto et al., 1995; Rega et al., 1999; Malcolm et al., 2000; Sperding et al., 2003). In previous studies we have shown that AcAc prevents ATP depletion in hippocampal cultured neurons exposed to IOA (Massieu et al., 2003), and in an *in vivo* model of excitotoxicity we have recently observed that D-BHB prevents neuronal damage and reduces lipoperoxidation levels in the rat striatum (McJia-Toiber et al., 2006). In an attempt to elucidate the contribution of other mechanisms of neuroprotection additional to their metabolic action, the effect of L-BHB on neuronal damage, ROS levels and lipoperoxidation induced during hypoglycemic-mimicking conditions, were studied.

Our results show that L-BHB promoted neuronal survival during both moderate and severe glycolysis inhibition, despite that it did not have any effect on ATP levels. We have determined that GAPDH is inhibited to a higher extent during the exposure to 100  $\mu M$  relative to 50  $\mu M$  IOA (Hernández-Fonseca et al., *in press*), suggesting that energy impairment is more pronounced in the former condition. Consistently, neuronal death induced by 100  $\mu M$  IOA is more extensive than that observed after 50  $\mu M$  treatment. Nevertheless, L-BHB is effective in both conditions, suggesting a contribution of the scavenging capacity of the L-isomer to neuroprotection.

According to the results, there is a good correlation between cell death and ROS production. During exposure to 100  $\mu M$  IOA a higher percentage of cells positive to the fluorescent markers was found compared to the 50  $\mu M$  condition. We observed that all three ketone bodies are equally effective in reducing the percentage of positive cells to fluorescent markers in both conditions, but are not equally effective in preventing neuronal death. It can be concluded from these results that the metabolic action of D-BHB and AcAc might influence ROS production through the preservation of mitochondrial metabolism, while L-BHB will mainly have a role as ROS scavenger. The protective effect of AcAc against ROS production and neuronal death might be attributed to its rapid transformation to

acetyl-CoA in mitochondria, efficiently restoring ATP levels. However, its capacity to scavenge various ROS cannot be discarded; *in vitro* assays show that at a 10 mM, D-BHB will scavenge close to 70% of the generated  $^{\bullet}OH$ , while AcAc will neutralize this radical in 31%, but will also scavenge other radicals in different proportions: 25% for  $^{\bullet}O_2$ , 22% for  $HOCl$ , and 12% for  $ONCO^{\bullet}$ . On the other hand, it has been observed that at high concentrations AcAc but not BHB stimulates the production of oxygen radicals, increases lipoperoxidation and decreases GSH levels in human erythrocytes and endothelial cells *in vitro* (Jain et al., 1998; Jain and McVie, 1999). Accordingly, we found that AcAc at 20 and 30 mM concentrations was toxic for control cultures.

Two fluorescent markers were used to monitor the presence of ROS, and ketone bodies were able to reduce the number of cells positive to both markers. Since the scavenging capacity of BHB is mainly for  $^{\bullet}OH$ , we can conclude that this radical is importantly produced during glycolysis inhibition, however, it might not be the only radical generated and involved in cell damage, since none of the isomers of BHB prevented completely ROS production. The antioxidant capacity of ketone bodies might also be attributed to other actions such as the stimulation of glutathione peroxidase activity (Ziegler et al., 2003), an increase in the CoQ/CoQH ratio with a subsequent reduction in free radical production (Saini et al., 1995; Kashirawa et al., 1997), and a decrease in the NAD and NADP couples (Kashirawa et al., 1997; Vench et al., 2001) favoring glutathione reduction. In addition, ketone bodies can reduce NADPH-oxidase activity decreasing  $O_2^{\bullet-}$  production (Sato et al., 1992).

Consistent with *in vitro* observations, *in vivo* results show a reduction in lipoperoxidation in rats treated with either one of the BHB isomers. Since no conversion of L-BHB to the D-isomer was observed under our experimental conditions, results suggest that the effect of L-BHB is mainly due to its radical scavenging capacity. In the case of AcAc, no significant reduction of lipoperoxidation was observed probably because of its higher  $IC_{50}$  value for  $^{\bullet}OH$ . Lipoperoxidation was used as an index of early oxidative damage in hypoglycemic animals before neuronal death takes place as a consequence of the hypoglycemic coma; thus the scavenger capacity rather than the metabolic action of ketone bodies is evaluated in this condition. Our results are consistent with those of other authors suggesting increased oxidative stress in the hypoglycemic brain after insulin administration before the onset of coma (Petrošková et al., 2003; Ballesteros et al., 2003; Singh et al., 2004; McGowan et al., 2006).

The beneficial effects of the ketogenic diet in the treatment of refractory epilepsy have been widely documented (Pan et al., 1999; Vining, 1999; Yudkoff et al., 2001; Nordli et al., 2001; Kussoff et al., 2002), but the mechanism involved remains elusive. The present results suggest that the  $^{\bullet}OH$  scavenging capacity of D-BHB could play a role, since the plasma concentrations of ketone bodies after the ketogenic diet (3–5 mM) are close to the  $IC_{50}$  value of BHB for  $^{\bullet}OH$ .  $^{\bullet}OH$  is known to initiate peroxidation, and both initiation and propagation of lipoperoxidation have been suggested to play a role in epileptogenesis (Willmore, 1990).



Ketone bodies were ineffective in preventing the increase in HNE-modified proteins observed during the hypoglycemic condition. Among all the byproducts of lipid peroxidation, HNE is the most reactive compound (Esterbauer et al., 1991). It is cytotoxic and capable of modifying the activity of several proteins (Peterson and Doorn, 2004), including glucose-6-phosphate dehydrogenase, GAPDH and glutathione reductase (Saweda et al., 1993; Uchida and Stadtman, 1993; Vavder Jagt et al., 1997). Here we show, for the first time, increased levels of HNE-protein adducts in the rat hippocampus during the hypoglycemic condition. The potential contribution of HNE to neurotoxicity is not well understood, in addition to its direct effect on proteins, an inhibitory effect on proteasome activity has been described leading to a reduced clearance of altered proteins followed by their accumulation (Friguet and Saweda, 1997; Okada et al., 1999; Srirangapur et al., 2000; Bulbeau et al., 2001; Ferington and Kappahn, 2004). The lack of effect of ketone bodies on HNE levels might be related to the temporality of their production. Possibly, HNE-protein adducts are produced early after insulin injection, before ketone body administration and poorly cleared, limiting the effect of ketone bodies.

In conclusion, the present results show for the first time a direct ROS scavenging capacity of ketone bodies, providing new evidence about the mechanisms of neuroprotection of these molecules. Results are of relevance due to the therapeutic potentiality of ketone bodies against damage associated with diverse pathological conditions including hypoxia, ischemia, epilepsy and some neurodegenerative diseases.

#### Acknowledgments

This work was supported by IN213507 PAPIIT and 48645-Q CONACyT grants to L. Massieu; IN227103 PAPIIT and 48812 CONACyT grants to L. Pedraza-Chaverri. M.L. Huces and K. Hernández-Fonseca were supported by 181312 and 167146 CONACyT scholarships, respectively.

#### References

Acidobatic, M.R., Hatchel, J.F., 2006. Hydroxylase A2, reactive oxygen-species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 376–387.

Balteserra, J.R., Molera, O.P., McGowan, J.E., 2003. Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol. Neonat.* 84, 159–163.

Barridge, M.V., Tan, S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) subcellular localization, substrate dependency, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–482.

Bisbalas, V.P., Jomier, J., Chung, C.L., Miller, R.J., 1996. Superoxide production in rats hippocampal neurons selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16, 1324–1336.

Bischoff, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Bulleau, A.L., Lomberg, K.C., Humphres, K.M., Szlak, H.A., Saweda, P.A., Friguet, B., Saweda, L.L., 2001. Oxidative modification and inactivation of the proteasome inventory during ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.* 276, 30057–30063.

Böhrlinger, H., Schaub, R.J., Zolner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of  $\alpha$ -hydroxyisovaleral, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 1–128.

Ferington, D.A., Kappahn, R.J., 2004. Catalytic site-specific inhibition of the 20S proteasome by 4-hydroxyisovaleral. *FEBS Lett.* 578, 217–223.

Floriano-Sánchez, E., Villamasa, C., Molina-Campos, O.N., Rocha, D., Sánchez-González, D.J., Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, L., 2006. Neurohydroxyisovaleric acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hydrofluoric acid and prevents in vivo nitro-nitrosated tyrosine formation in lungs. *Free Radic. Res.* 40, 323–333.

Friguet, B., Saweda, L.L., 1997. Inhibition of the multicatalytic proteasome (prosome) by  $\alpha$ -hydroxy-2-oxovaleral cross-linked protein. *FEBS Lett.* 405, 21–25.

García, O., Masdeu, L., 2001. Strategies for neuroprotection against L-trimethyl- $\beta$ -pyridilium dimethylallyl-ethyl-oxoal damage during energy impairment in vitro. *J. Neurosci. Res.* 64, 418–428.

Glück, M.B., Jayatilaka, E., Shaw, S., Rowan, A.J., Harcourtman, V., 2000. CNS oxidative stress associated with kainic acid induced model of experimental epilepsy. *Epilepsy Res.* 39, 63–71.

Gómez, A., Fernández, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65, 35–50.

Hawkins, R.A., Wiltamson, D.H., Kreis, H.A., 1971. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem. J.* 122, 13–18.

Hawkins, R.A., Bielbyck, J.F., 1979. Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 205, 325–327.

Hernández-Fonseca, K., Massieu, L., 2005. Disruption of mitochondrial calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 82, 196–205.

Hernández-Fonseca, K., Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, L., Massieu, L., in press. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* doi:10.1002/jnr.21624.

Hockenbery, D.M., Olivari, Z.N., Yin, X.-M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 73, 241–251.

Izumi, Y., Itoh, K., Katuki, H., Ito, A.M., Zorowski, C.F., 1998. Iso-Hydroxybutyrate fuels synaptic function during development: Histological and physiological evidence in rat hippocampal slices. *J. Clin. Invest.* 101, 1121–1132.

Jain, S.K., Kannan, K., Liu, G., 1998. Ketosis (acetoneuria) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 1083–1088.

Jain, S.K., McVie, R., 1999. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 48, 1850–1855.

Kadlwaya, Y., King, M.T., Veech, R.L., 1997. Salivary signaling by insulin: a ketone bodies ratio mimics insulin action in heart. *Am. J. Cardiol.* 80, 60A–64A.

Kadlwaya, Y., Takashima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., Veech, R.L., 2000. D-lactate-Hydroxybutyrate protease occurs in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5440–5444.

Kim, Y., Davis, L.M., Sullivan, P.G., Masliah, M., Strimling, T.A., van Breda, I., Rho, J.M., 2007. Ketone bodies are protective against oxidative stress in transgenic tau mice. *J. Neurochem.* 101, 1316–1326.

Kosoff, B.H., Pyzik, P.L., McGrogan, J.R., Vining, E.P., Freeman, J.M., 2002. Efficacy of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Pediatrics* 109, 780–783.

Lincoln, R.C., Des Rosiers, C., Braatzgruber, H., 1987. Metabolism of S-3-hydroxybutyrate in the perfused rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 149–156.

Levy, S., 1999. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 9, 119–131.

Masliah, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y., Rho, J.M., 2007. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 143, 256–269.

Malcolm, C.S., Berwell, K.R., Lurie, H., Beringham, D., Forbes, P.H., 2000. Characterization of isoform-mediated neurotoxicity in vitro using primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 102–107.

Massieu, L., Del Rio, P., Morchel, T., 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106, 669–677.



- Mason, I., Hagen, M.L., Mottlet, T., Hirschler-Ginsberg, K., 2003. Acetylacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120, 363–378.
- Miyata, R., Mizuhara, J.W., Kasliwara, Y., 2005. Dihydroxybutyrylate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J. Neurosci. Res.* 80, 501–509.
- McGowan, E.L., Chen, L., Guo, D., Trank, M., Wei, C., 2006. Increased mitochondrial reactive oxygen species production in neurons hours during hypoglycemia. *Neurosci. Lett.* 399, 111–114.
- Medina-Campos, O.N., Barrera, D., Segoviano-Muñoz, S., Rocha, D., Maldonado, P.D., Mendez-Patino, N., Peñiza-Claverie, J., 2007. 5-allyltryptamine scavenges singlet oxygen and hyperbaric acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2030–2039.
- Mejia-Talbot, J., Mestral, T., Massieu, L., 2006. D-5-Hydroxytryptamine prevents glutamate-mediated lysosomal and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochem. Res.* 31, 1389–1408.
- Mellanby, J., Williamson, D.H., 1965. Acetoacetate. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp. 457–457.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nehlig, A., Pevins de Vaccarolis, A., 1993. Glucose and ketone bodies utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 40, 161–221.
- Noh, H.S., Hal, Y.S., Nishida, R., Har, J., Burg, J.H., Kang, S.S., Choi, O.J., Choi, W.S., 2006. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosci. Res.* 85, 702–709.
- Nurk, D.R., Kuzma, M.M., Carroll, F., Kierulffberger, D.Y., Hensch, S.J., Braun, H.J., Seidel, W.T., De Vivo, D.C., 2001. Experience with ketogenic diet in infants. *Pediatrics* 108, 129–133.
- Okada, K., Wanggenytrikol, C., Obara, T., Toyokuni, S., Tanaka, K., Uchida, K., 1999. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of mitochondrial proteolysis during oxidative stress: identification of proteasomes as target molecules. *J. Biol. Chem.* 274, 23787–23793.
- Owen, G.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G., Cahill Jr., G.F., 1967. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46, 1589–1595.
- Pan, J.W., Bolan, E.M., Chu, W.J., Benington, H.P., 1999. Ketosis and epilepsy: 31P spectroscopic imaging at 4.1 T. *Epilepsia* 40, 703–707.
- Petrová, J., Muffel, P., Timová, E., Krušák, M., Růžka, R., Štěpák, S., Čížková, J., Aničič, M., 2003. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol. Res.* 52, 131–135.
- Peñiza-Claverie, J., Medina-Campos, O.N., Segoviano-Muñoz, S., 2007. Effect of fasting on peroxyl radical scavenging capacity of garlic. *Food Chem. Toxicol.* 45, 622–627.
- Peterson, D.R., Dixon, J.A., 2004. Receptors of 4-hydroxy-2-nonenal: self-protection and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 937–945.
- Rego, A.C., Saez, M.S., Oliveira, C.R., 1997. Adrenalin  $\alpha$ -glucosidase (agmatase) products after oxidative stress and metabolic dysfunction in cultured retinal cells. *J. Neurochem.* 69, 1228–1235.
- Rego, A.C., Saez, M.S., Oliveira, C.R., 1999. Influence of the antioxidants vitamin E and ubiquinol on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia, or oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1405–1417.
- Rimason, K.M., Iltis, M.S., Felar, M.P., Moore, J.S., Ross, M.F., Hagen, M.L., Murphy, M.P., Bookman, J.S., 2006. Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15038–15043.
- Sato, N., Shimizu, H., Shimozono, Y., Sawa, K., Mori, M., Kobayashi, I., 1992. Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci.* 51, 103–118.
- Sato, K., Kasliwara, Y., Kono, C.A., Tsuchiya, N., King, M.T., Bahlu, G.K., Chance, B., Clarke, K., Veech, R.L., 1995. Isobar, ketone bodies, and mitochondrial energy metabolism. *FASEB J.* 9, 651–658.
- Shringarpure, R., Grant, T., Sible, N., Davies, K.J., 2000. 4-Hydroxy-2-nonenal-modified amyloid-beta peptide inhibits the proteasome: possible importance to Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 37, 1802–1809.
- Siegl, F., Jain, A., Kain, G., 2004. Impact of hypoglycemia and glucose on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* 260, 153–159.
- Smith, S.L., Head, G.J., Mattin, K.F., 2005. KTX 0101: a potential metabolic approach to cytoprotection in major surgery and neurological disorders. *CNS Drug Rev.* 11, 113–140.
- Spring, O., Brunsberg, V., Oelster, H., Zoré-Skani, E., 2003. Reactive oxygen species play an important role in insulin-induced neurotoxicity in primary rat neuronal cultures and in differentiated PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 351, 137–140.
- Suh, S.W., Arayama, K., Uchi, Y., Gama, F., Matsunaga, Y., Gomi, E., Liu, J., Swanson, R.A., 2005. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J. Neurosci.* 25, 10661–10669.
- Suh, S.W., Gami, E.T., Hamby, A.M., Chan, P.H., Swanson, R.A., 2007. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 117, 918–918.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuzaki, A., Hirata, A., 2001. Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, ischemia and ischemia *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharmacol.* 37, 143–150.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Kikumura, Y., Mori, S., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuzaki, A., Hirata, A., 2002.  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 44, 36–43.
- Szweda, L.I., Uchida, K., Tai, L., Stadman, E.R., 1993. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal: selective modification of an active-site lysine. *J. Biol. Chem.* 268, 3342–3347.
- Tan, K., Porter, C., Caspersen, C., Trautman, P., Wu, D.C., Yan, S.D., Nair, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ramanamy, R., Przedborski, S., 2003. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 112, 892–903.
- Tomizawa, S., Imai, H., Tachida, S., Shimizu, T., Honda, F., Nakamura, M., Nagano, T., Ueno, Y., Matsuzaki, Y., Fukusaku, S., Sato, N., 2005. The detection and quantification of highly reactive oxygen species using the novel HPF fluorescent probe in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neurosci. Res.* 53, 301–313.
- Uchida, K., Stadman, E.R., 1993. Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a possible involvement of intramolecular cross-linking reaction. *J. Biol. Chem.* 268, 6380–6395.
- Uchi, A., Dix, E., Kuzumoto, M., Rosenmund, E.A., 1995. Delayed neuronal death after brief bilateral hypoxia *in vitro*. *J. Neurochem.* 64, 2185–2192.
- Vandier, J.P., Hanaoka, I.A., Vander Jagt, T.J., Gomez, M.S., Gonzalez, D.M., Deek, L.M., Royer, R.E., 1997. Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxy-2-nonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1133–1140.
- Veech, R.L., Charaz, B., Kasliwara, Y., Latt, H.A., Cahill Jr., G.F., 2001. Ketone bodies: potential therapeutic uses. *EBM J* 5(1), 201–207.
- Vining, E.P.G., 1989. Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Res.* 37, 181–190.
- Williamson, D.H., Mellanby, J., 1965. D-(+)-5-hydroxytryptamine. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp. 459–461.
- Williams, L.J., 1996. Post-traumatic epilepsy: cellular mechanisms and implications for treatment. *Epilepsia* 37, 567–573.
- Yamada, K.A., Krasang, N., Dao, L.L., 2005. Ketogenic diet reduces hypoglycemia-induced neuronal death in young rats. *Neurosci. Lett.* 385, 210–213.
- Yokoff, M., Dinkler, Y., Nisim, I., Laxer, A., Nisim, I., 2001. Ketogenic diet, amino acid metabolism and seizure control. *J. Neurosci. Res.* 66, 933–940.
- Zareval, G.D., Ninkovic, W.J., 1990. Chemically induced hypoglycemia and aerobic relationship to glutamate receptor-mediated toxicity *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1285–1292.
- Zhao, H., Kalivinskii, S., Zhang, H., Joseph, J., Milkrethick, K., Vasquez-Vivar, J., Kalyanasundaram, B., 2003. Superoxide reacts with cyanide to form a fluorescent product that is directly different from ethidium: potential implications in mitochondrial fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1339–1368.
- Ziegler, D.R., Ribeiro, L.C., Hager, M., Stjepan, L.R., Araujo, E., Torres, L.L., Gottfried, C., Neto, C.A., Gonçalves, C.A., 2003. Ketogenic diet increases glutathione peroxidase activity in the rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 28, 1743–1747.

## **DISCUSIÓN**

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que existe daño oxidativo, tanto en proteínas como en lípidos, únicamente en las regiones vulnerables del cerebro mientras que en el cerebelo no observamos incremento a ningún tiempo. Estos resultados concuerdan con la existencia de un estado pro-oxidante durante la hipoglucemia. Agardh y colaboradores encontraron que después de un periodo isoelectrico de 30 min, los cocientes de lactato/piruvato, NAD/NADH, GSG/GSH y NADP/NADPH existían mayoritariamente en su forma oxidada (1978). Sin embargo, hasta ahora se desconocía si este estado podría causar daño oxidativo a los componentes celulares y su distribución regional tampoco había sido estudiada.

La hipoglucemia es un problema común en los pacientes diabéticos, especialmente en los que padecen diabetes tipo 1, ya que son dependientes de insulina. Sin embargo, los pacientes con diabetes tipo 2 también corren el riesgo de padecer hipoglucemia conforme va disminuyendo la secreción endógena de insulina (Heller, 2008). Además en ambas patologías, la evolución de la enfermedad agudiza los episodios hipoglucémicos, ya que las respuestas hormonales normales a esta condición se van perdiendo, lo que lleva a los pacientes a padecer hipoglucemia frecuentemente (Heller, 2006). La repercusión de periodos repetidos de hipoglucemia sobre la función cognoscitiva no es del todo clara. Existen reportes que demuestran un peor desempeño neurológico en los pacientes diabéticos que continuamente padecen periodos de hipoglucemia (Akyol y col, 2003; Sommerfield y col, 2003a; Hershey y col, 2005; Jauch-Chara y col, 2007), mientras que otros no han encontrado diferencias significativas (Strudwick y col, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la hipoglucemia afecta la memoria de individuos sanos (Jauch-Chara y col, 2007), aún cuando se trata de un

evento transitorio con una disminución moderada de glucosa (Sommerfield y col, 2003b).

El funcionamiento normal del cerebro depende del aporte normal de glucosa. Cuando este aporte se interrumpe ya sea por un evento isquémico o por una disminución en su concentración sanguínea, se puede presentar daño neuronal. Experimentalmente el modelo más usado para el estudio de los mecanismos de muerte asociados a la hipoglucemia es la administración i.p. de insulina en roedores (Auer y col, 1984a). Trabajos clásicos describieron que existe una vulnerabilidad selectiva de ciertas regiones del cerebro a la muerte en condiciones de hipoglucemia. Las regiones más susceptibles a la disminución de glucosa son la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado, mientras que el cerebelo y el tallo cerebral son más resistentes (Auer y col, 1984b). Incluso dentro de estas regiones existen grupos neuronales que son altamente vulnerables; en el hipocampo, la cresta del giro dentado, el subículo y la capa CA1 son más susceptibles mientras que en la corteza cerebral las capas externas se dañan más (Auer y col, 1985a; 1985b). Pocos trabajos han estudiado comparativamente estas regiones, por lo que los eventos involucrados en la aparición de daño selectivo aún se desconocen. En la presente tesis nos propusimos abordar este problema y para ello en nuestros experimentos utilizamos tanto las regiones vulnerables (el hipocampo, la corteza y el estriado) como al cerebelo que es más resistente.

Otro aspecto poco explorado hasta la fecha son los eventos que ocurren antes del coma hipoglucémico, ya que los estudios se han centrado en lo que ocurre después de 30 min de periodo isoelectrico y durante el periodo de reperfusión. Estos trabajos han descrito que durante el periodo isoelectrico existe una liberación masiva de aminoácidos excitadores

(Sandberg y col, 1986), principalmente aspartato, cuya producción se ve favorecida en condiciones de hipoglucemia (Sutherland y col, 2008). La muerte neuronal, por tanto, es de tipo excitotóxico (Wieloch, 1985) y se acompaña de cambios iónicos masivos (Harris y col, 1984), y de una deficiencia energética importante (Ratcheson y col, 1981). Recientemente, la presencia de estrés oxidativo en esta condición ha sido sugerida (Patočková y col 2003; Singh y col, 2004), aunque su temporalidad y distribución no han sido estudiadas a fondo. En este sentido evaluamos la presencia de marcadores de estrés oxidativo en un modelo de hipoglucemia inducida por insulina donde el periodo isoelectrico fue prevenido con la administración i.v. de glucosa.

El aumento en los niveles de lipoperoxidación se presentó cuando los animales fueron sacrificados al perder el reflejo de enderezamiento, minutos antes de alcanzar el estado de coma. Esta observación sugiere que hay producción de ROS que afecta a los lípidos aún en ausencia de periodo isoelectrico. El daño oxidativo en los lípidos membranales altera las propiedades intrínsecas de la membrana plasmática y de las proteínas que están embebidas en ella (Agardh y col, 1982). Se ha descrito que el funcionamiento normal de la ATPasa de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ , que es la principal bomba encargada de mantener la homeostasis iónica en las neuronas, puede alterarse por un incremento en la lipoperoxidación, debido al efecto que ésta tiene sobre la fluidez membranal (Jamme y col, 1995). La lipoperoxidación además podría afectar otros procesos que involucran proteínas transmembranales, como la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la membrana mitocondrial, lo que afectaría la generación de ATP, y comprometería los procesos dependientes de energía. En este sentido se ha reportado durante la hipoglucemia un aumento en los niveles de lipoperoxidación de las membranas mitocondriales acompañada de una disminución significativa en los niveles de ATP (Ballesteros y col, 2003). En



resumen, el aumento temprano de los niveles de lipoperoxidación en las regiones vulnerables podría predisponerlas a ser más susceptibles al daño, ya que las células de estas regiones tendrían una capacidad limitada de recuperación ante una despolarización posterior, lo que ocurriría una vez iniciado el periodo isoelectrico. Este efecto es transitorio y los niveles recuperan valores basales cuando los animales reciben glucosa. Al parecer, una vez que hay glucosa disponible, ésta se metaboliza generando ATP el cual se utiliza para remover lípidos oxidados y así restablecer la funcionalidad membranar.

Otra consecuencia de la lipoperoxidación es la formación de aldehídos capaces de reaccionar con algunos residuos proteicos (Esterbauer y col, 1991). Dentro de estos aldehídos el más reactivo es el 4-HNE que reacciona con residuos de histidina y lisina así como con grupos sulfidrilos, modificando la actividad de varias proteínas (Esterbauer y col, 1991). Nuestros resultados muestran que hay un aumento en las proteínas modificadas por el 4-HNE en el hipocampo de las ratas hipoglucémicas sacrificadas al perder el reflejo de enderezamiento. Se ha reportado que entre las proteínas cuya actividad se inhibe están la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa e incluso la ATPasa de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  (Vander Jagt y col, 1997; Bosch-Morell y col, 1999; Siems y col, 1996). La posible inhibición de las enzimas relacionadas con el glutatión contribuiría, en nuestro modelo, a que se exista un estado pro-oxidante en esta región durante la hipoglucemia, ya que el glutatión es una de las principales defensas antioxidantes. Así mismo, si la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  se modifica en presencia de 4-HNE, esto haría a las células del hipocampo más susceptibles a una subsecuente despolarización puesto que su capacidad de repolarización estaría comprometida.

Paralelamente analizamos la presencia de daño oxidativo en las proteínas a través de anticuerpos que reconocen residuos de nitrotirosinas, que son producidas al reaccionar el peroxinitrito con los residuos de tirosina y por tanto constituyen un buen indicador de la presencia de este radical, que es altamente reactivo (Beckman y Koppenol, 1996). Al contrario de lo encontrado con los niveles de lipoperoxidación, las proteínas modificadas por nitrotirosinas no aumentan antes del periodo isoeléctrico. Su presencia aumenta a partir de las 6 h después de la inyección de glucosa, únicamente en las regiones susceptibles al daño, siendo su aumento más temprano en la corteza y el estriado que en el hipocampo. Esta disparidad temporal sugiere que en estos dos fenómenos están involucradas al menos dos vías distintas de generación de radicales. Se ha descrito que en condiciones de hipoglucemia la mitocondria es una fuente importante de ROS (McGowan y col, 2006). Así mismo, se ha demostrado que en el periodo de reperfusión de glucosa la activación de la enzima NADPH oxidasa conlleva la generación de radicales superóxido (Suh y col, 2007b). Nuestros resultados sugieren que el daño oxidativo a las proteínas está relacionado con la reperfusión de glucosa aunque falta esclarecer que vías son las responsables de ambos fenómenos.

Los resultados antes descritos, obtenidos a partir de homogenados cerebrales con la técnica de Western blot, fueron confirmados en cortes de cerebros por inmunocitoquímica. Para estos experimentos los animales fueron sacrificados 24 hrs después de la inyección de insulina. Células positivas para nitrotirosinas se encontraron en áreas de la corteza que comprenden la corteza cingulada, frontal, parietal y temporal, principalmente en capas superficiales, aunque también encontramos células positivas en capas profundas. En cuanto al hipocampo se observaron células marcadas en el hilus y en la región CA4. La marca encontrada no colocaliza con el marcador glial GFAP, lo que sugiere que las proteínas con

nitrotirosinas se concentran principalmente en las neuronas. En cambio, en el estriado, con esta técnica, no se observaron células marcadas en ninguno de los cortes analizados. La falta de marca en esta región se contrapone con lo encontrado en los homogenados, posiblemente porque en estos últimos se analiza una fracción proteica enriquecida.

La aparición de daño neuronal en condiciones de hipoglucemia se ha ligado siempre a la presencia de periodo isoelectrico. Estudios clásicos describieron que la extensión del daño tiene una relación directa con la duración del periodo isoelectrico (Auer y col, 1984a). Sin embargo, estos estudios se han enfocado al estudio de la muerte neuronal retardada con la aparición de daño masivo. Recientemente, algunos estudios han descrito la aparición de muerte celular puntual en regiones discretas del cerebro en ausencia de periodo isoelectrico (Tkacs y col, 2000; Tkacs y col, 2005; Ennis y col, 2008). Para evaluar la presencia de daño en nuestro modelo de hipoglucemia severa, en ausencia de coma, hicimos un grupo de ratas donde registramos la actividad eléctrica cerebral y luego evaluamos la presencia temprana de células dañadas con FJB. El EEG presentó un comportamiento muy parecido al encontrado anteriormente por otros. Esto es conforme el nivel de glucosa va disminuyendo aparecen ondas de mayor amplitud y menor frecuencia (Auer y col, 1984a; Suh y col, 2004). Al perder los animales el reflejo de enderezamiento, evento que precede al coma (Gundersen y col, 2001), los animales presentan un estado de estupor pero conservan actividad eléctrica. En este momento se les inyectó glucosa i.v., para evitar el periodo isoelectrico, lo que se logró en 5 de los 6 animales estudiados. En la única rata registrada que presentó periodo isoelectrico, éste tuvo una duración de 5.25 min. Este animal presentó el mayor número de células positivas a FJB, lo que confirma que durante el periodo isoelectrico se desarrollan eventos que dañan a las neuronas. La presencia

de células marcadas se dio principalmente en la corteza y en menor grado en el estriado, mientras que no se encontró marca en el hipocampo. Precisamente en la corteza y en el estriado fue donde la presencia de proteínas nitrosiladas fue más temprana. Por otro lado, también encontramos células marcadas con FJB, exclusivamente en la corteza, en 2 de los 5 animales donde el periodo isoeléctrico fue prevenido exitosamente. Esta distribución coincide con la encontrada en el modelo de hipoglucemia en ausencia de coma, donde a este tiempo solo se encontraron células positivas en la corteza (Ennis y col, 2008). Además, ningún animal presentó células positivas a FJB en el cerebelo, lo que confirma que esta región es menos vulnerable a la hipoglucemia.

La ausencia de cambios en los marcadores de estrés oxidativo en el cerebelo sugiere que esta región es altamente resistente a este tipo de daño. Las razones de esta resistencia no son claras. Existen algunos estudios que han investigado regionalmente el estado de las defensas antioxidantes en el cerebro. En este sentido se ha encontrado que existe una actividad basal mayor de la catalasa y de la glutatión reductasa, así como un mayor contenido de glutatión reducido (GSH) en esta región (Siqueira y col 2005; Bhardwaj y col, 1998). Al parecer, estas diferencias podrían ser suficientes para prevenir el desarrollo de daño oxidativo en el cerebelo, aunque otros mecanismos podrían también estar involucrados. En este sentido, se ha demostrado que el estado energético del cerebelo se preserva mejor que el de la corteza al inicio del periodo isoeléctrico (Ratcheson y col, 1981) y después de 30 min de isoelectricidad (Agardh y col, 1981). Se ha demostrado además que el transportador de glucosa del cerebelo es el doble de eficiente que el de la corteza (LaManna y Harik, 1985), por lo que en esta región el transporte de glucosa supera su demanda metabólica, lo que le podría conferir cierta resistencia ante un evento hipoglucémico (LaManna y



Harik, 1985). La disponibilidad de más glucosa permitiría que la carga energética del cerebelo se mantenga intacta, lo que a su vez disminuiría el uso de sustratos energéticos alternativos, cuyo metabolismo se da principalmente en la mitocondria, evitando así la producción de ROS mitocondriales. Así mismo, la síntesis de GSH y su reciclaje, ambos procesos dependientes de energía, se verían preservados en esta región. Por tanto se desconoce si la ausencia de daño oxidativo en el cerebelo se debe a una menor producción de ROS o una respuesta antioxidante eficiente.

Por otra parte, analizamos el potencial antioxidante de los cuerpos cetónicos. Se ha demostrado que estos compuestos poseen propiedades neuroprotectoras (Maalouf y col, 2009). La mayoría de los estudios apuntan a que su potencial protector se debe principalmente a que funcionan como sustratos metabólicos alternativos a la glucosa (Suzuki y col, 2001; Suzuki y col, 2002). Recientemente un papel protector en condiciones oxidativas ha sido sugerido tanto *in vivo* como *in vitro* (Mejía-Toiber y col, 2008; Kim y col, 2007). El mecanismo de esta protección no ha sido del todo esclarecido, aunque se ha sugerido que el metabolismo de los cuerpos cetónicos produce NADH y que este inhibe la producción de ROS mitocondriales (Maalouf y col, 2007). Sin embargo, la capacidad antioxidante intrínseca de estos compuestos no ha sido explorada. En este sentido decidimos evaluar la capacidad atrapadora de los cuerpos cetónicos y luego probar si esta capacidad se conserva en un sistema pro-oxidante *in vivo*, como lo es nuestro modelo de hipoglucemia. Experimentos *in vitro* realizados en el laboratorio del Dr. José Pedraza Chaverri en la Facultad de Química demostraron que ambos isómeros del BHB atrapan al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) eficientemente. Para probar si estos compuestos tienen un efecto antioxidante *in vivo*, decidimos administrarlos en los animales hipoglucémicos 1 h después de la insulina. Los animales fueron sacrificados

al perder el reflejo de enderezamiento, ya que en este tiempo se observó el máximo aumento en los niveles de lipoperoxidación. Ambos isómeros previnieron eficientemente el aumento en los niveles de lipoperoxidación en todas las regiones estudiadas. En cambio, el AcAc no tuvo ningún efecto sobre este aumento debido posiblemente a que su capacidad atrapadora es limitada. La  $IC_{50}$  para el  $\bullet OH$  del D-BHB es de  $3.2 \pm 0.44$  mM, para el L-BHB es de  $2 \pm 0.47$  mM, en cambio la del AcAc es de  $31.1 \pm 5.47$  mM. Una concentración milimolar (2-7 mM) de BHB se alcanza en los pacientes que se someten a una dieta cetogénica (Freeman y col, 1998), por lo que esta propiedad antioxidante, en efecto, puede estar contribuyendo al efecto neuroprotector. En nuestros experimentos demostramos que la administración de BHB incrementa su concentración en la sangre a  $0.6 \pm 0.06$  mM en animales intactos, cuyos niveles fueron medidos 10 min después de la administración. Mientras que a ese mismo tiempo los animales hipoglucémicos alcanzaron niveles de  $0.371 \pm 0.080$  mM, lo que sugiere que los cuerpos cetónicos son utilizados como sustratos energéticos durante hipoglucemia.

Nuestros datos sugieren que el efecto del BHB sobre la oxidación lipídica está relacionado con su capacidad antioxidante, ya que no solo el isómero metabólicamente activo fue capaz de prevenir la lipoperoxidación sino que el L-BHB también la previno eficientemente. Cuando los animales recibieron la administración de L-BHB, no encontramos aumento en los niveles de sanguíneos de D-BHB lo que descarta una posible conversión de este isómero y refuerza que la capacidad antioxidante del BHB interviene en la prevención del aumento en la lipoperoxidación. Considerando que la hipoglucemia es un componente muy importante de la isquemia cerebral, nuestros datos apoyan el uso de los cuerpos cetónicos para prevenir el daño

inducido en esta condición, ya que además de mejorar el estado metabólico cerebral podrían contrarrestar el daño oxidativo isquémico.

Los cuerpos cetónicos, a través de la dieta cetogénica, han sido utilizados clínicamente por mucho tiempo en el tratamiento de epilepsias refractarias tanto en niños (Nordli y col, 2001; Jung da y col, 2008) como en adultos (Wusthoff y col, 2009; Mosek y col, 2008). Recientemente se ha utilizado este tipo de dieta en pacientes diabéticos, que han logrado tener un mejor control glucémico (Westman y col, 2008; Dashti y col, 2007). Otros trastornos metabólicos donde se ha utilizado a los cuerpos cetónicos eficientemente, incluyen pacientes con el síndrome de deficiencia del GLUT1 (Rauchenzauner y col, 2008; DeVivo y col, 2002) y pacientes con deficiencia de la enzima piruvato deshidrogenasa (DeVivo y col, 2002). Existe un reporte clínico que documenta el tratamiento oral con DL-BHB de un estado de hipoglucemia persistente, caracterizada por una concentración aumentada de insulina, en dos pacientes pediátricos (Plecko y col, 2002).

Otra patología donde podría ser útil y efectivo el tratamiento clínico con BHB es la enfermedad de Alzheimer. Una característica común de estos pacientes es que la entrada de glucosa al cerebro y su metabolismo están afectados en ciertas regiones específicas del cerebro (Kalaria y Harik, 1989; Sims, 1990; Jagust y col, 1991). Este patrón específico de hipometabolismo de glucosa es reproducible en todos los pacientes y ha sido propuesto como una herramienta de diagnóstico (Reiman y col 1996). Estudios realizados en personas genéticamente predispuestas a padecerla muestran disminuido el transporte de glucosa incluso antes de que la patología y los síntomas se manifiesten (Kennedy y col, 1995; Reiman y col, 1996; Reiman y col, 2004). Por lo que el hipometabolismo de glucosa podría ser un buen blanco terapéutico (Costantini y col, 2008), que podría tratarse con un sustrato

metabólico alternativo a la glucosa, como los cuerpos cetónicos (Henderson, 2008). En modelos experimentales de esta enfermedad se ha observado neuroprotección en neuronas hipocampales adicionadas con BHB (Kashiwaya y col, 2000) y menor acumulación del péptido beta amiloide en un modelo animal tratado con dieta cetogénica (Van der Auwera y col, 2005). Aunado a su efecto metabólico, el efecto antioxidante del BHB, descrito en la presente tesis, podría mejorar ciertos aspectos de la enfermedad de Alzheimer. Es bien sabido, que uno de los componentes de la enfermedad de Alzheimer es el estrés oxidativo (para revisión ver Moreira y col, 2009; Sultana y col, 2009). En este sentido, se ha demostrado, en un modelo in vitro de esta enfermedad, que la inhibición del GLUT3 ocurre como consecuencia del estrés oxidativo, y está mediado por el 4-HNE (Mark y col, 1996), por lo que tanto el efecto metabólico como el efecto antioxidante del D-BHB serían útiles en este caso.

De este trabajo se desprende la posible utilización terapéutica del DL-BHB como tratamiento en algunas patologías donde prevalecen condiciones pro-oxidantes aunadas a defectos en el metabolismo de la glucosa.



## **CONCLUSIONES**

1. La hipoglucemia genera un estado pro-oxidante en las regiones vulnerables al daño hipoglucémico. Este estado produce daño tanto en lípidos membranales como en proteínas.
2. La lipoperoxidación precede al daño oxidativo de las proteínas lo que sugiere que estos dos eventos son causados por diferentes fuentes de ROS. La reperfusión de glucosa es necesaria para que se produzca la nitrosilación de las proteínas.
3. La hipoglucemia genera daño neuronal exclusivamente en las regiones vulnerables incluso en ausencia de periodo isoelectrico. Este daño es discreto y puntual.
4. Ambos isómeros del BHB son capaces de prevenir el aumento temprano de la lipoperoxidación, posiblemente por un mecanismo antioxidante intrínseco.

## REFERENCIAS

Agardh CD, Folbergrová J, Siesjö BK. Cerebral metabolic changes in profound, insulin-induced hypoglycemia, and in the recovery period following glucose administration. *J Neurochem.* 1978; 31:1135-1142.

Agardh CD, Westerberg E, Siesjö BK. Severe hypoglycemia leads to accumulation of arachidonic acid in brain tissue. *Acta Physiol. Scand.* 1980; 109:115-116.

Agardh CD, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. Hypoglycemic brain injury: Metabolic and structural findings in rat cerebellar cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981; 1:71-84.

Agardh CD, Chapman AG, Pellegrino D, Siesjö BK. Influence of severe hypoglycemia and plasma membrane function in rat brain. *J. Neurochem.* 1982; 36:662-668.

Akyol A, Kiylioglu N, Bolukbasi O, Guney E, Yurekli Y. Repeated hypoglycemia and cognitive decline. A case report. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2003; 24:54-56.

Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK. Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 1984a; 33:1090-1098.

Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol.* 1984b; 64:177-191.

Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol.* 1985a; 67:25-36.

Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 1985b; 67:13-24.

Auer RN. Hypoglycemic brain damage. *Metab. Brain Dis.* 2004; 19:169-175.

Auestad N. Fatty Acid Oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary cultures *J. Neurochem.* 1991; 56:1376-1386.

Ballesteros JR, Mishra OP, McGowan JE. Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol Neonate*. 2003; 84:159-163.

Baner S, Cryer PE. Hypoglycemia in type 2 diabetes. *Med. Clin. North. Am.* 2004; 88:1107-1116.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: C1424-C1437.

Bhardwaj SK, Sharma ML, Gulati G, Chhabra A, Kaushik R, Sharma P, Kaur G. Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1998; 34:157-168.

Bixel M, Hamprecht B. Generation of ketones bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J. Neurochem.* 1995; 65:2450-2461.

Bosch-Morell F, Flohé L, Marín N, Romero FJ. 4-Hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26:1383-1387.

Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 2007; 55:1263-1271.

Choi IY, Seaquist ER, Gruetter R. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neurosci. Res.* 2003; 72:25-32.

Costantini LC, Barr LJ, Vogel JL, Henderson ST. Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 2008; 9:S16.

Cryer PE, Davis SN, Shamon H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1902-1912.

Cryer PE. Diverse causes of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:2272-2279.

Cryer PE. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:868-870.

Daniel P, Love E, Moorhouse S, Pratt O. The transport of ketone bodies into the brain of the rat (in vivo). *J. Neurol. Sci.* 1977; 34:1-13.

Dashti HM, Mathew TC, Khadada M, Al-Mousawi M, Talib H, Asfar SK, Behbahani AI, Al-Zaid NS. Beneficial effects of ketogenic diet in obese diabetic subjects. *Mol. Cell. Biochem.* 2007; 302:249-256.

Davidson MB. Hypoglycemia in adults. En: *Manual of Endocrinology and Metabolism*. Editado por: Lavin N. para: Lippincott Williams y Wilkins. 2002; 489-509.

de Herder WW. Insulinoma. *Neuroendocrinology*. 2004; 80:20-22.

DeVivo DC, Leckie MP, Agrawal HC. D-beta-Hydroxybutyrate: a major precursor of amino acids in developing rat brain. *J. Neurochem.* 1975; 25:161-170.

DeVivo DC, Leary L, Wang D. Glucose transporter 1 deficiency syndrome and other glycolytic defects. *J. Child. Neurol.* 2002; 17:3S15-23.

Ennis K, Tran PV, Seaquist ER, Rao R. Postnatal age influences hypoglycemia-induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res.* 2008; 1224:119-126.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11:81-128.

Freeman JM, Vining EPG, Pyzik PL, Gilbert DL. Beta-hydroxybutyrate levels in blood correlate with seizure control in children on the ketogenic diet. *Epilepsia* 1998; 39:167-171.

Gjedde A, Crone C. Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. *Am. J. Physiol.* 1975; 229:1165-1169.

Gould GW, Bell GI. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 1990; 15:18-23.

Gruetter R. Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J. Neurosci. Res.* 2003; 74:179-183.

Gundersen V, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunogold study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21:41-51.



Guzmán M, Blázquez C. Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? Trends in Endoc. and Metab. 2001; 12:169-173.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. Biochem J. 1999; 343:281-299.

Hasselbach S, Knudsen G, Jakobsen J, Pinborg L, Holm S, Paulson O. Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans. Am. J. Physiol. 1995; 268:E1161-E1166.

Harris RJ, Wieloch T, Symon L, Siesjö BK. Cerebral extracellular calcium activity in severe hypoglycemia: relation to extracellular potassium and energy state. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1984; 4:187-193.

Hawkins R. Uptake of ketone bodies by rat brain in vivo. Biochem. J. 1971; 121:17P.

Hawkins R, Williamson D, Krebs H. Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. Biochem. J. 1971; 122:13-18.

Hawkins R, Biebuyck J. Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. Science 1979; 205:325-327.

Heaton A, Martin S, Brelje T. The economic effect of hypoglycemia in a health plan. Manag. Care Interface. 2003; 16:23-27.

Heller SR. Hypoglycaemia in diabetes. Medicine 2006; 34:107-110.

Heller SR. Hypoglycaemia in Type 2 diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract. 2008; 82:S108-S111.

Henderson ST. Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. 2008; 5:470-80.

Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. J. Neurosci. Res. 2008; 86:1768-1780.

Hershey T, Perantie DC, Warren SL, Zimmerman EC, Sadler M, White NH. Frequency and timing of severe hypoglycemia affects spatial memory in children with type 1 diabetes. Diabetes Care 2005; 28:2372-2377.

Hertz L, Dienel GA. Lactate transport and transporters: general principles and functional roles in brain cells. *J. Neurosci. Res.* 2005; 79:11-18.

Herzog RI, Chan O, Yu S, Dziura J, McNay EC, Sherwin RS. Effect of acute and recurrent hypoglycemia on changes in brain glycogen concentration. *Endocrinology* 2008; 149:1499-1504.

INEGI, 2005. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)

International Diabetes Federation, 2009. [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org)

Jagust WJ, Seab JP, Huesman RH, Valk PE, Mathis CA, Reed BR, Coxson PG, Budinger TF. Diminished glucose transport in Alzheimer's disease: dynamic PET studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1991; 11:323-330.

Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 1995; 7:333-337.

Jauch-Chara K, Hallschmid M, Gais S, Schmid SM, Oltmanns KM, Colmorgen C, Born J, Schultes B. Hypoglycemia during sleep impairs consolidation of declarative memory in type 1 diabetic and healthy humans. *Diabetes Care* 2007; 30:2040-2045.

Jung da E., Kang HC, Kim HD. Long-term outcome of the ketogenic diet for intractable childhood epilepsy with focal malformation of cortical development. *Pediatrics.* 2008; 122:330-333.

Kalaria RN, Harik SI. Reduced glucose transporter at the bloodbrain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1989; 53:1083-1088.

Kammula R. Metabolism of ketone bodies by ovine brain *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 1976; 251:1490-1494.

Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL. D-beta-Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97:5440-5444.

Kennedy AM, Frackowiak RS, Newman SK, Bloomfield PM, Seaward J, Roques P, Lewington G, Cunningham VJ, Rossor MN. Deficits in cerebral glucose metabolism demonstrated by positron emission tomography in individuals at risk of familial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1995; 186:17-20.

Kim Y, Davis LM, Sullivan PG, Maalouf M, Simeone TA, van Brederode J, Rho JM. Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons. *J. Neurochem.* 2007; 101:1316-1326.

LaManna JC, Harik SI. Regional comparisons of brain glucose influx. *Brain Res.* 1985; 326:299-305.

Leino RL, Gerhart DZ, Duelli R, Enerson BE, Drewes LR. Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem. Int.* 2001; 38:519-527.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH. Brain glucosensing and the  $K_{ATP}$  channel. 2001. *Nat. Neurosci.* 4; 459-460.

Lund-Andersen H. Transport of glucose from blood to brain. *Physiol. Rev.* 1979; 59:305-352.

Maalouf M, Sullivan PG, Davis LM, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 2007; 145:256-264.

Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res. Rev.* 2009; 59:293-315.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 1994; 8:1003-1011.

Mark RJ, Blanc EM, Mattson MP. Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 1996; 12:211-224.

Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:3545-3553.

Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 2003; 120:365-378.

Mastaitis JW, Wurmbach E, Cheng H, Sealfon SC, Mobbs CV. Acute induction of gene expression in brain and liver by insulin induced hypoglycemia. *Diabetes* 2005; 54:952-958.

Masuda R, Monahan JW, Kashiwaya Y. D -beta-hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J. Neurosci. Res.* 2005; 80:501-509.

McCrimmon RJ, Frier BM. Hypoglycaemia, the most feared complication of insulin therapy. *Diab. Metab.* 1994; 20:503-512.

McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 490:13-24.

McGowan JE, Chen L, Gao D, Trush M, Wei C. Increased mitochondrial reactive oxygen species production in newborn brain during hypoglycemia. *Neurosci. Lett.* 2006; 399:111-114.

McKenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe S. 2006. Energy metabolism of the brain. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, y Price MD. Capítulo 31 págs. 531-557. Academic Press, New York.

Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L. D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition in vivo. *Neurochem. Res.* 2006; 31:1399-1408.

Messari ES, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1998; 399:492-512.

Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2009; 16:741-761.

Morgenthaler FD, Koski DM, Kraftsik R, Henry PG, Gruetter R. Biochemical quantification of total brain glycogen concentration in rats under different glycemic states. *Neurochem. Int.* 2006; 48:616-622.

Mosek A, Natour H, Neufeld MY, Shiff Y, Vaisman N. Ketogenic diet treatment in adults with refractory epilepsy: a prospective pilot study. *Seizure.* 2009; 18:30-33.

Musa-Veloso K, Likhodii SS, Rarama E, Benoit S, Liu YM, Chartrand



D, Curtis R, Carmant L, Lortie A, Comeau FJ, Cunnane SC. Breath acetone predicts plasma ketone bodies in children with epilepsy on a ketogenic diet. *Nutrition* 2006; 22:1-8.

Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 1993; 40:163-221.

Nehlig A. Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia. *Diabetes Metab.* 1997; 23:18-29.

Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosci. Res.* 2006; 83:702-709.

Nordli DR Jr, Kuroda MM, Carroll J, Koenigsberger DY, Hirsch LJ, Bruner HJ, Seidel WT, De Vivo DC. Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics* 2001; 108:129-33.

Owen O, Morgan A, Kemp H, Sullivan J, Herrera M, Cahill G. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 1967; 46:1589-1595.

Pan J, Telang F, Lee J, Graaf A, Rothman D, Stein D, Hetherington H. Measurement of  $\beta$ -hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. *J. Neurochem.* 2001; 79:539-544.

Pardridge WM. Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* 1983; 63:1481-1535.

Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. En: *Fuel Homeostasis and the nervous system*. Editado por Vranic M, Efendic S, Hollenberg CH. 1991. pp 43-53.

Patel M, Owen O. Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. *Biochem. J.* 1976; 156:603-607.

Patel M, Owen O. Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. *J. Neurochem.* 1977; 28:109-114.

Patocková J, Marhol P, Tůmová E, Krsiak M, Rokyta R, Stípek S, Crkovská J, Andel M. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol. Res.* 2003; 52:131-135.

Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* 2005; 94:1-14.

Plecko B, Stoeckler-Ipsiroglu S, Schober E, Harrer G, Mlynarik V, Gruber S, Moser E, Moeslinger D, Silgoner H, Ipsiroglu O. Oral beta-hydroxybutyrate supplementation in two patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: monitoring of beta-hydroxybutyrate levels in blood and cerebrospinal fluid, and in the brain by in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr. Res.* 2002; 52:301-306.

Ratcheson RA, Blank AC, Ferrendelli JA. Regionally selective metabolic effects of hypoglycemia in brain. *J. Neurochem.* 1981; 36:1952-1958.

Rauchenzauner M, Klepper J, Leiendecker B, Luef G, Rostasy K, Ebenbichler C. The ketogenic diet in children with Glut1 deficiency syndrome and epilepsy. *J. Pediatr.* 2008; 153:716-718.

Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334:752-758.

Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, Saunders AM, Hardy J. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:284-289.

Robinson A, Williamson D. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 1980; 60:143-187.

Ruderman N, Ross P, Berger M, Goodman M. Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats. *Biochem. J.* 1974; 138:1-10.

Sandberg M, Butcher S, Hagberg M. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *In vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 1986; 47:178-184.

Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ. 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20:215-223.

Sims NR. Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1990; 27:691-693.

Siqueira IR, Fochesatto C, de Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2005; 23:663-671.

Singh P, Jain A, Kaur G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 260:153-159.

Smith SL, Heal DJ, Martin KF. KTX 0101: A potential metabolic approach to cytoprotection in major surgery and neurological disorders. *CNS Drugs Rev.* 2005; 11:113-140.

Sommerfield AJ, Deary IJ, McAulay V, Frier BM. Short-term, delayed, and working memory are impaired during hypoglycemia in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003a; 26:390-396.

Sommerfield AJ, Deary IJ, McAulay V, Frier BM. Moderate hypoglycemia impairs multiple memory functions in healthy adults. *Neuropsychology* 2003b; 17:125-132.

Sperling MA. Hypoglycemia in infants and children. En "Manual of endocrinology and metabolism" editado por Lavin N. Capítulo 32 págs. 477-488. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Strudwick SK, Carne C, Gardiner J, Foster JK, Davis EA, Jones TW. Cognitive functioning in children with early onset type 1 diabetes and severe hypoglycemia. *J. Pediatr.* 2005; 147:680-685.

Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J. Neurosci.* 2003; 23:10681-10690.

Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y, Swanson RA. Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol. Dis.* 2004; 16:538-545.

Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R\*,S\*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino) 3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007a; 321:45-50.

Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 2007b; 117:910-918.

Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, Chan PH, Swanson RA. Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28:1697-1706.

Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of A $\beta$  in pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 2009; 118:131-150.

Sutherland GR, Tyson RL, Auer RN. Truncation of the krebs cycle during hypoglycemic coma. *Med. Chem.* 2008; 4:379-385.

Suzuki M, Suzuki M, Sato K, Dohi S., Sato T, Matsuura A, Hiraide A. Effect of betahydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 2001; 87:143-150.

Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A.  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002; 89:36-43.

Tallroth G, Lindgren M, Stenberg G, Rosen I, Agardh CD. Neurophysiological changes during insulin-induced hypoglycaemia and in the recovery period following glucose infusion in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and in normal man. *Diabetologia* 1990; 33:319-323.

Tkacs NC, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Presumed apoptosis and reduced arcuate nucleus neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA in non-coma hypoglycemia. *Diabetes* 2000; 49:820-826.

Tkacs NC, Pan Y, Raghupathi R, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005; 25:1645-1655.

Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu DC, Yan SD, Naini A, Vila M, Jackson-Lewis V, Ramasamy R, Przedborski S. D-beta hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:892-901.



Van der Auwera, S. Wera, F. Van Leuven and S.T. Henderson, A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease, *Nutr. Metab. Lond* 2005; 2:28.

Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Vander Jagt TJ, Gomez MS, Gonzales DM, Deck LM, Royer RE. Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 53:1133-1140.

Westman EC, Yancy WS Jr, Mavropoulos JC, Marquart M, McDuffie JR. The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-glycemic index diet on glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2008; 19:5-36.

Wieloch T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 1985; 230:681-683.

Williamson D, Bates M, Page A, Krebs H. Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissue. *Biochem. J.* 1971; 121:41-47.

Wood T. Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Funct.*, 1986; 241-247.

Yamada KA, Rensing N, Thio LL. Ketogenic diet reduces hypoglycemia induced neuronal death in young rats. *Neurosci. Lett.* 2005; 385:210-214.

Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. Ketogenic diet, amino acid metabolism and seizure control. *J. Neurosci. Res.* 2001; 66:931-940.