



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE
MARCADORES DE ESTRÉS RETICULAR EN
CONDICIONES DE AUSENCIA DE GLUCOSA Y
SU PAPEL EN LA MUERTE NEURONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
QFB. SELENE GARCÍA DE LA CADENA FARFÁN



Tutor: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO

MÉXICO, D. F.

Septiembre 2011



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.

ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS RETICULAR EN CONDICIONES DE AUSENCIA DE GLUCOSA Y SU PAPEL EN LA MUERTE NEURONAL

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo, en el laboratorio AL-302 del Departamento de Neuropatología Molecular de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Karla Hernández Fonseca para la obtención de los resultados de los inmunoblots, los cuales se obtuvieron durante su estancia posdoctoral en el Departamento de Biología de la Facultad de Química bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Se reconoce la asesoría técnica de la Bióloga Teresa Montiel Montes.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (S112179). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (221026) para la realización de la presente tesis.

El jurado de examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Leonor Pérez Martínez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Clorinda Arias Álvarez	Inst. de Inv. Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A mis padres y mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Lourdes Massieu Trigo por la confianza, por permitirme colaborar en este proyecto, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y a mi formación, pero sobre todo, gracias por ser para mí, un gran ejemplo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Ignacio Camacho Arroyo y Dr. Roberto Coria Ortega por los comentarios y aportaciones al proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Leonor Pérez Martínez, Dra. Susana Castro Obregón, Dra. Rocío Salceda Sacanelles y Dra. Clorinda Arias Álvarez por sus comentarios y correcciones.

A Tere por su paciencia, sus consejos, todas sus enseñanzas y por hacer más amenos los momentos en el laboratorio.

A la Dra. Karla Hernández Fonseca por su amistad, su paciencia y su gran ayuda durante toda la maestría.

A mis amigos entrañables: Brenda Loaiza, Rodrigo Martínez, Judith Águilar y Armando López por compartir gran parte de mi vida, por todos sus consejos y esas interminables pláticas.

A mis compañeros de laboratorio: Julio, Sharlen, Lety, Cristian, Marlene y Emilio. Y a Ceci por toda su ayuda y sus pláticas a la hora de la comida.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	3
I. Introducción	5
1.1 La glucosa en el sistema nervioso central	5
1.2 Transportadores de glucosa	5
1.3 Metabolismo de glucosa	7
1.4 Hipoglucemia	8
1.5 Mecanismos de muerte neuronal inducidos por la hipoglucemia	9
1.5.1 Excitotoxicidad	11
1.5.2 Sistemas de regulación intracelular de calcio	12
1.6 El Retículo endoplásmico	13
1.6.1 El calcio en el retículo endoplásmico	14
1.6.2 Estrés del retículo endoplásmico	15
1.6.3 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	16
1.6.3.1 Cinasa asociada al retículo endoplásmico (PERK)	17
1.6.3.2 Factor de transcripción activado 6 (ATF6)	18
1.6.3.3 Endoribonucleasa que requiere inositol 1 (IRE 1)	18
1.6.4 Estrés reticular y apoptosis	20
1.6.5 Estrés reticular en la isquemia cerebral	25
II. Planteamiento del problema	28
III. Hipótesis	29
IV. Objetivos	30
V. Metodología	31
5.1 Cultivo de células	31
5.2 Evaluación del efecto de diferentes fármacos e inhibidores de caspasas en la muerte inducida por la ausencia de glucosa	31
5.3 Determinación de viabilidad celular	32
5.4 Condensación nuclear	32
5.5 Determinación de la actividad de la caspasa-3	33
5.6 Determinación de proteínas totales	34
5.7 Determinación de la actividad de la caspasa-12	34
5.8 Detección de marcadores de estrés reticular por inmunoblot	35
VI. Resultados	37
6.1 Efectos de la ausencia de glucosa en la muerte neuronal	37
6.2 Inducción de muerte neuronal apoptótica durante la ausencia de glucosa	40
6.3 Inducción de marcadores de estrés reticular durante la ausencia de glucosa	46
VII. Discusión	50

VIII. Conclusiones	56
IX. Perspectivas	57
X. Referencias	58

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-AMC	Ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina
AEBSF	4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluoruro
AG	Ausencia de glucosa
Apaf-1	Factor activador de la proteasa de apoptosis 1
ASB	Albúmina de suero bovino
ASK1	Cinasa 1 reguladora de señales de apoptosis
ATAD-AFC	Ac-Ala-Thr-Ala-Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina
CHAPS	(Hidrato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato)
DEVDCHO	Benciloxicarbonil-Asp-Glu-Val-Asp aldehído
DMEM	Medio Eagle's modificado dulbecco's
DR5	Receptor de muerte 5
DTT	Ditiotreitol
E-64	N-[N-(L-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina)
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
ERO1 α	Oxidoreductasa del retículo endoplásmico
GADD34	Gen 34 inducible por daño al ADN y arresto en el crecimiento
GCN2	Cinasa no reprimible del factor 2
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico); 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HRI	Cinasa regulada por el inhibidor hemo
JIK	Cinasa inhibidora N-terminal c-Jun
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ORP150	Proteína regulada por oxígeno de 150 kDa
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP1	Proteína fosfatasa 1
PSA	Persulfato de amonio
Q-ATAD-(OMe)-OPH	Quinolina-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-difluorofenoximetilcetona

QVDOPH	((N-(2-quinolil)valil-aspartil-(2,6-difluorofenoxi)metilcetona)) Quinolil-Val-Asp-OPH
RG	Reintroducción de glucosa
TBS	Amortiguador salino tris
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRB3	Proteína tribbles 3
Z-ATAD(OMe)-FMK	Benciloxicarbonil-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona

RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento subcelular que tiene un importante papel como almacén de calcio. Además de servir como depósito de calcio, una función central del RE es el plegamiento y procesamiento de proteínas de membrana y de secreción recién sintetizadas. Éstos, son procesos estrictamente dependientes de calcio que requieren de una alta concentración de este catión para su correcto funcionamiento. Cuando estas funciones se alteran, se produce un estado patológico conocido como estrés reticular, durante el cual, las proteínas mal plegadas se acumulan en el lumen del RE. La acumulación de proteínas mal plegadas es una forma severa de estrés que puede inducir apoptosis si el funcionamiento del RE no es restaurado. La función del RE puede alterarse a través de varios mecanismos, que incluyen, el vaciamiento de los depósitos de calcio del RE, el bloqueo de la glucosilación de proteínas, el bloqueo del proteosoma, el cual se requiere para degradar las proteínas mal plegadas, y la presencia de mutaciones en proteínas que impide que sean plegadas apropiadamente. Para hacer frente a estas condiciones, las células activan una respuesta que es altamente conservada en los organismos conocida como “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR). La principal función de la UPR es restaurar las funciones del RE reduciendo la carga de proteínas que necesitan ser plegadas y procesadas en el lumen e incrementar la capacidad para plegar y procesar proteínas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia del estrés reticular en neuronas de hipocampo cultivadas después de ser expuestas a un periodo de ausencia de glucosa, lo cual trae como consecuencia la muerte de las neuronas. Los mecanismos asociados a la muerte en esta condición no se conocen totalmente, pero experimentos de nuestro laboratorio sugieren que un aumento en la concentración de calcio intracelular participa en este proceso. Aunque no conocemos si la salida de calcio del retículo participa en el proceso de muerte. Un segundo objetivo de esta investigación fue evaluar la contribución del estrés reticular en la inducción a la muerte apoptótica durante esta condición. Para cumplir con estos objetivos se evaluó la presencia de algunos marcadores de

estrés reticular como la proteína de 78 k Da regulada por glucosa (GRP78), el factor de transcripción activado 4 (ATF4), la proteína homóloga que se une al potenciador CCAAT (CHOP), también conocida como gen 153 inducible por daño al ADN y arresto en el crecimiento (GADD153), y el factor de iniciación eucariótico 2 fosforilado en la subunidad α (eIF2 α -P), por medio de la técnica de inmunoblot. Además, se determinó la activación de la caspasa-3 y la caspasa-12 utilizando sustratos fluorogénicos. La presencia de apoptosis también se determinó cuantificando el número de núcleos fragmentados y condensados.

Los resultados indican la presencia de apoptosis, ya que hay un aumento en el número de núcleos apoptóticos y un aumento en la actividad de las caspasas 12 y 3 después de exponer a las células a la ausencia de glucosa. Se observó un efecto protector de la muerte y una reducción del número de núcleos apoptóticos en presencia de los inhibidores de caspasas. Por otra parte hay un aumento en el contenido de los marcadores de estrés reticular GRP78, CHOP, eIF2 α -P y ATF4 durante la privación de glucosa. Los datos sugieren que el estrés del RE se desencadena durante la privación de glucosa y que éste posiblemente contribuye a la muerte neuronal inducida en esta condición.

I. Introducción

1.1 La glucosa en el sistema nervioso central

El cerebro humano es un órgano que resulta muy caro en términos de uso de energía, ya que, aunque sólo representa el 2% del peso corporal total, la energía necesaria para mantener la función cerebral equivale a un 20% de la tasa metabólica de un individuo en reposo. El cerebro, requiere una gran cantidad de energía para el mantenimiento de los potenciales de membrana y las funciones relacionadas con la neurotransmisión. Como una comparación, el ATP consumido por gramo por minuto que es usado para la señalización en el cerebro, equivale a la energía que utiliza el músculo de una pierna de un corredor durante un maratón, o la energía que requiere el riñón para llevar a cabo su trabajo osmótico. Aproximadamente, el 75% de la energía consumida por el cerebro es utilizada en la señalización, mientras que el 25% restante se utiliza en funciones celulares esenciales, como, la síntesis y degradación de proteínas, nucleótidos y fosfolípidos, el transporte axoplásmico y para evitar la fuga de protones en la mitocondria (Attwell *et al.*, 2001).

El cerebro requiere de una fuente continua de oxígeno y sustratos energéticos. La glucosa es el principal sustrato energético usado por el cerebro adulto. Los porcentajes de transporte y utilización de glucosa son bajos en el cerebro en desarrollo e incrementan con la madurez. Los ácidos monocarboxílicos, como el lactato y los cuerpos cetónicos, acetoacetato y -hidroxibutirato, son también importantes sustratos energéticos durante la lactancia debido a su alto contenido en la leche materna. El lactato, parece tener un papel especial como fuente de energía disponible durante el periodo postnatal (Siegel *et al.*, 2006).

1.2 Transportadores de glucosa

La glucosa entra a las células por los sistemas facilitadores del transporte de glucosa o GLUT. Estos transportadores se expresan en todos los tejidos del organismo, constituyendo el principal mecanismo de entrada de la glucosa a todas las células. Los GLUT transportan la glucosa a favor de su gradiente de

concentración, de ahí el nombre de difusión facilitada (Castrejón *et al.*, 2007). Se han identificado 14 tipos de transportadores de glucosa (GLUT1–GLUT14), los cuales pueden ser dependientes o independientes de insulina. Para su estudio, se han dividido en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales. Estos transportadores son glucoproteínas cuya masa molecular fluctúa entre 45 y 55 kDa, contienen doce segmentos transmembranales conectados entre sí por asas hidrofílicas; la primera asa es externa y en algunos GLUT presenta un sitio de glucosilación. Tienen sus grupos amino y carboxilo terminales del lado citosólico de la membrana. La selectividad a la glucosa está determinada por una serie de secuencias de aminoácidos altamente conservadas (Simpson *et al.*, 2007; Castrejón *et al.*, 2007). En el cerebro se encuentran presentes algunos de estos transportadores, como el GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT5 (Simpson *et al.*, 2007).

El transportador GLUT1 es un transportador independiente de insulina. Hay dos isoformas de GLUT1, con pesos moleculares de 55 y 45 kDa, las cuales son codificadas por el mismo gen y difieren solo en el grado de glucosilación (Vannucci *et al.*, 1997). La isoforma de 55 kDa, que es comparable a la que se encuentra en la membrana de los eritrocitos, se encuentra exclusivamente en las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica, en la membrana luminal y abluminal. La isoforma menos glucosilada de 45 kDa del GLUT1 se localiza en todas las células gliales, así como en las membranas basolateral y apical de las membranas del plexo coroide y el epéndimo (Simpson *et al.*, 2007). El GLUT3 es un transportador independiente de insulina. En el cerebro se expresa predominantemente en las neuronas, encontrándose en estructuras de la materia gris y en la neurohipófisis (Maher *et al.*, 1994). El GLUT4 es un transportador dependiente de insulina que se expresa en neuronas. La expresión de este transportador coincide con la presencia del receptor de insulina, sugiriendo que la translocación de GLUT4 puede también estar regulada por insulina en el sistema nervioso central (Messari *et al.*, 1998). En el cerebro, se ha confirmado la existencia del mRNA y de la proteína GLUT4 en células granulares del giro dentado, el cerebelo y el bulbo olfatorio (Vannucci *et al.*, 1997). El GLUT5 se

considera principalmente como un transportador de fructosa, sin embargo su expresión ha sido detectada en una variedad de tejidos incluyendo el cerebro, donde los niveles de fructosa son bajos. En el cerebro se expresa exclusivamente en la microglia. El GLUT5 es un transportador poco eficiente de glucosa y probablemente contribuye poco al metabolismo de la glucosa cerebral (Maher *et al.*, 1994; Vannucci *et al.*, 1998).

Los transportadores de glucosa más ampliamente expresados en el cerebro son el GLUT1 y el GLUT3. Su expresión varía durante el desarrollo. Los niveles de GLUT1 y GLUT3 incrementan dramáticamente con la maduración cerebral y la sinaptogénesis (Siegel *et al.*, 2006).

En el cerebro, también se encuentran presentes transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs), los cuales son los responsables del transporte de lactato, piruvato, y los cuerpos cetónicos, acetoacetato y β -hidroxibutirato. Se han identificado 14 tipos de MCTs (MCT1-MCT14). En el cerebro se encuentran presentes cuatro de estos transportadores (Simpson *et al.*, 2007). El MCT1 se encuentra localizado en la barrera hematoencefálica y en los astrocitos. El MCT2 se expresa principalmente en neuronas. La expresión del MCT3 está limitada al plexo coroide. Por otro lado, el MCT4 se ha identificado en algunas células gliales. Estos transportadores se expresan en el cerebro en desarrollo, lo cual es consistente con la importancia de los ácidos monocarboxílicos como sustratos durante el periodo de lactancia (Siegel *et al.*, 2006).

1.3 Metabolismo de glucosa

En el cerebro, la glucosa es usada como el principal combustible metabólico. Una molécula de glucosa, es inicialmente degradada a dos moléculas de piruvato en un proceso glucolítico que ocurre en el citosol, seguido por la completa oxidación del piruvato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria. La glucólisis, tiene un rendimiento neto de 2 ATP por molécula de glucosa. Cuatro moléculas de ATP son generadas por cada molécula de glucosa convertida a piruvato, pero dos moléculas de ATP son requeridas en la vía

metabólica, una de esas reacciones es la fosforilación inicial de la glucosa. El segundo ATP generado es utilizado en la fosforilación de la fructosa 6-fosfato.

Durante la glucólisis, se forman dos moléculas de NADH a partir de NAD⁺ por molécula de glucosa. Bajo condiciones anóxicas, el NADH reacciona en el citosol con el piruvato, formando lactato y regenerando el NAD⁺ (con un rendimiento neto de 2 ATP por molécula de glucosa), pero bajo condiciones normales, las dos moléculas de NADH son oxidadas en la mitocondria, generando adicionalmente 5 moléculas de ATP.

En todos los tipos celulares el ciclo de Krebs, asociado con la fosforilación oxidativa, funciona como la principal fuente de energía. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato es descarboxilado a acetil coenzima A (Ac-CoA). La Ac-CoA se condensa con el oxalacetato presente en el ciclo del Krebs y durante una vuelta del ciclo, el oxalacetato es regenerado y está listo para condensarse con otra molécula de Ac-CoA. Un total de 32 moléculas de ATP por molécula de glucosa son producidos por el ciclo de Krebs, mientras, 2 ATP son generados por la glucólisis (Hertz, 2008).

1.4 Hipoglucemia

La hipoglucemia se define como la disminución en los niveles normales de glucosa (Saunders *et al.*, 2002). 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 glucagon 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 insulinoma que al sintetizar y liberar insulina de manera excesiva, produce la hipoglucemia (Haces *et al.*, 2005). La concentración fisiológica de glucosa en sangre oscila entre 90-110 mg/dl y se modifica en diversas situaciones. La ingestión de alimentos induce un aumento en los niveles de glucosa alrededor de 200 mg/dl, mientras

que en el ayuno prolongado su nivel disminuye hasta 60-40 mg/dl. Si el nivel de glucosa disminuye aún más (menor a 20 mg/dl) se puede presentar una hipoglucemia severa que se acompaña del cese de la actividad eléctrica del cerebro (Haces *et al.*, 2005). Existen mecanismos encargados de mantener los niveles de glucosa dentro del rango fisiológico. Cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen por debajo de 81 mg/dl disminuye la secreción de insulina de las células β pancreáticas. Una disminución por debajo de 68 mg/dl aumenta la secreción de glucagón y epinefrina. Si la concentración de glucosa en sangre continúa bajando hasta 54 mg/dl se activa la respuesta simpatoadrenal que causa síntomas autonómicos (neurogénicos), como son aumento del ritmo cardiaco, sudoración, debilidad, irritabilidad, ansiedad y temblores. Cuando se alcanza este nivel de glucosa, también se presentan síntomas neurológicos (neuroglucopénicos), que incluyen sensación de calor, debilidad, fatiga, dificultad para pensar, confusión, fallas en la visión y dolor de cabeza. La percepción de estos síntomas, particularmente los síntomas neurogénicos, induce al organismo a la ingesta de alimentos. Si todos esos mecanismos de defensa fallan y los niveles de glucosa alcanzan los 50 mg/dl se puede presentar una disminución en la cognición, conducta aberrante y crisis epilépticas. El coma, se puede presentar cuando los niveles de glucosa se encuentran en el rango de 41-49 mg/dl, así como a niveles de glucosa más bajos. Todas esas respuestas son típicamente corregidas después de que la concentración de glucosa en plasma se restaura. El daño neurológico permanente es raro. Sin embargo, la hipoglucemia profunda y prolongada puede causar muerte cerebral (20 mg/dl) (Cryer 2007). La muerte neuronal hipoglucémica es más pronunciada en poblaciones de neuronas específicas, como las neuronas de la región CA1 del hipocampo, el subículo, el giro dentado, las capas corticales 2 y 3 de la corteza cerebral y el estriado dorso lateral. Mientras que otras áreas como el cerebelo y el tallo cerebral son más resistentes (Auer *et al.*, 1984; Auer 1986).

1.5 Mecanismos de muerte neuronal inducidos por la hipoglucemia

Una variedad de mecanismos están involucrados en la patogénesis de la muerte neuronal inducida durante la hipoglucemia (Cryer 2007) y la isquemia cerebral (reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral) (Durukan *et al.*, 2007). En la cascada de muerte neuronal hipoglucémica e isquémica participan: 1) el colapso de los gradientes iónicos como consecuencia de la interrupción de los procesos dependientes de ATP; 2) la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y el incremento intracelular de Ca^{2+} ; 3) la liberación masiva de aminoácidos excitadores y el consiguiente incremento de su concentración en el espacio extracelular, 4) la activación de los receptores de glutamato y la subsiguiente despolarización y entrada de calcio; 5) la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS) y 6) apoptosis y necrosis (Dirnagl *et al.*, 1999; Aguilera *et al.*, 2007; Durukan *et al.*, 2007). Se ha propuesto que el daño neuronal asociado con estas condiciones puede ocurrir por un mecanismo excitotóxico, provocado por la liberación de glutamato, y particularmente de aspartato (Wieloch 1984; Sandberg *et al.*, 1986). Recientemente, se ha sugerido que la liberación neuronal de zinc, la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa, la transición de la permeabilidad mitocondrial (Friberg *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 2003; Cryer 2007) y la producción de ROS y RNS (Suh *et al.*, 2008, Páramo *et al.*, 2010), también participan en la muerte neuronal hipoglucémica. Las especies reactivas (RS) generadas pueden reaccionar irreversiblemente con varios constituyentes celulares tales como proteínas, dobles enlaces de fosfolípidos y ADN, provocando peroxidación lipídica, daño a la membrana y mutaciones del genoma (Durukan *et al.*, 2007). La peroxidación de lípidos en el cerebro ha sido observada durante la hipoglucemia aguda inducida por insulina en el ratón y la rata (Ballesteros *et al.*, 2003; Patočková *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; Haces *et al.*, 2008).

Las fuentes generadoras de estas especies reactivas (RS) en la condición hipoglucémica no se conocen totalmente. La mitocondria ha sido propuesta como una fuente de ROS en la hipoglucemia y la isquemia-reperfusión. Sin embargo, estas especies pueden ser generadas por otras vías. Recientemente se sugirió la

participación del superóxido generado por la acción de la NADPH oxidasa. Suh y colaboradores usando cultivos celulares y un modelo de hipoglucemia aguda seguida de la reintroducción de glucosa, encontraron que la producción de superóxido se incrementa por la activación de la NADPH oxidasa durante el periodo de reperfusión de glucosa (Suh *et al.*, 2007). En experimentos previos de nuestro laboratorio, utilizando un modelo de privación de glucosa en neuronas de hipocampo cultivadas, se observó que las RS incrementan rápidamente durante la privación de glucosa, de una manera dependiente de la activación de los receptores NMDA y no NMDA y de la presencia de calcio (Páramo *et al.*, 2010). En este trabajo, se observó que la producción de superóxido depende de la activación de las enzimas, fosfolipasa A₂ (cPLA₂) y xantina oxidasa (XaO), las cuales se activan por calcio y contribuyen al daño neuronal. También se observó que la concentración de calcio intracelular se incrementa progresivamente durante el periodo de privación de glucosa (Páramo *et al.*, 2010), y que se activa la calpaína, una proteasa dependiente de calcio asociada con el daño excitotóxico (Páramo *et al.*, datos no publicados). Además, la salida de calcio del RE posiblemente contribuye a la activación de esta proteasa ya que bloqueadores de los receptores a inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃R) y a rianodina (RyR), previenen su activación (Páramo *et al.*, datos no publicados).

Por otra parte, en un modelo de inhibición glucolítica utilizando cultivos neuronales de hipocampo expuestos a yodoacetato (IOA), un inhibidor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se observó un incremento de las RS dependiente de la presencia de calcio y de la activación de los receptores a glutamato de tipo NMDA, la cual precede y contribuye a la muerte celular (Hernández-Fonseca *et al.*, 2005). Además, la salida de calcio de depósitos del RE posiblemente, participa en la producción de RS y en la muerte neuronal ya que el quelante de calcio intracelular, BAPTA-AM, y bloqueadores de los IP₃R y RyR presentes en el RE previenen la generación de RS y aumentan la sobrevivencia celular (Hernández-Fonseca *et al.*, 2005).

1.5.1 Excitotoxicidad

Durante la hipoglucemia y la isquemia se altera la producción de ATP (Durukan *et al.*, 2007). La falla energética provoca que la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ sea deficiente, provocando la despolarización de la terminal presináptica. En estas condiciones 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 de aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato, incrementando su concentración en el espacio extracelular (Gundersen *et al.*, 2001). La acumulación de glutamato también se debe a una falla en los sistemas de recaptura y de la enzima que cataliza la conversión de glutamato a glutamina, la glutamino sintetasa, ya que ambos dependen de ATP (Bonde *et al.*, 2005).

El término excitotoxicidad se emplea para definir el daño neuronal inducido por la sobreexcitación de los receptores de glutamato (Olney, 1994). En la membrana postsináptica el glutamato y el aspartato se unen a distintos tipos de receptores. Entre ellos, los receptores ionotrópicos que se han denominado de acuerdo a sus agonistas farmacológicos: el receptor de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA) y el receptor a kainato. Estos dos últimos receptores están acoplados a canales iónicos permeables a Na^+ , que al activarse provocan un incremento intracelular de este ión generando la despolarización de la neurona postsináptica. Por otro lado, al despolarizarse las neuronas, el ión magnesio que normalmente bloquea el receptor NMDA es removido y el receptor es activado por la unión del glutamato y la glicina. La activación de estos receptores provoca la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al interior de la célula. Esta despolarización también favorece la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, incrementándose de esta forma la toxicidad vía el exceso intracelular de Ca^{2+} (Camacho *et al.*, 2006).

Las alteraciones en la homeostasis de calcio intracelular están implicadas en algunas condiciones neuropatológicas, incluyendo la isquemia cerebral, la hipoglucemia y la epilepsia (Paschen 2000). Los procesos de muerte celular

asociados con esas enfermedades involucran un mecanismo excitotóxico mediado por la activación de los receptores de glutamato, principalmente de tipo NMDA, los cuales son altamente permeables a calcio (Hernández-Fonseca *et al.*, 2005).

1.5.2 Sistemas de regulación intracelular de calcio

El Ca^{2+} puede entrar a la célula a través de los receptores de glutamato, principalmente los de tipo NMDA y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El aumento intracelular no sólo se debe a la entrada de Ca^{2+} , sino también a su liberación de organelos intracelulares como el retículo endoplásmico, mecanismo mediado por el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y por la activación del receptor a rianodina (Neumar, 2000). La pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular genera la activación de una gran variedad de enzimas involucradas en la muerte neuronal entre las que se incluyen: fosfolipasas (A_2 y C), proteasas (calpaína), endonucleasas, proteína cinasa C, ciclooxigenasa y óxido nítrico sintasa (Bano *et al.*, 2007). El aumento citosólico de Ca^{2+} provoca además la entrada masiva de este ión a la mitocondria. Este aumento de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, induce la despolarización de la membrana mitocondrial, la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MTP) y la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c y el factor inductor de la apoptosis (AIF), que activan la cascada de caspasas, ó la apoptosis independiente de caspasas, respectivamente (Berridge, 2002). La activación de ciertas enzimas y el daño generado en la mitocondria contribuyen a la producción de radicales libres (Dirnagl *et al.*, 1999, Páramo *et al.*, 2010). Además, un aumento en la concentración de calcio intracelular puede tener lugar en condiciones de falla energética. En estas condiciones, se presentan deficiencias en el funcionamiento de los sistemas de extrusión de calcio dependientes de ATP como la ATPasa de calcio de la membrana plasmática, y de almacenamiento en el retículo por la ATPasa de calcio presente en este organelo.

1.6 El Retículo endoplásmico

El RE es quizás el organelo intracelular más grande, está formado por endomembranas organizadas en un complejo sistema de microtúbulos y cisternas. En las neuronas, el RE se extiende desde el núcleo y el soma a las dendritas y a través del axón a las terminales presinápticas (Verkhatsky, 2005). De acuerdo a la presencia o ausencia de ribosomas el RE se denomina: RE rugoso y liso, respectivamente. El RE juega un papel central en la biosíntesis celular. Su membrana es el lugar de producción de todas las proteínas transmembranales y lípidos de la mayoría de los organelos celulares, incluyendo el propio RE, el aparato de Golgi, los lisosomas, los endosomas, las vesículas secretoras y la membrana plasmática. La membrana del RE, también contribuye de forma importante a la formación de las membranas de las mitocondrias y de los peroxisomas, ya que produce los lípidos de estos organelos. Además, todas las proteínas que serán secretadas al exterior celular y también las que permanecen en el lumen del RE, en el aparato de Golgi o en los lisosomas, son inicialmente transportadas al lumen del RE.

El RE es también, un organelo que lleva a cabo importantes funciones como son, el procesamiento de xenobióticos. Algunas de estas reacciones de detoxificación son llevadas a cabo por enzimas de la familia de la citocromo P450, las cuales se encuentran principalmente en el RE liso (Alberts *et al.*, 2002).

1.6.1 El calcio en el retículo endoplásmico

El calcio es una molécula de señalización que influye en una variedad de procesos celulares. El calcio afecta directamente la traducción y expresión de genes, la síntesis de proteínas y esteroides, la modificación, plegamiento y secreción de proteínas y promueve la apoptosis. Además, la señalización de calcio también influye en la excitabilidad de la membrana (Groenendyk *et al.*, 2006).

El RE es el organelo más importante que regula la homeostasis de calcio intracelular. Dicha homeostasis se logra por el bombeo activo de calcio del citoplasma al RE, en conjunción con el amortiguamiento de calcio por proteínas residentes del RE, como la calreticulina, la calnexina, la calsecuestrina, las

proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78) y las proteínas disulfuro isomerasas (PDI, ERp72 y ERp57). En condiciones basales, un gradiente de varios órdenes de magnitud es establecido entre el lumen del RE (~ 0.5 mM) y el citoplasma (~ 100 nM) por acción de la ATPasa del Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA). Esta ATPasa es responsable de la entrada de calcio al RE. Por otro lado, el calcio es liberado al citoplasma a través de los canales de los IP_3R y RyR (Hernández-Fonseca *et al.*, 2007). El RyR es una proteína tetramérica de alto peso molecular (aproximadamente 500 kDa por monómero). La familia del RyR tiene tres isoformas, todas expresadas en el cerebro. La modulación de los RyR ocurre a través de la acción de ligandos endógenos como el calcio, purinas y proteínas accesorias, así como por la acción de fosforilación de varias cinasas. Tres dominios son reconocidos en la estructura de los RyR: 1) un dominio citoplásmico grande que contiene el N-terminal y el sitio regulador; 2) un dominio transmembranal localizado hacia el C-terminal que incluye el poro permeable al ión; 3) un dominio luminal el cuál interactúa con calsecuestrina, y es mucho más pequeño que el dominio citoplásmico. Estos receptores tienen múltiples sitios alostéricos de unión a calcio, responsables de la liberación de calcio al citosol inducida por calcio (Hernández-Fonseca *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2009). Los IP_3R (isoformas I, II y III) son también expresados en el cerebro y activados por el IP_3 un producto metabólico de la actividad de la fosfolipasa C (Ruiz *et al.*, 2009). Estos receptores pueden ser bloqueados por heparina el cual antagoniza el reconocimiento entre el IP_3 y su receptor (Hernández-Fonseca *et al.*, 2007). Por otro lado, el calcio acumulado en el citosol es removido de la célula por la acción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y la ATPasa del Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) (Berridge *et al.*, 2003).

1.6.2 Estrés del retículo endoplásmico

Varios factores son requeridos para el óptimo plegamiento de proteínas, incluyendo ATP, calcio y un medio ambiente oxidante para permitir la formación de los enlaces disulfuro (Gaut *et al.*, 1993). Como consecuencia de este ambiente especial, el RE es altamente sensible a diferentes formas de estrés que alteren los

niveles energéticos celulares, el estado redox o la concentración de calcio. Algunas condiciones, como la ausencia de glucosa, la falla en el plegamiento, el transporte y la degradación de proteínas, así como la baja glicosilación de proteínas reducen la capacidad de plegamiento de estas en el RE. Esto, provoca la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas, una condición conocida como estrés reticular (Szegezdi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006). Experimentalmente, el estrés reticular puede ser inducido por agentes farmacológicos que inhiben la glucosilación de proteínas (tunicamicina), bloquean el transporte del RE al aparato de Golgi (brefeldina A), impiden la formación de enlaces disulfuro (DTT) o bien, alteran los depósitos de calcio del RE (tapsigargina, un inhibidor de la SERCA o A-23187, un ionóforo de calcio) (Breckenridge *et al.*, 2003).

El estrés reticular se ha asociado con numerosas condiciones fisiopatológicas, incluyendo algunas enfermedades neurodegenerativas como: la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington y algunas enfermedades generadas por priones (Rao *et al.*, 2004; Lindholm *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009). Todas esas enfermedades tienen una característica común: la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas. Además, de las arriba mencionadas, otras alteraciones están relacionadas con la activación del estrés reticular. Éstas incluyen, al cáncer, la diabetes tipo I y II (Kaufman, 2002; Zhao *et al.*, 2006), la aterosclerosis, la degeneración muscular, las enfermedades cardíacas y la isquemia cerebral (Kim *et al.*, 2008).

1.6.3 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

La célula responde al estrés reticular activando una cascada de señalización conocida como “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR) (Zhao *et al.*, 2006). La activación de la UPR resulta, primero, en una disminución de la síntesis de proteínas, segundo, en una inducción de los genes que codifican proteínas chaperonas, y otras proteínas que previenen la agregación de polipéptidos y participan en el plegamiento de éstos (Yoneda *et al.*, 2001), y

tercero incrementa la degradación asociada al RE (ERAD) para eliminar las proteínas mal plegadas (Rao *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). La UPR es una respuesta de supervivencia que reduce la acumulación de proteínas mal plegadas y restaura el funcionamiento normal del RE (Szegezdi *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando el estrés reticular es severo y prolongado, se induce la apoptosis (Boyce *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

En mamíferos la vía de señalización de la UPR es iniciada por tres proteínas transmembrana residentes del RE: la cinasa asociada al retículo endoplásmico (PERK), el factor de transcripción activado 6 (ATF6) y la endoribonucleasa que requiere inositol 1 (IRE1) (Merksamer *et al.*, 2010). Estas proteínas transmembrana responsables de iniciar la UPR tienen un dominio N-terminal en el lumen del RE y dominio C-terminal en el citosol (Kim *et al.*, 2008). En condiciones fisiológicas, la actividad de estas tres proteínas es suprimida por su unión a la proteína regulada por glucosa de 78 k Da (GRP78). Sin embargo, bajo condiciones de disfunción del RE, cuando las proteínas mal plegadas se acumulan en el lumen del RE, GRP78 se disocia de PERK, ATF6 e IRE1 y se une a las proteínas mal plegadas para facilitar su plegamiento (Paschen *et al.*, 2005).

1.6.3.1 Cinasa asociada al retículo endoplásmico (PERK)

PERK es una proteína transmembrana del tipo I que tiene un dominio cinasa citosólico y un dominio luminal N-terminal que es homólogo al de IRE1. La disociación de GRP78 de PERK provoca su dimerización, autofosforilación y activación (Figura 1). PERK, también puede ser activada por la unión directa de las proteínas mal plegadas a su dominio luminal (Merksamer *et al.*, 2010). Después de ser activada, PERK es convertida en una cinasa que específicamente fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF2 α), fosforilándolo en la serina 51 (Szegezdi *et al.*, 2006). La fosforilación de eIF2 α , causa una inhibición global de la síntesis de proteínas, ya que el eIF2 α fosforilado se une con gran afinidad al factor eIF2B, se inhibe el reciclamiento de GDP por GTP y no se puede formar el complejo ternario (DeGracia *et al.*, 2002; Brush *et al.*, 2003). Sin embargo, esta inhibición de la traducción no es absoluta, RNAs que

tienen pequeños marcos de lectura abiertos en su extremo 5' no traducido, pueden evitar el bloqueo de la traducción dependiente de eIF2 α . El más estudiado de esos genes es ATF4. Este gen codifica para un factor de transcripción que se une a genes que contienen en su promotor una secuencia conocida como "elemento de respuesta a AMPc" (CRE) (Szegezdi *et al.*, 2006). ATF4 promueve la supervivencia neuronal mediante la inducción de genes involucrados en el transporte y síntesis de aminoácidos, la biosíntesis de glutatión y la resistencia al estrés oxidativo (Schröder *et al.*, 2005). Sin embargo, no todos los genes inducidos por ATF4 favorecen la supervivencia y restauración del funcionamiento del RE. ATF4, también induce la expresión de un gen que codifica para la proteína homóloga que se une al potenciador CCAAT (CHOP), también conocido como gen 153 inducible por daño al ADN y arresto en el crecimiento (GADD153). CHOP/GADD153 es un gen cuya expresión promueve la muerte celular apoptótica (Szegezdi *et al.*, 2006) (Figura 1).

1.6.3.2 Factor de transcripción activado 6 (ATF6)

Existen dos isoformas de ATF6 que son expresadas en las células de mamíferos (ATF6 α y ATF6 β). ATF6 es una proteína transmembrana del tipo II, la porción citoplasmática tienen un dominio de cierre de leucina (bZIP) y un dominio de activación transcripcional (Rasheva *et al.*, 2009). La vía de activación de ATF6 involucra un inusual mecanismo denominado proteólisis intramembrana regulada (RIP) por el cual, la proteína se transloca del RE al aparato de Golgi para el procesamiento proteolítico (Lai *et al.*, 2007). En ausencia de estrés reticular, la chaperona GRP78 se encuentra unida al dominio luminal de ATF6 y bloquea la señal de localización a Golgi, previniendo su translocación. Sin embargo, en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 se disocia de ATF6 y este viaja al aparato de Golgi por vía vesicular (Boyce *et al.*, 2006). Una vez en el aparato de Golgi ATF6 (90 kDa) es cortado primero por la proteasa del sitio 1 (S1P) y después en una región intramembrana por la proteasa del sitio 2 (S2P) finalmente, el dominio citosólico resultante se transloca al núcleo (Ron *et al.*, 2007). Este fragmento de 50 kDa induce la expresión de genes que tienen en su

promotor elementos de respuesta a estrés reticular (ERSE). Algunos de los genes inducidos por ATF6, incluyen a las proteínas chaperonas GRP78 y GRP94, la proteína disulfuro isomerasa, el factor de transcripción XBP1 (X-box binding protein 1), y el factor de transcripción CHOP. Aunque ATF6 puede inducir la expresión de CHOP, no hay reportes que relacionen a ATF6 con la apoptosis inducida por estrés reticular; por lo tanto parece que ATF6 promueve la sobrevivencia y contrarresta el estrés reticular (Paschen *et al.*, 2005; Szegezdi *et al.*, 2006) (Figura 1).

1.6.3.3 Endoribonucleasa que requiere inositol 1 (IRE1)

Dos isoformas de IRE1 han sido identificadas en mamíferos (IRE1 α e IRE1 β). IRE1 α es expresada en la mayoría de las células y tejidos, con altos niveles de expresión en el páncreas y en la placenta. IRE1 β es expresada sólo en las células epiteliales del intestino (Boyce *et al.*, 2006; Malhotra *et al.*, 2007). IRE1 es una proteína transmembrana del tipo I que tiene una actividad dual, ya posee un dominio cinasa de serina-treonina y un dominio de endoribonucleasa (Raghubir *et al.*, 2011).

Durante el estrés reticular, GRP78 se disocia de IRE1 permitiendo su oligomerización y autofosforilación. Se ha sugerido también, que IRE1 es activada directamente por la unión de las proteínas mal plegadas a su dominio luminal. Este dominio de IRE1, es parecido al dominio de unión a péptidos presente en las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (Lai *et al.*, 2007; Ron *et al.*, 2007). Una vez activada IRE1, su actividad de endonucleasa corta un intrón de 26 nucleótidos, dando como resultado un cambio del marco de lectura. El mRNA xbp1 procesado es traducido en una proteína de 54 kDa, esta proteína es más estable que aquella codificada por el mRNA precursor y funciona como un factor de transcripción. XBP1 activa la transcripción de genes, incluyendo grp78, grp94, edem y un miembro de la familia HSP40, P58^{IPK} (Paschen *et al.*, 2005; Malhotra *et al.*, 2007; Raghubir *et al.*, 2011). P58^{IPK} se une e inhibe a PERK liberando del bloqueo traduccional mediado por PERK. La inducción de P58^{IPK} representa la terminación de la UPR. En este punto, si la UPR fue exitosa, el RE regresa a su

funcionamiento normal y la célula sobrevive; sin embargo, si el estrés persiste la liberación del bloqueo de la traducción por P58^{IPK} podría permitir la síntesis de proteínas pro-apoptóticas. La deficiencia de P 58^{IPK} puede resultar en una prolongada actividad de PERK después del estrés reticular y el bloqueo de la traducción de proteínas por un tiempo considerable. Esto puede conducir a un déficit de proteínas vitales. Además, la expresión aumentada de ATF4 y de CHOP ha sido detectada después del silenciamiento del gen de P58^{IPK} (Szegezdi *et al.*, 2006) (Figura 1).

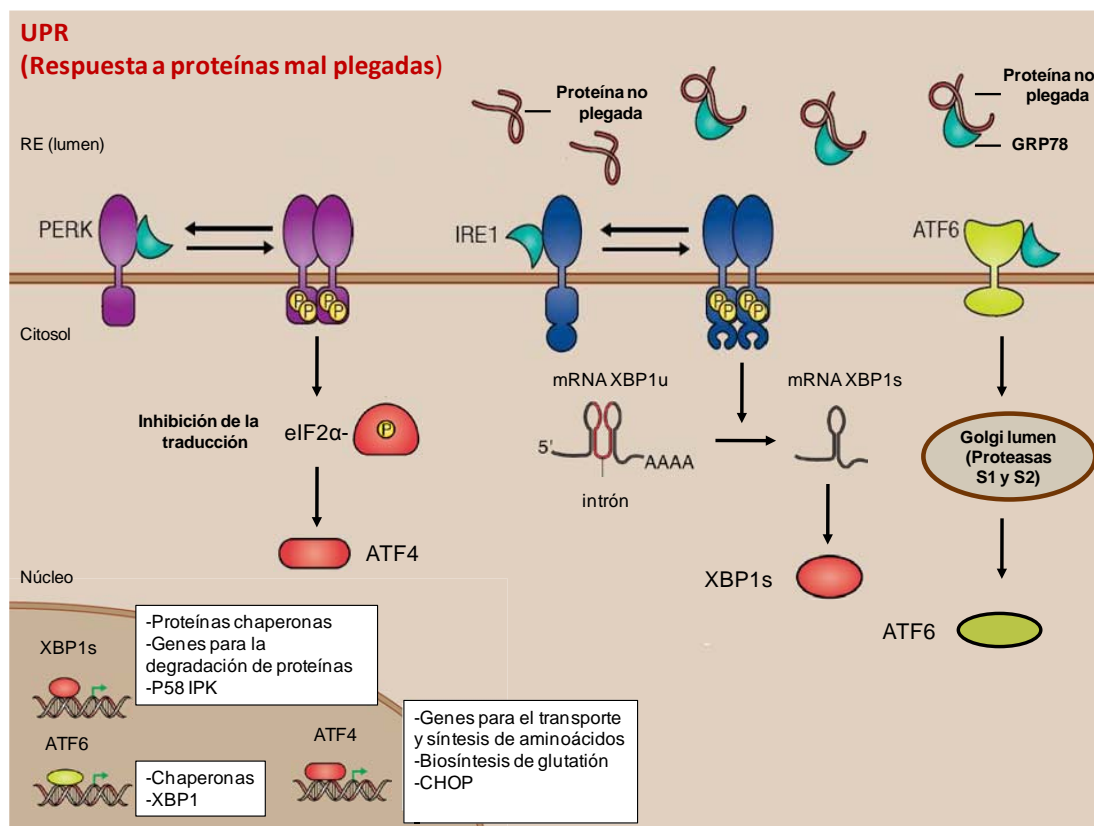


FIG 1. Vías de señalización de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Las proteínas transmembrana residentes del RE: PERK, IRE1 y ATF6 regulan la UPR a través de sus respectivas cascadas de señalización. Modificado de Merksamer *et al.*, 2010.

1.6.4 Estrés reticular y apoptosis

La apoptosis celular se puede clasificar según su vía de ejecución, en dos subtipos, la vía extrínseca y la vía intrínseca (Denault *et al.*, 2002), siendo esta última la vía que se ha relacionado directamente con la muerte por estrés reticular. Las tres vías de la UPR contribuyen a inducir apoptosis cuando los cambios generados en la célula son insuficientes para restaurar el funcionamiento del RE. La proteína CHOP, la cinasa JNK y las caspasas han sido involucradas en la activación de la apoptosis en respuesta al estrés reticular (Lai *et al.*, 2007).

CHOP, es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas que se unen al potenciador CCAAT (C/EBP). CHOP fue originalmente identificado en respuesta al daño al ADN, pero su inducción es más sensible a condiciones de estrés reticular (Zinszner *et al.*, 1998). Durante el estrés reticular prolongado, las

tres vías de señalización de la UPR inducen la transcripción de CHOP, sin embargo la vía de PERK-eIF2 α -ATF4 es esencial (Oyadomari *et al.*, 2004; Szegezdi *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007).

Aunque el mecanismo preciso por el cual CHOP media la apoptosis es desconocido, se sabe que CHOP activa la transcripción de varios genes que pueden potenciar la apoptosis. Esos genes incluyen, al gen que codifica para la oxidoreductasa del retículo endoplásmico (ERO1 α), el receptor de muerte 5 (DR5) (Boyce *et al.*, 2006), la anhidrasa carbónica VI, la proteína tribbles 3 (TRB3) y el gen 34 inducible por daño al ADN y arresto en el crecimiento (GADD34) (Malhotra *et al.*, 2007). Aunque CHOP principalmente induce la expresión de genes, Bcl-2 es un ejemplo de un gen cuya expresión es disminuida por CHOP (Boyce *et al.*, 2006; Szegezdi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). El aumento en la expresión de ERO1 α inducido por CHOP genera un ambiente hiperoxidante en el RE produciendo un incremento en la formación de proteínas mal plegadas (Lai *et al.*, 2007). DR5 codifica un receptor de muerte de superficie que puede activar la cascada de caspasas. La anhidrasa carbónica VI puede disminuir el pH intracelular durante el estrés reticular (Malhotra *et al.*, 2007). Ha sido propuesto que durante el estrés reticular prolongado TRB3 se une a la cinasa Akt, previniendo su fosforilación y reduciendo su actividad de cinasa. GADD34 es una proteína que interactúa con la proteína fosfatasa 1 (PP1) que provoca la desfosforilación de eIF2 α , (Figura 2). Se ha observado que durante el estrés reticular, las células GADD34^{-/-} muestran una persistente fosforilación de eIF2 α y pocos agregados de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico, sugiriendo que la función de GADD34 y la remoción de la fosforilación de eIF2 α son proapoptóticos en este contexto. Además, los ratones GADD34^{-/-} son resistentes a los efectos tóxicos de la tunicamicina (Boyce *et al.*, 2006). El mecanismo por el cual GADD34 promueve la apoptosis es desconocido, aunque existen varias teorías. Por ejemplo, la restauración de la síntesis de proteínas debido a la inducción de GADD34 podría permitir la síntesis de proteínas proapoptóticas (Szegezdi *et al.*, 2006). Por otro lado, un inhibidor farmacológico selectivo de la fosfatasa de eIF2 α

salubrinal, puede proteger a las células de la apoptosis inducida por estrés reticular (Boyce *et al.*, 2006; Sokka *et al.*, 2007; Reijonen *et al.*, 2008) (Figura 2).

Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 son importantes reguladores de la muerte celular apoptótica. Hasta hace poco se pensaba que las proteínas Bcl-2 regulaban exclusivamente la vía apoptótica mediada por mitocondria. Los primeros reportes que relacionaron la muerte celular inducida por estrés reticular a la familia de proteínas Bcl-2 mostraron que la sobreexpresión de Bcl-2 o la deficiencia de Bax y Bak proporcionaban protección contra el estrés reticular (Szegezdi *et al.*, 2006; Malhotra *et al.*, 2007). Recientemente se encontró que el factor de transcripción CHOP incrementa la transcripción de Bim durante el estrés reticular, haciendo una importante conexión entre un componente de la señalización de la UPR y la familia de proteínas Bcl-2. Además de regular la expresión de Bim, se ha reportado que CHOP disminuye la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Merksamer *et al.*, 2010) (Figura 2).

Otra vía de señalización que opera en paralelo con CHOP está mediada por la cinasa N-terminal c-Jun (JNK). La señalización de JNK incrementa durante el estrés reticular de una manera que depende de la activación de IRE1 y de la cinasa 1 reguladora de señales de apoptosis (ASK1) (Merksamer *et al.*, 2010). Una vez activado, el dominio citoplásmico de IRE1 se asocia con el factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF2). Esta asociación es regulada por la cinasa inhibidora N-terminal c-Jun (JIK), la cual se ha reportado que interactúa con IRE1 y TRAF2 (Yoneda *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2007). El complejo IRE1/TRAF2 después se asocia con ASK1, causando su activación e iniciando una cascada de fosforilación que resulta en la fosforilación y activación de JNK (Boyce *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007; Malhotra *et al.*, 2007). La cinasa JNK promueve la apoptosis a través de varias interacciones con miembros de la familia Bcl-2. Hay evidencias de que JNK puede fosforilar e inhibir a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1. Además, JNK puede también fosforilar y activar varias proteínas que tienen sólo el dominio BH3, como Bid y Bim para promover la apoptosis (Merksamer *et al.*, 2010). La actividad

proapoptótica de Bim es normalmente inhibida por su unión al complejo motor de dineína del citoesqueleto. La fosforilación por JNK libera a Bim del complejo, permite su translocación al RE e inicia la cascada apoptótica dependiente de Bax y Bak (Szegezdi *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007) (Figura 2). En contraste la proteína antiapoptótica Bcl-xL se une a Bim e inhibe su translocación al retículo endoplásmico (Hussain *et al.*, 2007).

Además de la inducción de CHOP y la activación de la cinasa JNK; las caspasas, una familia de proteasas de cisteína pueden contribuir a la apoptosis inducida por estrés reticular (Boyce *et al.*, 2006). En diferentes estudios en donde se ha inducido estrés del retículo se ha observado el procesamiento de las caspasas 2, 3, 4, 7, 9 y 12 (Szegezdi *et al.*, 2006; Malhotra *et al.*, 2007). Sin embargo, la caspasa-12 ha sido propuesta como un mediador clave de la muerte apoptótica, debido a que es activada específicamente por estrés reticular y no por receptores de muerte o por señales apoptóticas mediadas por la mitocondria (Yoneda *et al.*, 2001; Szegezdi *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007). Dicha caspasa es expresada sólo en roedores, debido a que su homólogo en humanos ha sido silenciado por varias mutaciones durante la evolución (Szegezdi *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la caspasa-4 humana tiene una homología del 48 % con la caspasa-12 murina, se encuentra también localizada en la membrana del RE y es requerida en la apoptosis inducida por estrés reticular (Boyce *et al.*, 2006). Por estas razones, se ha propuesto que la caspasa-4 es la encargada de cumplir la función de la caspasa-12 en humanos (Szegezdi *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007). La caspasa-12 contiene un prodominio grande responsable de la interacción con varias proteínas adaptadoras (dominio CARD) y dos subunidades catalíticas: p20 y p10 (Szegezdi *et al.*, 2003). La procaspasa-12 se encuentra localizada en el lado citoplásmico del RE, formando un complejo estable con la proteína adaptadora TRAF2 (Yoneda *et al.*, 2001). Esta caspasa puede ser activada por varias formas, por ejemplo, los factores proapoptóticos Bax y Bak presentes en la membrana del RE forman oligómeros que permiten la salida de calcio del RE al citoplasma. Este incremento en las concentraciones de calcio

citoplásmico activan a la proteasa dependiente de calcio, calpaína, la cual posteriormente corta y activa a la caspasa-12 para iniciar la apoptosis dependiente de caspasas (Wu *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007; Malhotra *et al.*, 2007) (Figura 2). Por otro lado, la interacción de IRE1 con TRAF2 está también implicada en la activación de la procaspasa-12 (Hussain *et al.*, 2007). La formación de este complejo libera a la procaspasa-12 de TRAF2, al ser liberada, la procaspasa experimenta homodimerización y autoprocésamiento (Yoneda *et al.*, 2001; Szegezdi *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). Otro mecanismo propuesto para la activación de la caspasa-12, es a través del procesamiento de dicha caspasa por la caspasa-7, la cual se transloca del citosol al lado citoplásmico de la membrana del RE y activa directamente a la caspasa-12 (Berridge, 2002; Szegezdi *et al.*, 2003; Boyce *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007). Sin embargo, otros experimentos sugieren que el corte de la caspasa-12 precede al corte de la caspasa-7 durante el estrés reticular, implicando que el orden de activación puede ser opuesto en algunos contextos (Boyce *et al.*, 2006). Una vez activada, la caspasa-12 puede cortar y activar a la procaspasa-9 por una vía independiente de Apaf-1 (factor activador de la proteasa de apoptosis 1), el usual mediador de la activación de dicha caspasa (Boyce *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Malhotra *et al.*, 2007). La caspasa-9 activada puede inducir la activación de la caspasa efectora, la caspasa-3 conduciendo finalmente a la muerte celular (Szegezdi *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2007) (Figura 2).

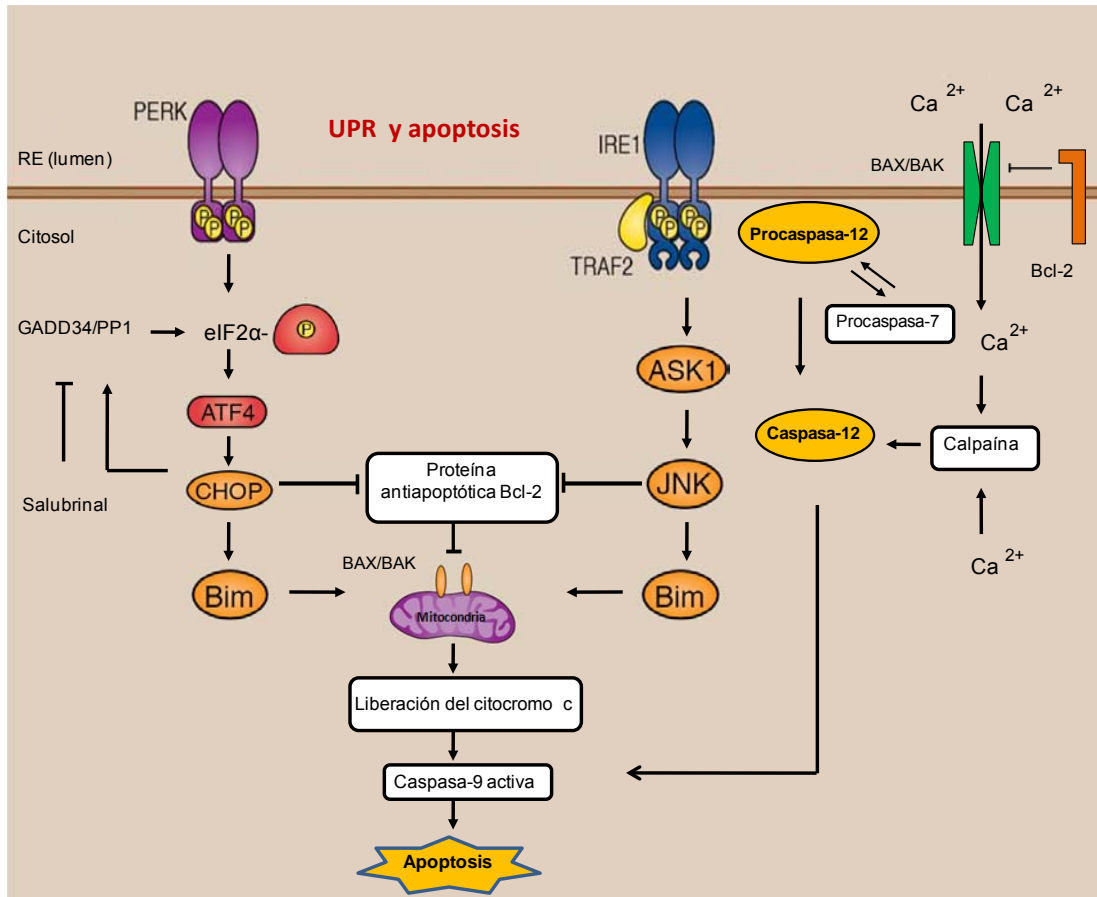


FIG 2. Vías apoptóticas inducidas por estrés reticular. La proteína CHOP, la cinasa JNK y las caspasas están involucradas en la activación de la apoptosis en respuesta al estrés reticular. Modificado de Merksamer *et al.*, 2010.

1.6.5 Estrés reticular en la isquemia cerebral

El daño cerebral isquémico es el resultado de una reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral que provoca alteración en las funciones cerebrales. La severidad del daño está determinada por el grado y la duración de la pérdida del flujo sanguíneo, y de esto depende que el cerebro sufra sólo una disfuncionalidad temporal, una necrosis isquémica selectiva o un infarto cerebral (Barrinagarrementería, 1997). La pérdida del flujo sanguíneo causa daño cerebral a través de una serie de eventos que evolucionan en tiempo y espacio (Dirnagl *et al.*, 1999). Los mecanismos del daño neuronal inducidos durante la isquemia cerebral y la hipoglucemia no se conocen completamente, pero estudios previos sugieren la participación de un mecanismo excitotóxico provocado por la liberación

de glutamato y particularmente de aspartato, en el caso de la hipoglucemia (Sandberg *et al.*, 1986; Wieloch, 1984). Además, investigaciones recientes han sugerido que el estrés oxidativo está asociado con el daño neuronal hipoglucémico (Suh *et al.*, 2007, 2008; Haces *et al.*, 2008, 2010). Se ha observado que la restitución del flujo sanguíneo o reperfusión, es un evento que exacerba el daño inducido por la isquemia cerebral. Durante la reperfusión, la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno incrementa dramáticamente (Margaill *et al.*, 2005). También, existe evidencia que muestra que el estrés reticular juega un importante papel en los mecanismos de daño cerebral inducidos por la isquemia/reperfusión (Shibata *et al.*, 2003). En algunos estudios, se ha observado que la isquemia cerebral transitoria provoca la fosforilación de PERK (Hayashi *et al.*, 2003), induce el splicing de RNAm de *xbp1*, indicativo de la fosforilación de IRE1 (Paschen *et al.*, 2003) y activa la caspasa-12 (Nakagawa *et al.*, 2000). La isquemia global en ratones también induce estrés reticular y la activación de los factores de transcripción, CHOP/Gadd153 y ATF4 (Hayashi *et al.*, 2005). Por otro lado, ha sido reportado en un modelo de oclusión de la arteria carótida común bilateral (BCCAO) en ratones silvestres, que el RNAm de CHOP y de GRP78 son marcadamente inducidos a las 12 h después de la BCCAO en el hipocampo y en el estriado. En contraste, las neuronas del hipocampo de ratones CHOP^{-/-} son más resistentes a la apoptosis inducida por la hipoxia-reoxigenación que aquellas de los animales silvestres (Tajiri *et al.*, 2004). La reperfusión, subsecuente a la isquemia cerebral está asociada con un incremento en la fosforilación de eIF2 α y una inhibición de la síntesis de proteínas (DeGracia *et al.*, 2002). Existen cuatro cinasas celulares que pueden fosforilar eIF2 α post-isquemia: GCN2 (cinasa no reprimible del factor 2), HRI (cinasa regulada por el inhibidor hemo), PKR (cinasa activada por RNA bicatenario) y PERK (cinasa asociada al retículo endoplásmico). Kumar y colaboradores (2001) usando un modelo de BCCAO en ratones deficientes de HRI y GCN2, demostraron que la fosforilación de eIF2 α después de la isquemia/reperfusión está mediada por PERK y no por HRI o GCN2. En otro estudio se mostró la inducción de estrés reticular durante la reperfusión en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratones. Se

observó un aumento en la expresión de GRP78 y activación de la caspasa-12, lo cual ocurrió entre las 5-23 h de reperfusión (Shibata *et al.*, 2003). Son muchas las evidencias que indican que un daño en el funcionamiento del RE puede tener un papel importante en la muerte neuronal inducida por la isquemia/reperfusión.

Por otra parte, también se ha observado estrés reticular durante la excitotoxicidad inducida por la estimulación de los receptores al ácido kaínico, un subtipo de receptor a glutamato. La administración de ácido kaínico induce un incremento de la proteína GRP78 y CHOP, además de muerte neuronal y activación de la caspasa-12 (Sokka *et al.*, 2007). A la fecha, el papel del estrés reticular en la muerte neuronal inducida por la hipoglucemia no ha sido estudiado, por lo que el propósito del presente estudio fue investigar la presencia de marcadores de estrés reticular en cultivos neuronales expuestos a la ausencia de glucosa, así como tratar de dilucidar su papel en la muerte apoptótica inducida en estas condiciones.

II. Planteamiento del problema

Datos previos de n uestro laboratorio sugieren que el aumento en l a concentración de calcio intracelular contribuye a la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa, y que éste participa en la producción de especies reactivas y en la activación de proteasas como la calpaína (Páramo *et al.*, 2010 y observaciones no publicadas). Sin embargo, desconocemos si la salida de calcio del RE contribuye al aumento en la concentración de calcio intracelular, y si el estrés reticular puede contribuir a l a muerte neuronal apoptótica inducida en dichas condiciones. El objetivo de esta investigación es conocer si la ausencia de glucosa desencadena el estrés reticular en neuronas de hipocampo cultivadas y si éste participa en la muerte.

III. Hipótesis

La ausencia de glucosa producirá estrés del retículo endoplásmico y éste contribuirá a la muerte apoptótica inducida en esta condición.

IV. Objetivo General

- ❖ Conocer si el estrés reticular contribuye a la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa en neuronas cultivadas de hipocampo.

Objetivos particulares

- ❖ Demostrar que la ausencia de glucosa induce muerte neuronal apoptótica en neuronas cultivadas de hipocampo.
- ❖ Investigar la presencia de estrés reticular iniciado por la activación de la vía de PERK durante la privación de glucosa en neuronas cultivadas de hipocampo.
- ❖ Conocer si la muerte apoptótica está relacionada con la inducción de estrés reticular.

V. Metodología

5.1 Cultivo de células

Cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron preparados a partir de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación. Después de la disección, 10-12 hipocampos fueron cortados en cubos de 300 μm en un Chopper, incubados en una solución de tripsina al 0.25 % y dispersados por trituración en una solución con DNasa e inhibidor de tripsina al 0.08 % y 0.52 %, respectivamente. Las células fueron suspendidas en medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27, L-glutamina 0.5 mM y gentamicina 20 $\mu\text{g/ml}$. Las células se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 células/ml/pozo en cajas Costar de 24 pozos para los ensayos de viabilidad celular, determinación de la actividad de la caspasa-3, y la cuantificación de nucleos apoptóticos. Para los ensayos de actividad de la caspasa-12 y detección de los marcadores de estrés reticular por ensayos de inmunoblot, las células se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 células/ml/pozo en cajas Corning de 35 mm x 10 mm. En todos los casos las cajas fueron previamente cubiertas con poli-L-lisina 5 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron cultivadas por 7 días *in vitro* (DIV) a 37°C en una incubadora con 5% CO_2 /95% aire. Cuatro días después de sembrar las células se agregó medio Neurobasal fresco, glucosa 5 mM y citosina arabinosa 10 μM . La citosina se agregó para inhibir la proliferación celular.

5.2 Evaluación del efecto de diferentes fármacos e inhibidores de caspasas en la muerte inducida por la ausencia de glucosa

Se evaluó el efecto del dantroleno (12.5 μM ; antagonista del RyR), el salubrinal (50 μM ; inhibidor de la fosfatasa responsable de desfosforilar a eIF2 α -P), el QVDOPH (20 μM ; inhibidor general de caspasas), el DEVDCHO (25 μM ; inhibidor de la caspasa-3) y el Q-ATAD (40 μM ; inhibidor específico de la caspasa-12) sobre la muerte inducida por la ausencia de glucosa (AG). Los cultivos fueron incubados durante 2 y 4 h en un medio sin glucosa (Medio Eagle's modificado dulbecco's, DMEM). Todos los fármacos se agregaron directamente al medio DMEM. A diferencia de los demás fármacos, el DEVDCHO fue preincubado 30

min antes de la AG, esto debido a que es poco permeable. Después del periodo de AG, se retiró el medio DMEM y se añadió el medio de cultivo que se había retirado previamente (Neurobasal). Finalmente, después de 24 h de iniciado el experimento la sobrevivencia neuronal fue determinada por el ensayo de reducción de MTT que se describe a continuación.

5.3 Determinación de viabilidad celular

La viabilidad o sobrevivencia celular fue determinada por el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La reducción del MTT es un método comúnmente usado como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, a partir de la formación de la sal de formazán. Esta reducción ocurre por las deshidrogenasas mitocondriales activas, es decir, en las células viables. La sal de formazán generada se cuantifica espectrofotométricamente utilizando un solvente orgánico para su extracción. Después de 24 h de iniciado el tratamiento experimental las células fueron incubadas con MTT 150 μ M durante 1 h a 37° C en una incubadora con 5% CO₂/95% aire. El medio fue aspirado y el formazán precipitado fue solubilizado en 800 μ l de isopropanol ácido y cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro *Beckman DU 640*. Los resultados son expresados como el porcentaje de reducción de MTT relativo al control.

5.4 Condensación nuclear

La morfología de los núcleos se evaluó incubando las células con el compuesto fluorescente Hoechst 33258, el cual penetra en las células y se une al ADN. Las células fueron incubadas durante 2 y 4 h en AG en presencia o ausencia de: dantroleno (12.5 μ M), salubrinal (50 μ M), QVDOPH (20 μ M) y DEVDCHO (25 μ M). Después del periodo de AG se retiró el medio DMEM y se añadió el medio de cultivo que se había retirado previamente (Neurobasal). Transcurridas 24 h de iniciado el experimento, las células se lavaron dos veces con 500 μ l de buffer salino de fosfatos (PBS). Se agregaron 250 μ l/pozo de Hoechst 33258 al 0.001 %

durante 15 min protegiendo de la luz. Después de retirar el Hoechst, las células fueron lavadas nuevamente con 500 μ l de PBS, fijadas con 300 μ l de formaldehído frío al 3.7 % durante 10 min y colocadas en portaobjetos. Las células fueron observadas en un microscopio con una lámpara de fluorescencia usando un filtro UV-2A DM400. Diez campos diferentes (conteniendo aproximadamente 30-40 células cada uno) fueron contados con un objetivo de 60x. Los núcleos brillantes, encogidos y en ocasiones fragmentados fueron considerados como núcleos apoptóticos. Los resultados son expresados como porcentaje de núcleos condensados y fragmentados con respecto al número total de núcleos contados en cada condición experimental.

5.5 Determinación de la actividad de la caspasa-3

Para determinar la actividad de la caspasa-3 las células fueron expuestas a diferentes periodos de AG (1, 2 y 4 h) y diferentes periodos de reintroducción de glucosa (RG) (2, 4, y 6 h). Después de estos periodos de ausencia y reintroducción de glucosa, las células fueron lavadas dos veces con 500 μ l de PBS y homogenizadas en 150 μ l de buffer de lisis (HEPES 100 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 20 μ M, sacarosa 10 % p/v, DTT 10 mM, CHAPS 0.1 % p/v y solución de inhibidores de proteasas 20 μ l/ml (PMSF, AEBSF, E-64, α_2 -macroglobulina, aprotinina y leupeptina 1 μ g/ μ l) diluido 1:1 (v/v) con glicerol. Se tomó una alícuota para cuantificar proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951) y el resto de las muestras se guardaron a -70°C . La actividad de la caspasa-3 fue determinada usando el sustrato fluorogénico ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC). Este sustrato se proteolisa por la caspasa-3 y genera 7-amino-4-metilcumarina (AMC). Al liberarse el AMC emite fluorescencia. De este modo, la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sustrato procesado y por tanto, a la actividad de la caspasa-3 presente en la muestra. La actividad fue determinada cada min durante 30 min después de la adición del sustrato (25 μ M) y del homogenado celular (30 μ g de proteína) en un volumen final de 0.2 ml de una solución estándar que contiene: HEPES 100 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 20 μ M, sacarosa 10 % p/v, DTT 10 mM, CHAPS 0.1 % p/v y solución

de inhibidores de proteasas 2 μ l/ml. Como control positivo se utilizaron células incubadas con estaurosporina (STP) 500 nM durante 8 h. Las muestras se colocaron en cajas de 96 pozos y se leyó la intensidad de fluorescencia (excitación 360 nm, emisión 460 nm) en un lector de placa *Synergy HT*, *Biotek*. Los resultados se expresan como cambio en la intensidad de fluorescencia por minuto por miligramo de proteína (CF/min/mg).

5.6 Determinación de proteínas totales

Se utilizó del método de Lowry *et al.* (1951). Se realizó una curva patrón utilizando un estándar de albúmina de suero de bovino (ASB) con concentraciones de 1 a 8 mg/ml.

La absorbancia se determinó a 750 nm en un lector de placa *Synergy HT*, *Biotek*.

5.7 Determinación de la actividad de la caspasa-12

Para determinar la actividad de la caspasa-12 los cultivos fueron incubados en un medio sin glucosa durante 1, 2 y 4 h. Una vez concluido el periodo de AG se retiró el medio DMEM y se procedió a lavar las células dos veces con 1 ml de solución Locke's (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, CaCl₂ 2.3 mM, HEPES 5 mM y glucosa 5.6 mM; pH 7.4). Posteriormente se agregaron 190 μ l de buffer de lisis (BioVision, Mountain View, CA), se incubó durante 10 min en hielo y se homogenizaron las células. Se tomó una alícuota para cuantificar proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951). El homogenado restante, 100 μ l (aproximadamente 150 μ g de proteína) se agregó a una placa Costar de 96 pozos. Se adicionaron 100 μ l del buffer de reacción 2x (BioVision, Mountain View, CA) con DTT 10 mM y 10 μ l del sustrato Ac-Ala-Thr-Ala-Asp-AFC (ATAD-AFC) (50 μ M). En algunos casos se agregó también el inhibidor específico de la caspasa-12, el Z-ATAD-FMK (2 μ M) y el inhibidor general de caspasas, el QVDOPH (20 μ M). La placa con el homogenado, el buffer de reacción, el inhibidor y el sustrato se incubó durante 1 h a 37°C en una incubadora con 5% CO₂/95% aire. La intensidad de fluorescencia (excitación 360 nm, emisión 528 nm) se determinó cada min

durante 30 min en un lector de placa *Synergy HT*, *Biotek*. Los resultados se expresan como cambio en la intensidad de fluorescencia por minuto por miligramos de proteína (CF/min/mg). Como control positivo se utilizaron células tratadas con tunicamicina (Tm) 5 μ M y tapsigargina (Tg) 1 μ M durante 48h.

5.8 Detección de marcadores de estrés reticular por inmunoblot

La detección de los marcadores de estrés reticular por inmunoblot se realizó después de exponer los cultivos a un medio sin glucosa durante 0.5, 1, 2 y 4 h. Transcurrido el periodo de AG el medio DMEM fue retirado y se procedió a lavar las células dos veces con 1 ml de solución Locke's. Posteriormente se agregaron 150 μ l de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, deoxicolato de sodio 0.5 % y dodecilsulfato de sodio 1 %) agregando inhibidores de proteasas 2 μ l/ml (PMSF, AEBSF, E-64, α_2 -macroglobulina, EDTA, fosforamidona, aprotinina, leupeptina y bestatina 1 μ g/ μ l). Se incubó durante 10 min en hielo y se homogenizaron las células. El homogenado se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C. Se separó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas y el sobrenadante restante se procesó para la detección de los marcadores de estrés reticular eIF2 α -P, ATF4, GRP78 y CHOP por inmunoblot.

Para cada una de las muestras se siguió el siguiente procedimiento: en un tubo eppendorf se mezclaron el sobrenadante con el buffer muestra (1:1 v/v) (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2 %, glicerol 25 %, azul de bromofenol 0.01 % y β -mercaptoetanol 5 %) y se hirvieron durante 5 min. Se prepararon geles de acrilamida en un soporte (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) con el gel concentrador al 4 % (acrilamida 29 % / bisacrilamida 1 %, Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 10 %, PSA y TEMED) y el gel separador al 12 % (acrilamida 29 % / bisacrilamida 1 %, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10 %, PSA y TEMED) según el método de Laemmli (1970). Se montaron en una cámara de electroforesis. En cada pozo del gel se cargaron 25 μ g de proteína del sobrenadante previamente desnaturalizado y se corrió la electroforesis durante 2.5 h a 100 mA. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF de 0.45 μ m (Millipore, Bedford, MA)

durante 1.5 h a 400 mA y 30 min a 500 mA. Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5 % en buffer salino tris (TBS) (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1 %) durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación. Se incubaron durante 48 h a 4°C con el anticuerpo anti-GRP78 (1:1000), anti-CHOP (1:1000), anti-eIF2 α -P (1:1000) y anti-ATF4 (1:250) o 24 h a 4°C con el anti-actina (1:5000). Todos los anticuerpos se diluyeron en TBS con leche al 5 % con excepción del anti-ATF4 que se diluyó en PBS con ASB al 5 %. Las membranas se lavaron tres veces con TBS durante 10 min, agitación y a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón diluido 1:2500 (CHOP y ATF4) y 1:5000 para la actina o con el anticuerpo secundario anti-conejo diluido 1:5000 (GRP78) o 1:2500 para eIF2 α -P. Todos los anticuerpos utilizados están acoplados a peroxidasa de rábano y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, con excepción, del anticuerpo secundario para la actina, el cual se incubó durante 30 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS durante 10 min, a temperatura ambiente y agitación. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron usando un sistema de detección que emplea quimioluminiscencia (Millipore, Bedford, MA). La densidad óptica de las bandas fue cuantificada usando el programa Image J.

Los resultados fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía, seguida por una prueba de Fisher de comparación múltiple, utilizando el programa de estadística Statview 4.5. Todos los resultados se presentan como promedios \pm error estándar (ES). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

VI. Resultados

6.1 *Efecto de la ausencia de glucosa en la muerte neuronal*

Primero se determinaron los periodos de ausencia de glucosa (AG) suficientes para inducir una reducción en la sobrevivencia neuronal. Los cultivos fueron incubados en un medio sin glucosa (Medio Eagle's modificado dulbecco's, DMEM) durante 2 y 4 h. Después del periodo de AG, se retiró el medio DMEM y se añadió el medio de cultivo que se había retirado previamente (Neurobasal) Finalmente, después de 24 h de iniciado el experimento, la sobrevivencia neuronal fue determinada por el ensayo de reducción de MTT. Se observó una disminución de la reducción de MTT del 59 y 63 %, con respecto al control sin AG. Como control se usaron células incubadas durante todo el tiempo en el medio Neurobasal. (Figura 3).

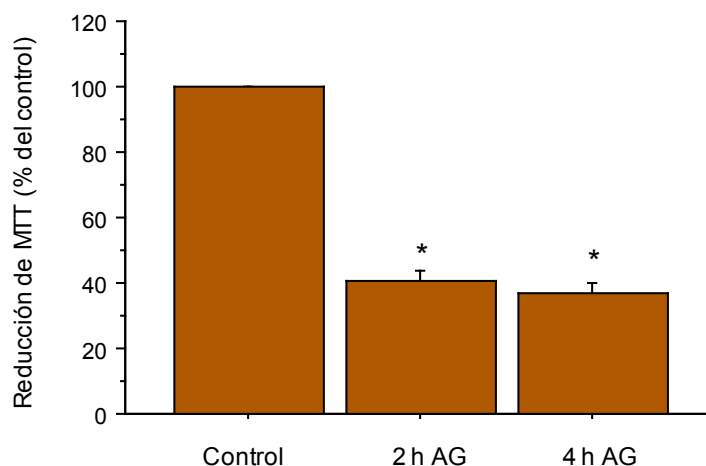


FIG. 3. Efecto de la ausencia de glucosa (AG) sobre la viabilidad celular. Las células se incubaron en un medio sin glucosa durante 2 y 4 h. Posteriormente el medio DMEM fue retirado y reemplazado con medio Neurobasal. La viabilidad fue evaluada 24 h después de iniciado el experimento por el ensayo de reducción de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de reducción de MTT con respecto al control. Los datos son promedios \pm ES de seis experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control sin AG.

Una vez establecidos los periodos de AG que nos permitieron observar una disminución significativa de la sobrevivencia neuronal, se decidió investigar si la inhibición de la salida de calcio del retículo endoplásmico (RE) por los receptores a rianodina (RyR), participa en el proceso de muerte neuronal. Para esto se incubaron las células en presencia de dantroleno (12.5 μ M), un antagonista de los RyR, el cual fue preincubado durante 30 min antes de la AG. Por otro lado, para prevenir la muerte apoptótica utilizamos un inhibidor general de caspasas, el QVDOPH (20 μ M), un

inhibidor de la caspasa-3, el DEVDCHO (25 μM) y un inhibidor específico para la caspasa-12, el Q-ATAD (40 μM). Los fármacos fueron incubados durante las 2 y 4 h de AG y la viabilidad celular fue evaluada 24 h después a través del ensayo de reducción de MTT. Todos los fármacos evaluados tuvieron un efecto protector contra la muerte inducida por 2 h de AG. En presencia del dantroleno la reducción de MTT se restauró hasta un 68 %, mientras que con los inhibidores de caspasas, ésta se restauró al 72 % en presencia de QVDOPH, al 63 % con el DEVDCHO y al 62 % con el Q-ATAD (Figura 4). El efecto del salubrinal se discutirá más adelante.

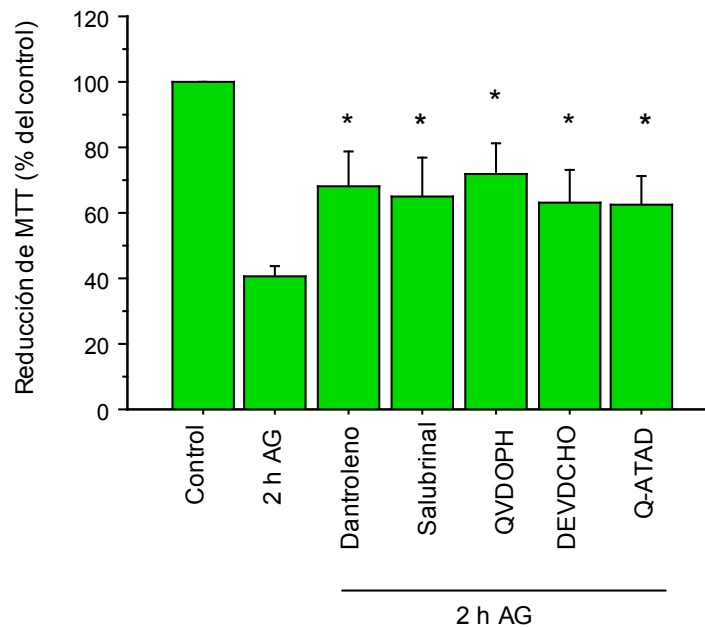


FIG. 4. Efecto protector de diferentes fármacos e inhibidores de caspasas sobre la muerte inducida por 2 h en ausencia de glucosa. Las células se incubaron en un medio sin glucosa durante 2 h en presencia o ausencia de dantroleno (12.5 μM), salubrinal (50 μM), QVDOPH (20 μM), DEVDCHO (25 μM) y Q-ATAD (40 μM). Posteriormente el medio DMEM fue retirado y reemplazado con medio Neurobasal. La viabilidad fue evaluada 24 h después de iniciado el experimento por el ensayo de reducción de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de reducción de MTT con respecto al control. Los datos son promedios \pm ES de tres experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto a 2 h en AG.

En la figura 5 se observan imágenes representativas de un cultivo expuesto durante 2 h en AG y el efecto protector del dantroleno, el salubrinal, el QVDOPH y el DEVDCHO.

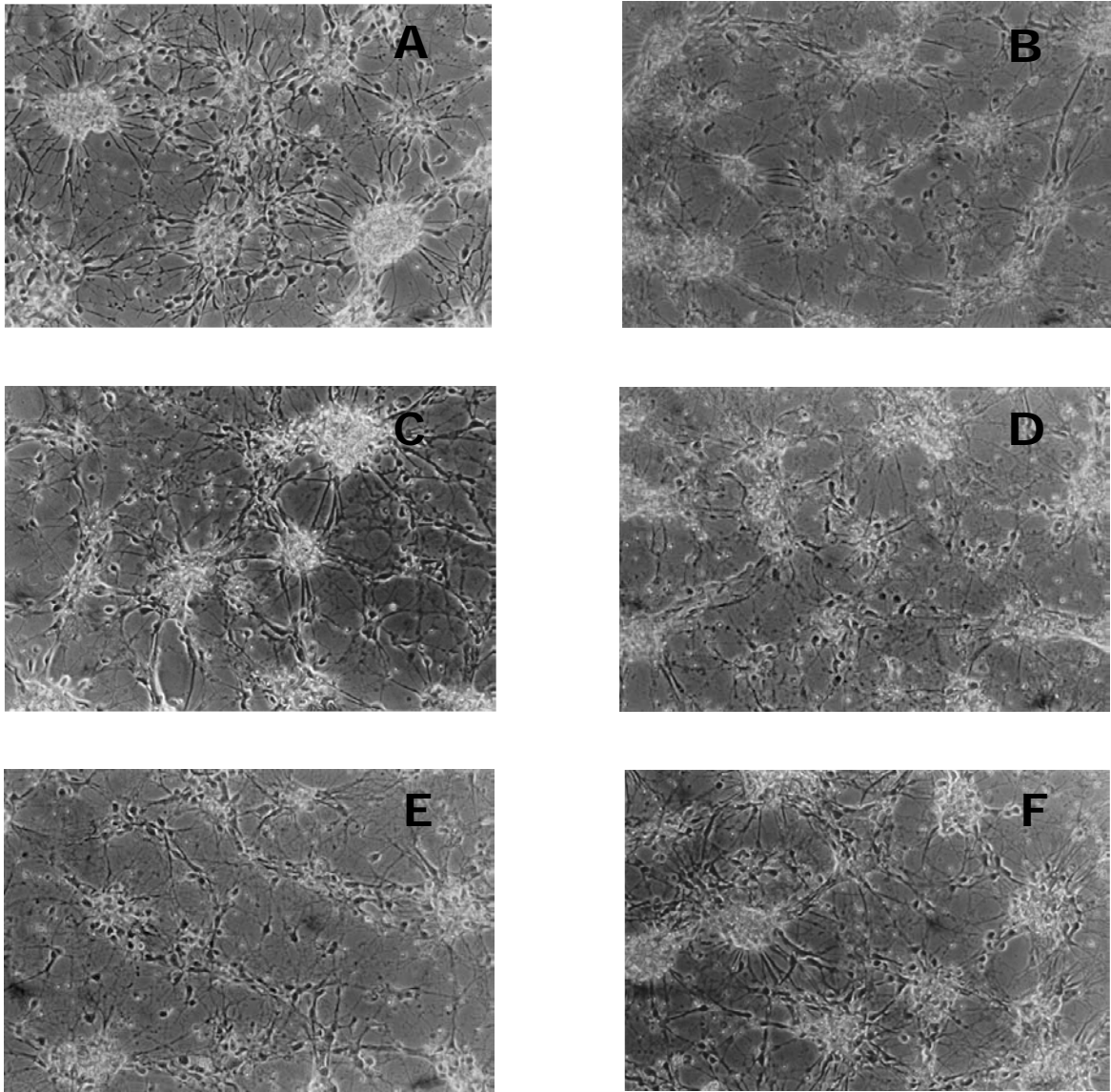


FIG. 5. Efecto protector del dantroleno, el salubrinal, el QVDOPH y el DEVDCHO sobre la muerte inducida por 2 h en ausencia de glucosa. **(A)** El cultivo control presenta somas celulares oscuros y procesos bien definidos. **(B)** El cultivo expuesto a un medio sin glucosa durante 2 h presenta células brillantes y refringentes, lo cual es indicativo de muerte celular. Las células incubadas por 2 h en AG y en presencia de dantroleno (12.5 μ M) **(C)**, salubrinal (50 μ M) **(D)**, QVDOPH (20 μ M) **(E)** y DEVDCHO (25 μ M) **(F)** se observan mejor preservadas.

A pesar de que la muerte inducida por 4 h de AG no resultó ser significativamente diferente de la inducida por 2 h en AG, se encontró un efecto protector de la muerte únicamente en presencia del QVDOPH, restaurando la reducción del MTT en un 61 % de los niveles control, mientras que el DEVDCHO no tuvo efecto protector (Figura 6). Los efectos del salubrinal se discutirán después.

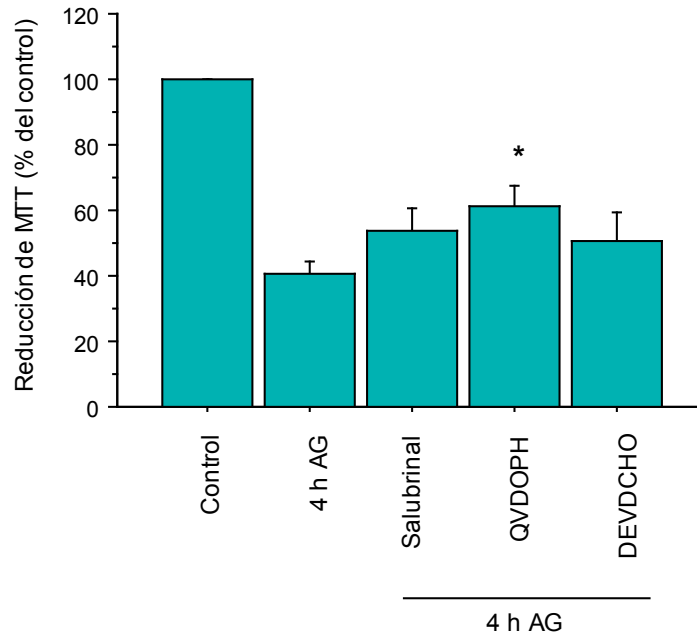
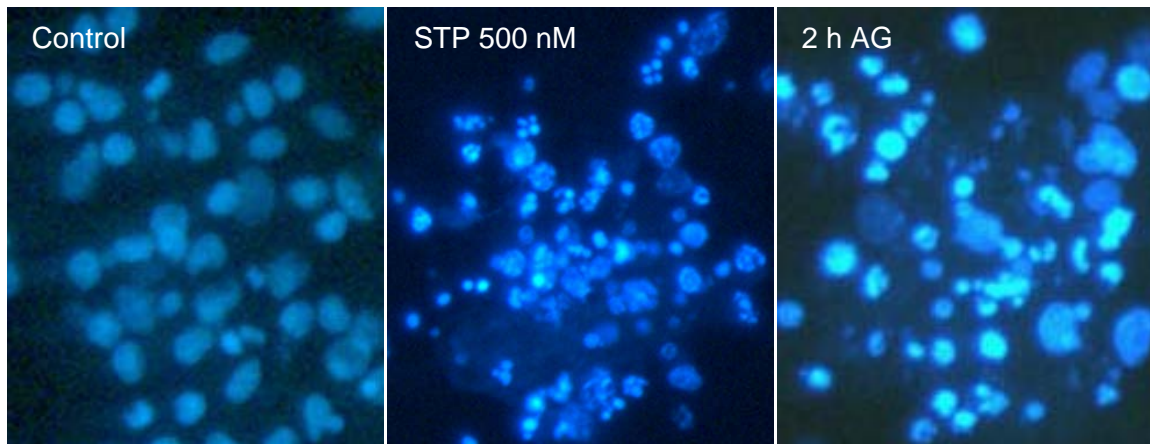


FIG. 6. Efecto del salubriñal y los inhibidores de caspasas sobre la muerte inducida por 4 h en ausencia de glucosa. Las células se incubaron en un medio sin glucosa durante 4 h en presencia o ausencia de salubriñal (50 μ M), QVDOPH (20 μ M) y DEVDCHO (25 μ M). Posteriormente el medio DMEM fue retirado y reemplazado con medio Neurobasal. La viabilidad fue evaluada 24 h después de iniciado el experimento por el ensayo de reducción de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de reducción de MTT con respecto al control. Los datos son promedios \pm ES de cuatro experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto a 4 h en AG.

6.2 Inducción de muerte neuronal apoptótica durante la ausencia de glucosa

Debido al efecto protector observado con los inhibidores de las caspasas en los experimentos de reducción de MTT se decidió evaluar la presencia de núcleos apoptóticos después de exponer a las células a un medio sin glucosa. Las características morfológicas de la muerte apoptótica, como son los núcleos condensados y fragmentados fueron observados usando la tinción de Hoechst (Figura 7a). Se observó un aumento significativo en el porcentaje de núcleos fragmentados y condensados después de exponer a las células durante 2 y 4 h en AG (45 y 61 %, respectivamente) comparado con el control (25 %) (Figura 7b). En este caso la diferencia en el porcentaje de núcleos apoptóticos observada después de 2 y 4 h de exposición a la AG, sí fue estadísticamente significativa. Como control positivo de inducción de muerte celular apoptótica se utilizaron células incubadas con estaurosporina (STP) 500 nM durante 24 h, observándose un 71 % de núcleos condensados o fragmentados (Figura 7a y b).

a)



b)

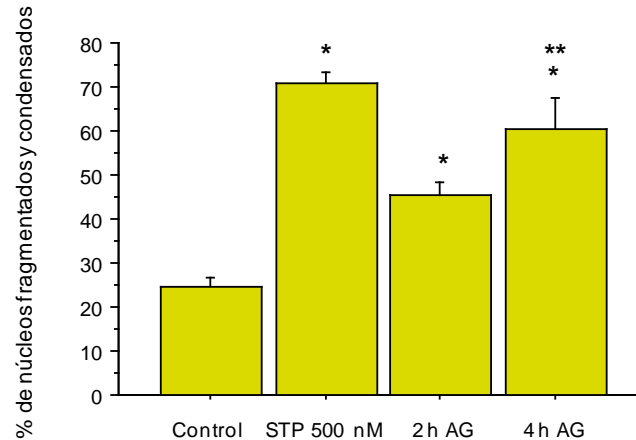


FIG. 7. Efecto de la ausencia de glucosa en el porcentaje de núcleos condensados y fragmentados. **a)** Imágenes representativas de un cultivo control y de células incubadas con estaurosporina (STP) 500 nM durante 24 h o incubadas en un medio sin glucosa durante 2 h. Las células se observan con el núcleo condensado o fragmentado. **b)** Efecto de 2 y 4 h de AG sobre el porcentaje de núcleos apoptóticos. Las células se incubaron en un medio sin glucosa durante 2 y 4 h. Posteriormente el medio DMEM fue retirado y reemplazado con medio Neurobasal. La morfología de los núcleos se evaluó 24 h después de iniciado el experimento utilizando la tinción nuclear de Hoechst 33258. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos fragmentados y condensados con respecto al número total de núcleos contados en cada condición experimental. Los datos son promedios \pm ES de cuatro experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control sin AG, ** $P < 0.05$ con respecto a 2 h en AG.

Posteriormente, decidimos evaluar si la muerte apoptótica podría ser prevenida evitando la salida de calcio del RE con dantroleno o inhibiendo a las caspasas, con el QVDOPH y con el inhibidor específico de la caspasa-3, el DEVDCHO. Las células fueron expuestas a un medio carente de glucosa durante 2 h en presencia o ausencia

de los diferentes fármacos y 24 h después se evaluó la morfología de los núcleos. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de núcleos apoptóticos después de la exposición a la AG durante 2 h (55 %), con respecto a los cultivos control (30 %) (Figura 8). También se observó una diferencia estadísticamente significativa en el número de núcleos apoptóticos cuando las células se incubaron con estaurosporina 500 nM durante 24 h (72 %) con respecto al control (30 %) (Figura 8). Por otro lado, observamos una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de núcleos fragmentados y condensados en los cultivos incubados con el dantroleno (29 %), el QVDOPH (36 %), y el DEVDCHO (32 %), con respecto al porcentaje de núcleos apoptóticos observados después de la incubación de las células durante 2 h en AG (55 %) (Figura 8). El efecto del salubrinal se discutirá más adelante.

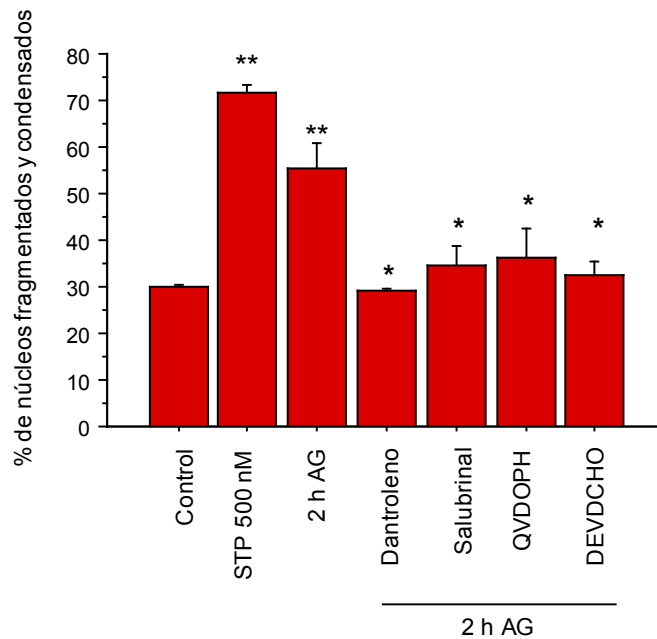


FIG. 8. Efecto protector de diferentes fármacos e inhibidores de caspasas contra la muerte apoptótica inducida por 2 h en ausencia de glucosa. Las células se incubaron en un medio sin glucosa durante 2 h en presencia o ausencia de dantroleno (12.5 μ M), salubrinal (50 μ M), QVDOPH (20 μ M) y DEVDCHO (25 μ M). Posteriormente el medio DMEM fue retirado y reemplazado con medio Neurobasal. La morfología de los núcleos fue evaluada 24 h después de iniciado el experimento utilizando la tinción nuclear de Hoechst 33258. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos fragmentados y condensados con respecto al número total de núcleos contados en cada condición experimental. Los datos son promedios \pm ES de tres experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. ** $P < 0.05$ con respecto al control sin AG, * $P < 0.05$ con respecto a 2 h en AG.

Debido al efecto protector observado con el inhibidor general de caspasas y con el inhibidor de la caspasa-3 en la muerte apoptótica, decidimos determinar la actividad de la caspasa-3 a través de un ensayo fluorimétrico. Para determinar la actividad de dicha caspasa, se probaron varios periodos de ausencia de glucosa (AG): 1, 2 y 4 h. Además de 2 y 4 h de AG con diferentes periodos de reintroducción de glucosa (RG) (2, 4 y 6 h). Se observó una diferencia significativa en la actividad de la caspasa-3, expresada como cambio en la fluorescencia por minuto por miligramo de proteína, únicamente en la condición de 2 h AG más 2 h RG (8.97 CF/min/mg), comparada con el control de cambio de medio (AG + glu) (3.92 CF/min/mg) (Figura 9a). Para confirmar que la escasa actividad detectada correspondía al corte proteolítico de la caspasa-3, se agregó al ensayo el inhibidor específico de dicha caspasa, el DEVDCHO en la condición de 4 h AG más 4 h RG, observando una inhibición total de la actividad (Figura 9a). Se observó una diferencia significativa en el cambio de fluorescencia cuando las células fueron incubadas con estaurosporina 500 nM durante 8 h (18.31 CF/min/mg) con respecto al control (6.67 CF/min/mg) (Figura 9b).

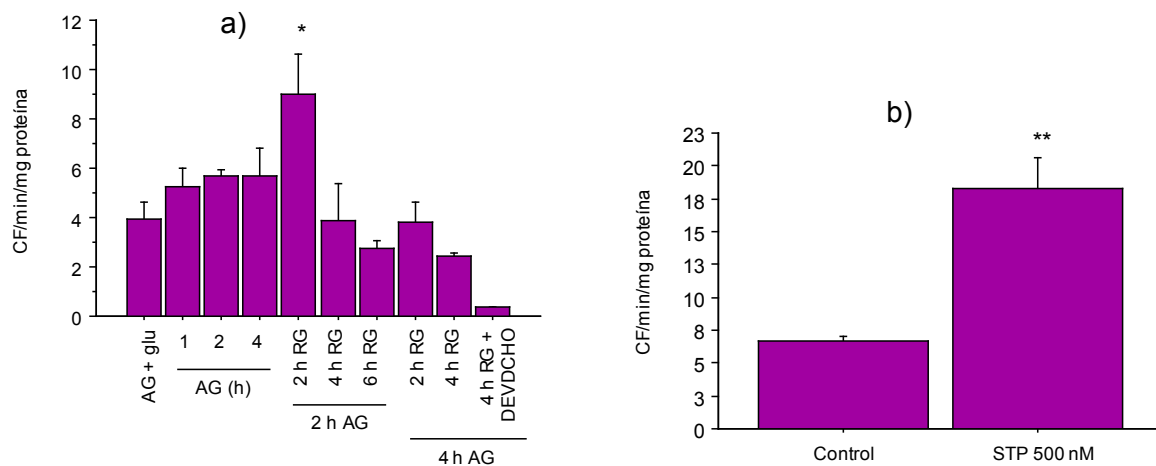


FIG. 9. a) Efecto de la ausencia de glucosa en la actividad de la caspasa-3. Las células fueron expuestas a un medio sin glucosa durante 1, 2 y 4 h. En las condiciones con reintroducción de glucosa (RG) las células se incubaron durante 2 y 4 h en un medio sin glucosa y posteriormente el medio DMEM fue retirado y reemplazado con medio Neurobasal durante 2, 4 y 6 h. La actividad de la caspasa-3 se determinó a través de un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato Ac-DEVD-AMC. Los resultados se expresan como cambio en la fluorescencia por minuto por miligramo de proteína (CF/min/mg). Los datos son promedios \pm ES de tres experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto a la condición de AG + glu. **b)** Efecto de la incubación con estaurosporina (STP) 500 nM durante 8 h sobre la actividad de la caspasa-3. La actividad de la caspasa-3 fue determinada como se describió anteriormente. Los datos son promedios \pm ES de cinco experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. ** $P < 0.05$ con respecto al control sin AG.

Por otro lado, el efecto protector observado con el inhibidor general de caspasas, el QVDOPH, en la disminución de la muerte apoptótica, sugiere la probable participación de otras caspasas en el proceso de muerte. Por esta razón, decidimos evaluar la actividad de la caspasa-12, una caspasa que se encuentra asociada con la membrana del RE y que se sabe está involucrada en la ejecución de la apoptosis inducida por estrés reticular.

Los cultivos se incubaron en un medio carente de glucosa durante 1, 2 y 4 h, transcurrido el periodo de AG se determinó la actividad de la caspasa-12 a través de un ensayo fluorimétrico. Se observó un aumento significativo en el cambio de fluorescencia después de exponer los cultivos durante 1 y 2 h (1.01 y 0.73 CF/min/mg, respectivamente) comparado con el control (0.34 CF/min/mg) (Figura 10). Como controles positivos de activación de caspasa-12 se utilizaron células incubadas con tunicamicina (Tm) 5 μ M, que es un inhibidor de la glicosilación de proteínas y con tapsigargina (Tg) 1 μ M, un inhibidor irreversible de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico, ambos compuestos fueron incubados durante 48 h. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad de la caspasa-12 después de incubar las células con Tm (1.02 CF/min/mg) con respecto al control sin AG (Figura 10).

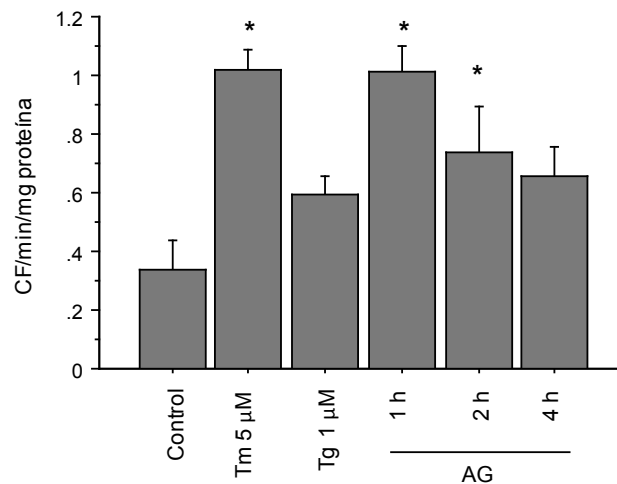


FIG. 10. Efecto de la ausencia de glucosa en la actividad de la caspasa-12. Las células fueron expuestas a un medio sin glucosa durante 1, 2 y 4 h. Después del periodo de AG se determinó la actividad de la caspasa-12 a través de un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato ATAD-AFC. Como controles positivos se utilizaron células incubadas con tunicamicina (Tm) (5 μ M) o tapsigargina (Tg) (1 μ M) durante 48 h. Los resultados se expresan como cambio en la fluorescencia por minuto por miligramo de proteína (CF/min/mg). Los datos son promedios \pm ES de tres experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control sin AG.

Posteriormente decidimos evaluar si la activación de la caspasa-12 inducida por 1 h en AG podría ser prevenida con el QVDOPH y con el inhibidor específico de dicha caspasa, el z-ATAD-FMK. Observamos un aumento en la actividad de la caspasa-12, expresada como cambio en la fluorescencia, cuando las células fueron expuestas a un medio sin glucosa durante 1 h (1.45 CF/min/mg) con respecto al control sin AG (0.40 CF/min/mg) (Figura 11). También se observó un aumento significativo en la actividad de dicha caspasa cuando las células se incubaron con taspigargina 1 μ M durante 48 h (1.05 CF/min/mg) (Figura 11). Por otro lado, cuando las células se incubaron en AG y en presencia del QVDOPH (20 μ M) se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la caspasa-12 (0.51 CF/min/mg), esta disminución también fue observada al incubar las células con el z-ATAD-FMK (2 μ M) (0.53 CF/min/mg) comparada con la actividad observada en los cultivos expuestos durante 1 h en AG (1.45 CF/min/mg) (Figura 11).

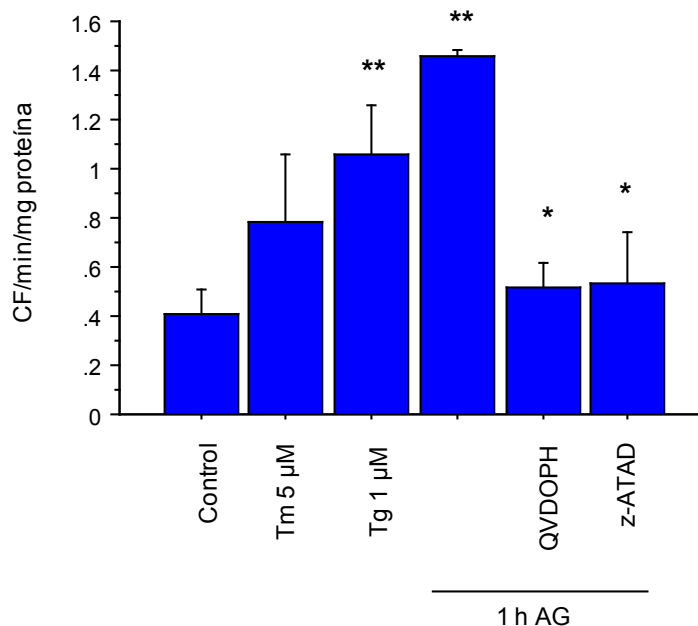
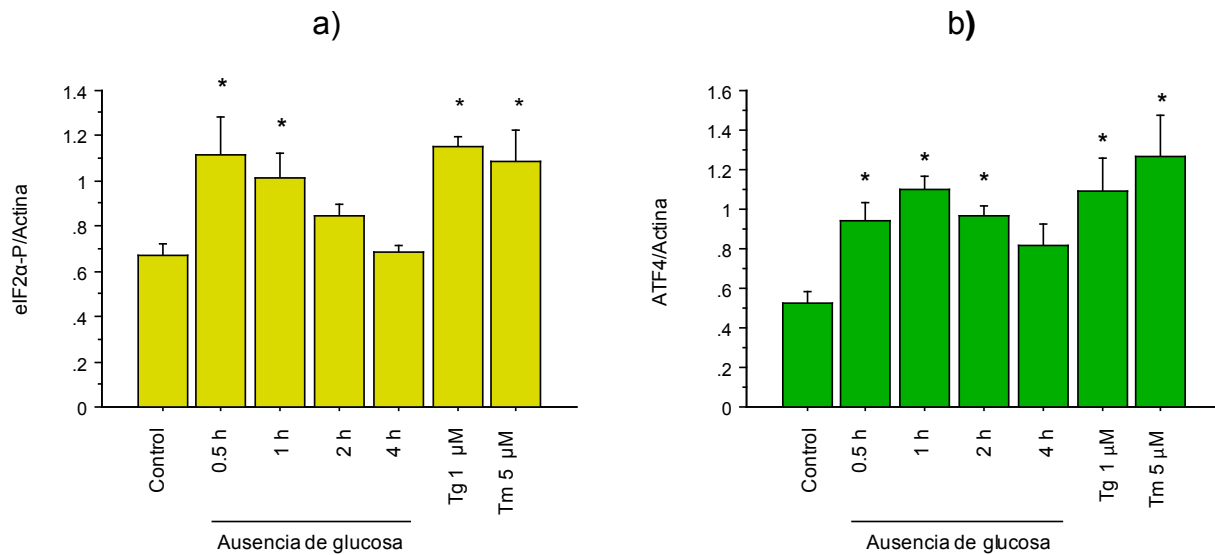


FIG. 11. Efecto protector de los inhibidores de caspasas sobre la actividad de la caspasa-12 inducida por 1 h en ausencia de glucosa. Las células fueron expuestas a un medio sin glucosa durante 1 h en presencia o ausencia de QVDOPH (20 μ M) y z-ATAD-FMK (2 μ M). Después de 1 h de AG se determinó la actividad de la caspasa-12 a través de un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato ATAD-AFC. Como controles positivos de activación de caspasa-12 se utilizaron células incubadas con tunicamicina (Tm) (5 μ M) o taspigargina (Tg) (1 μ M) durante 48 h. Los resultados se expresan como cambio en la fluorescencia por minuto por miligramo de proteína (CF/min/mg). Los datos son promedios \pm ES de tres experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. ** $P < 0.05$ con respecto al control sin AG, * $P < 0.05$ con respecto a 1 h en AG.

6.3 Inducción de marcadores de estrés reticular durante la ausencia de glucosa

El incremento observado en la actividad de la caspasa-12, así como el efecto protector del dantroleno, sugieren que durante la ausencia de glucosa, la salida de calcio del RE puede desencadenar una respuesta de estrés reticular, el cuál participa en el proceso de muerte apoptótica. Por esta razón, decidimos evaluar la presencia de algunos marcadores de estrés reticular como el factor de iniciación eucariótico 2 fosforilado en la subunidad α (eIF2 α -P), el factor de transcripción activado 4 (ATF4), la proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78) y la proteína homóloga que se une al potenciador CCAAT (CHOP) por ensayos de inmunoblot (Figuras 12 y 13).

La detección de eIF2 α -P y de ATF4 se realizó después de incubar las células en un medio carente de glucosa durante 0.5, 1, 2 y 4 h. En la figura 12a se observa un incremento significativo en el contenido de eIF2 α -P después de 0.5 y 1 h en AG comparado con el control. Por otro lado, se observó un incremento significativo en los niveles de la proteína ATF4 a partir de 0.5 y hasta las 2 h en A G (Figura 12b). Como controles positivos de inducción de estrés reticular se utilizaron células incubadas con Tg (1 μ M) y Tm (5 μ M) durante 48 h (Figuras 12a y b). En la figura 12c se muestra una imagen representativa de una membrana donde se muestran los niveles de expresión de eIF2 α -P y ATF4 a los tiempos indicados después de la ausencia de glucosa, también se observan los niveles de actina utilizada como control de carga.



c)

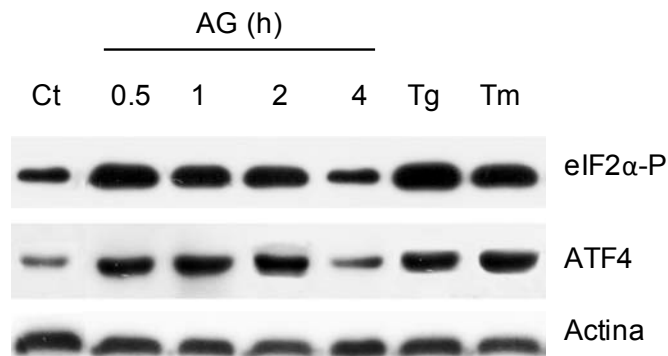


FIG. 12. Expresión de marcadores de estrés reticular durante la ausencia de glucosa. **a) y b)** Inducción de eIF2α-P y ATF4 después de exponer las células a un medio sin glucosa durante 0.5, 1, 2 y 4 h. Los niveles de dichas proteínas se determinaron a través de un ensayo de inmunoblot. Como controles positivos de inducción de estrés reticular se utilizaron células incubadas con Tm (5 μM) o Tg (1 μM) durante 48 h. Los resultados se expresan como los niveles de eIF2α-P y de ATF4 normalizados a los niveles de actina. Los datos son promedios ± ES de cuatro experimentos independientes y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. *P<0.05 con respecto al control sin AG. **c)** Imagen representativa de una membrana donde se muestran los niveles de expresión de eIF2α-P y ATF4 a los tiempos indicados después de la ausencia de glucosa. Como control de carga se utilizó actina.

De igual forma, se evaluó la presencia de los marcadores de estrés reticular GRP78 y CHOP. En la figura 13a se observa un incremento en los niveles de GRP78 después de 0.5 y 1 h en AG, sin embargo, este aumento fue significativo únicamente después de exponer las células a un medio sin glucosa durante 2 y 4 h. Por otro lado, se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína CHOP después de exponer los cultivos a 2 y 4 h en AG comparados con el control (Figura 13b). Como

controles positivos, las células fueron incubadas con Tg 1 μM y Tm 5 μM durante 48 h. En la figura 13c se muestra una imagen representativa de una membrana en donde se muestran los niveles de expresión de GRP78 y de CHOP a los tiempos indicados después de la ausencia de glucosa, también se observan los niveles de actina utilizada como control de carga.

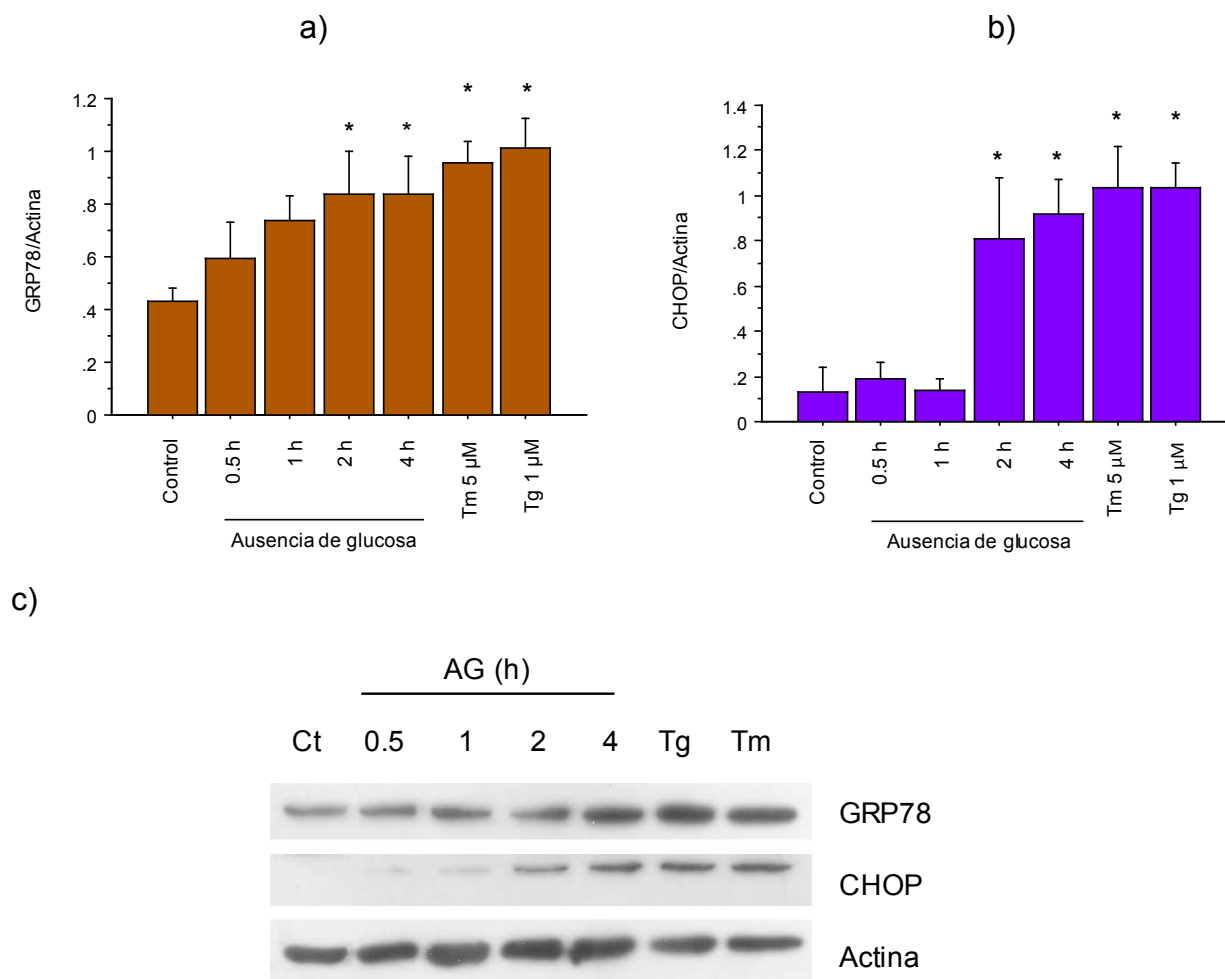


FIG. 13. Expresión de marcadores de estrés reticular durante la ausencia de glucosa. **a) y b)** Inducción de GRP78 y CHOP, después de exponer las células en un medio sin glucosa durante 0.5, 1, 2 y 4 h. Los niveles de dichas proteínas se determinaron a través de un ensayo de inmunoblot. Como controles positivos de inducción de estrés reticular se utilizaron células incubadas con Tm (5 μM) o Tg (1 μM) durante 48 h. Los resultados se expresan como niveles de GRP78 y de CHOP normalizados a los niveles de actina. Los datos son promedios \pm ES de cinco experimentos independientes (GRP78) o tres experimentos independientes (CHOP) y fueron analizados por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control sin AG. **c)** Imagen representativa de una membrana donde se muestran los niveles de expresión de GRP78 y CHOP a los tiempos indicados después de la ausencia de glucosa. Como control de carga se utilizó actina.

Los resultados de los inmunoblots se obtuvieron en colaboración con la Dra. Karla Hernández-Fonseca, durante su estancia posdoctoral en el Departamento de Biología de la Facultad de Química bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Estos resultados sugieren la presencia de estrés reticular durante la privación de glucosa. Para conocer si éste proceso podría estar relacionado con la disminución en la viabilidad celular y la muerte apoptótica, se incubaron las células en presencia del salubrinal, un inhibidor de la fosfatasa responsable de desfosforilar a eIF2 α -P. Los resultados indican que éste compuesto es capaz de restaurar de manera significativa la reducción del MTT cuando las células son privadas de glucosa durante 2 h, pero no cuando son privadas por 4 h (Figuras 4 y 6). Además, los cultivos incubados durante 2 h en AG en presencia de salubrinal preservan mejor su morfología y su apariencia es similar a la de los cultivos control (Figura. 5). Por último, el salubrinal redujo el porcentaje de núcleos condensados y fragmentados que se observan después de someter a los cultivos a la privación de glucosa durante un periodo de 2 h (Figura. 8).

VII. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que cuando los cultivos celulares son expuestos a un medio carente de glucosa durante un periodo de 2 y 4 h disminuye la sobrevivencia neuronal en un 61 y 63 %, respectivamente. Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que la muerte inducida en condiciones de inhibición glucolítica es un proceso lento que depende de la disminución de los niveles energéticos. Así mismo, la entrada de calcio por los receptores NMDA y la liberación de calcio de las pozas intracelulares del retículo endoplásmico (RE) intervienen activamente en el proceso de muerte (Hernández-Fonseca, 2004). Teniendo estos datos como antecedentes, investigamos si en nuestro modelo la inhibición de la salida de calcio del retículo podría tener un impacto sobre la sobrevivencia neuronal, sugiriendo que la alteración de este organelo podría participar en la muerte de las neuronas. Se sabe, que el calcio es liberado al citoplasma a través de los canales de los receptores a inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃R) y a rianodina (RyR) (Hernández-Fonseca *et al.*, 2007). Se observó un efecto protector a la muerte inducida por 2 h de ausencia de glucosa (AG) cuando los cultivos celulares se incubaron en presencia del dantroleno, un inhibidor de los RyR. Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que el tratamiento con dantroleno previene la muerte neuronal inducida por inhibición glucolítica provocada por yodoacetato en neuronas de hipocampo cultivadas (Hernández-Fonseca *et al.*, 2005). Otros estudios, muestran también la participación de la liberación de calcio por los RyR en la neurotoxicidad causada por el péptido beta-amiloide, en el cual el dantroleno previene parcialmente el incremento de calcio intracelular y la apoptosis inducida por el péptido (Ferreiro *et al.*, 2004). Además, el dantroleno ha mostrado proteger a las neuronas contra la excitotoxicidad inducida por ácido kainico *in vivo* e *in vitro* (Popescu *et al.*, 2002). Sin embargo, el efecto del dantroleno por sí solo no es suficiente para concluir que la salida del calcio del RE tiene una participación en el aumento del calcio intracelular durante la AG y en la muerte de las neuronas, por lo que son necesarios más experimentos para conocer el papel del RyR y del IP₃R.

El RE es el organelo más importante que regula la homeostasis de calcio intracelular. Alteraciones en las concentraciones de calcio reducen la capacidad de

plegamiento de proteínas del RE. Esto provoca la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas, una condición conocida como estrés reticular (Szegezdi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006). Para contrarrestar el estrés reticular, las células activan una respuesta que está altamente conservada en los organismos conocida como “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR). Los resultados presentados en este trabajo muestran que durante la AG se induce estrés reticular y una activación de la UPR, posiblemente debido al vaciamiento de calcio del RE a través de los RyR, los IP₃R y/o la deficiencia en el funcionamiento de la ATPasa de calcio del retículo (SERCA), debido a la disminución de los niveles de ATP observados en esta condición (Páramo *et al.*, 2010). Se observó un efecto protector del salubrinal, un inhibidor del estrés reticular cuando los cultivos celulares se incubaron en un medio carente de glucosa durante 2 h y en presencia de dicho compuesto, lo cual sugiere que el estrés del retículo participa en la muerte de las neuronas. En reportes previos se ha observado que el salubrinal inhibe la desfosforilación de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariótico (eIF2 α), reduce significativamente el estrés reticular inducido por ácido kaínico y la muerte neuronal *in vivo* e *in vitro* inducida por éste excitotóxico (Sokka *et al.*, 2007). En otro estudio, se observó que el tratamiento con salubrinal inhibió el estrés reticular contrarrestando la muerte celular y reduciendo la agregación de proteínas en las células PC6.3 provocado por la proteína hungtintina mutada (Reijonen *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que el salubrinal protege parcialmente a las células PC12 de la muerte celular provocada por la toxicidad inducida por la α -sinucleína mutada asociada con la enfermedad de Parkinson (Smith *et al.*, 2005). El salubrinal es una molécula pequeña, con baja toxicidad, que favorece el estado de fosforilación de eIF2 α inhibiendo selectivamente su desfosforilación, mediada por el complejo formado por la fosfatasa de serina/treonina, PP1 y su cofactor no enzimático GADD34 (complejo GADD34/PP1) (Boyce *et al.*, 2005).

Las caspasas, una familia de cisteín proteasas pueden contribuir a la apoptosis inducida por estrés reticular (Boyce *et al.*, 2006). Cuando los cultivos se incubaron en presencia de un inhibidor general de caspasas, el QVDOPH y un inhibidor específico de la caspasa-3, el DEVDCHO se observó un efecto protector de la muerte inducida por la AG. Debido al efecto observado con estos compuestos en los ensayos de reducción de

MTT, se determinó la presencia de núcleos apoptóticos a través de la tinción de Hoechst. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de núcleos apoptóticos en los cultivos expuestos a la AG (55 %) con respecto a los cultivos control (30 %). Por otro lado, el número de núcleos fragmentados y condensados disminuyó hasta un 29 % cuando las células se incubaron por 2 h en AG y en presencia del dantroleno, un 35 % con el salubrinal y con los inhibidores de caspasas, el QVDOPH un 36 % y con el DEVDCHO hasta un 32 % . En nuestras condiciones experimentales la muerte apoptótica juega un papel importante, sin embargo, un componente no apoptótico (necrosis) está presente aparentemente ya que los inhibidores de las caspasas no previenen totalmente la muerte de las neuronas.

Posteriormente, decidimos investigar las caspasas involucradas en la muerte apoptótica inducida por estrés reticular. Se evaluó la actividad de la caspasa-3 y la caspasa-12 usando sustratos fluorogénicos. Se observó un incremento en la actividad de la caspasa-3, después de la exposición de los cultivos a 2 h de AG y 2 h de reintroducción de glucosa (RG). En reportes previos se ha observado activación de la caspasa-3 en células de neuroblastoma humano en las que se ha inducido estrés reticular con tunicamicina y taspigargina (Hitomi *et al.*, 2003). En otro estudio usando sustratos fluorogénicos se observó que el tratamiento de células Sak2 (fibroblastos de embriones de ratón inmortalizados deficientes de Apaf-1) con taspigargina induce la activación de la caspasa-3. Además, estos autores observaron a través de un ensayo de inmunoblot el corte de la caspasa-3 y el procesamiento de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), un sustrato de dicha caspasa, en extractos de células Sak2 tratadas durante 24 y 36 h con taspigargina (Rao *et al.*, 2002). El efecto protector del QVDOPH en los ensayos de MTT y en la reducción del número de núcleos apoptóticos, sugiere que posiblemente otra caspasa está involucrada en la ejecución de la muerte apoptótica, además de que se encontró un aumento muy discreto en la actividad de la caspasa-3. Por esta razón decidimos medir la actividad de la caspasa-12. Ésta caspasa, es una proteína murina que se encuentra asociada con la membrana del RE, es activada por apoptosis inducida por estrés reticular pero no por otros estímulos, y es requerida para la muerte celular en respuesta a estrés reticular inducido

farmacológicamente (Boyce *et al.*, 2006). En este trabajo observamos un aumento en la actividad de la caspasa-12 cuando los cultivos fueron expuestos durante 1 y 2 h en AG.

El estrés reticular juega un importante papel en los mecanismos de daño cerebral inducidos por la isquemia/reperfusión. En un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratones, se observó, a través de ensayos de inmunoblot e inmunohistoquímica, la activación de la caspasa-12 después de 1 h isquemia y 5, 11 y 23 h de reperfusión (Shibata *et al.*, 2003). En otro estudio Rao y colaboradores (2002) mostraron que el tratamiento de células Sak2 con taspigargina o brefeldina induce estrés reticular, activación de la caspasa-12 y muerte celular. Estos autores mostraron que la muerte celular mediada por la caspasa-12 ocurre por una vía que depende de caspasa-9, pero por un mecanismo que es independiente de Apaf-1 y de la mitocondria. La caspasa-12 puede ser activada por estrés reticular a través de varios mecanismos: a) por el corte de la proteasa calpaína, b) la formación del complejo IRE1-TRAF2 que libera a la procaspasa-12 de TRAF2 y permite que ésta se homodimerice y autoprocese y c) a través del procesamiento de dicha caspasa por la caspasa-7 (Yoneda *et al.*, 2001; Berridge 2002; Szegezdi *et al.*, 2003; Boyce *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007; Malhotra *et al.*, 2007). En nuestras condiciones experimentales, la caspasa-12 puede estar siendo cortada y activada por la calpaína. Esta proteasa, se estaría activando debido al incremento de calcio intracelular como consecuencia de la salida de calcio del RE o debido a la entrada de este ión por activación de los receptores NMDA. Experimentos de nuestro laboratorio, muestran que la concentración de calcio intracelular aumenta progresivamente en neuronas de hipocampo cultivadas sometidas a diferentes periodos de ausencia de glucosa (Páramo *et al.*, 2010). En este trabajo, también se observó que un antagonista del receptor a glutamato, el MK-801 efectivamente previene la muerte neuronal, sugiriendo que otros procesos dependientes de calcio iniciados por excitotoxicidad están involucrados en la muerte neuronal inducida por la privación de glucosa (Páramo *et al.*, 2010). Además, hemos observado una rápida activación de la calpaína durante la AG (Páramo *et al.*, resultados no publicados), por lo que es posible que la caspasa-12 sea activada por calpaína en las presentes condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren fuertemente la inducción de estrés reticular durante la ausencia de glucosa. Se determinó mediante ensayos de inmunoblot la presencia de algunos marcadores de estrés reticular de la vía de PERK, entre ellos, eIF2 α fosforilado en la serina 51 (eIF2 α -P), ATF4, GRP78 y CHOP. En nuestras condiciones experimentales, se detectó un aumento en los niveles de eIF2 α -P y de ATF4 cuando los cultivos se incubaron durante 0.5, 1 y 2 h en AG. Por otro lado, la proteína chaperona GRP78, se detectó a partir de 2 h de AG, y el incremento se mantuvo hasta las 4 h. En el caso del factor de transcripción CHOP, ésta proteína se detectó hasta las 2 y 4 de AG, sugiriendo que el estrés reticular sostenido culmina en la inducción de la expresión de este factor de transcripción que está asociado a la muerte apoptótica. En reportes previos se ha observado que la isquemia cerebral aumenta la expresión de chaperonas del RE, tales como GRP78 y la proteína regulada por oxígeno de 150 kDa (ORP150) (Aoki *et al.*, 2001; Tamatani *et al.*, 2001). Tajiri y colaboradores (2004) usando un modelo de oclusión de la arteria carótida común bilateral (BCCAO) en ratones, durante 15 min mostraron que el mRNA de GRP78 es marcadamente inducido a las 12 h después de la BCCAO en el hipocampo y en el estriado. Por otro lado, en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratones, también se observó un aumento en la expresión de GRP78 después de 5-23 h de reperusión (Shibata *et al.*, 2003). La UPR es una vía de señalización que induce la síntesis de proteínas chaperonas, como GRP78 y GRP94, las cuales facilitan el plegamiento de las proteínas y una rápida restauración de las funciones del retículo endoplásmico. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que el estrés reticular puede contribuir a la muerte, ya que se induce la expresión de CHOP después de 2 h de AG y porque el salubrinal disminuyó el número de núcleos apoptóticos y restauró la reducción del MTT. Hay varias explicaciones respecto al mecanismo de estrés reticular inducido por la ausencia de glucosa. Se sabe que la ausencia de glucosa disminuye los niveles de ATP. Por otro lado el RE funciona como un almacén de calcio y juega un importante papel en la homeostasis de este ión. El calcio es bombeado al interior del lumen del RE a través de la SERCA y se libera al citoplasma por los IP₃R y RyR. Durante la ausencia de glucosa cuando el ATP disminuye, el funcionamiento de la SERCA es inhibido y el calcio del RE se puede agotar. Esta disminución de calcio altera

el plegamiento de proteínas en el RE y conduce finalmente a estrés reticular. De acuerdo a los resultados el estrés reticular se produce por la vía de PERK.

VIII. Conclusiones

- La activación de la caspasa-12 durante la ausencia de glucosa, sugiere la presencia de estrés reticular.

- Los niveles elevados de eIF2 α -P, ATF4, GRP78 y CHOP, en respuesta a la ausencia de glucosa, sugieren la presencia de estrés reticular activado por la vía de PERK.

- El estrés reticular inducido por la ausencia de glucosa, puede contribuir a la muerte neuronal apoptótica inducida en esta condición.

IX. Perspectivas

En el presente estudio se determinó la presencia de estrés reticular durante la ausencia de glucosa y su participación en la muerte neuronal inducida en esta condición. Sin embargo, aún falta por conocer si la actividad de la proteasa dependiente de calcio, calpaína, es la responsable de la proteólisis y activación de la caspasa-12 o bien, si esta caspasa está siendo activada a través de otros mecanismo como son, el procesamiento por la caspasa-7 o debido a la formación del complejo IRE1-TRAF2. Además, es importante evaluar el efecto del salubrinal sobre la fosforilación de eIF2 α y los distintos marcadores de estrés del RE de la vía de PERK, para comprobar que su efecto protector está asociado con la fosforilación de eIF2 α y el abatimiento del estrés reticular. También, falta por conocer si en nuestras condiciones de ausencia de glucosa hay activación de las otras dos vías de la respuesta a proteínas mal plegadas, IRE1 y ATF6.

X. Referencias

- Aguilera P, Cháñez-Cárdenas ME and Maldonado PD. “Recent advances in the use of antioxidant treatments in cerebral ischemia” (2007) In: “New perspectives on brain cell damage neurodegeneration and neuroprotective strategies”. Santamaría A, ME Jiménez, S.G. Pandalai (Editors). Research Signpost, Kerala, India 61-74
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular Biology of the cell. Fourth edition. Edit. Garland Science.
- Aoki M, Tamatani M, Taniguchi M, Yamaguchi A, Bando Y, Kasai K, Miyoshi Y, Nakamura Y, Vitek MP, Tohyama M, Tanaka H, Sugimoto H. 2001. Hypothermic treatment restores glucose regulated protein 78 (GRP78) expression in ischemic brain. *Molecular Brain Research* 95:117–128
- Attwell D, Laughlin SB. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21:1133–1145
- Auer RN. 1986. Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 17:699–70
- Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK. 1984. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathologica* 64:177–191
- Ballesteros JR, Mishra OP, McGowan JE. 2003. Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biology of the Neonate* 84:159–163
- Bano D, Nicotera P. 2007. Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 38:674-676
- Barinagarrementería F, Cantú C. 1997. Enfermedad vascular cerebral. McGraw-Hill Interamericana.

- Berridge MJ. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32:235–249
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HLI. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Molecular Cell Biology* 4:517-529
- Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22:8608–8618
- Bonde C, Norberg J, Noer H, Zimmer J. 2005. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136:779-794
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. 2005. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935-939
- Boyce M, Yuan J. 2006. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death and Differentiation* 13:363–373
- Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. 2003. Growth arrest and DNA Damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology* 23:1292–1303
- Camacho A, Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of Medical Research* 37:11-18

- Castrejón V, Carbó S, Martínez M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Educación Bioquímica* 26:49-57
- Cnop M. 2007. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 282:3989-3997
- Cryer. 2007. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *The Journal of Clinical Investigation* 117:868-870
- DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. 2002. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: Implications for neuronal survival or death. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 22:127–141
- Denault JB, Salvesen GS. 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews* 102:4489-4499
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22:391-397
- Durukan A, Tatlisumak T. 2007. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87:179-197
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira C. 2004. Involvement of endoplasmic reticulum Ca^{2+} release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *Journal of Neuroscience Research* 76:872–880

- Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T. 1998. Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *Journal of Neuroscience* 18:5151-9
- Gaut JR, Hendershot LM. 1993. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology* 5:589-595
- Groenendyk J, Opas M, Michalak M. 2006. Protein folding and calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Calcium Binding Proteins* 1:2:77-85
- Gundersen V, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 2001. Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunogold study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21:41-51
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. 2008. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Experimental Neurology* 211:85–96
- Haces ML, Massieu-Trigo L. 2005. Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Archivos de Neurociencias* 10:83-91
- Haces ML, Montiel T, Massieu L. 2010. Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165:28–38

- Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PK. 2005. Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 25:41–53
- Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Nishi T, Maier CM, Kinouchi H, Chan PH. 2003. Oxidative damage to the endoplasmic reticulum is implicated in ischemic neuronal death. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23:1117–1128
- Hernández-Fonseca K. 2004. Estudio sobre los mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por inhibición glicolítica: papel del glutamato y de las pozas intracelulares de calcio del retículo endoplásmico. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias
- Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 86:1768–1780
- Hernández-Fonseca K, Massieu L. 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 82:196–205
- Hernández-Fonseca K, Massieu L and Díaz-Muñoz M. 2007. “Interplay between intracellular calcium handling and reactive oxygen species. Role of mitochondria and endoplasmic reticulum” In: “The Neurochemistry of Neuronal Death”. Massieu L, Arias C and Morán J (Editors). Research Signpost, Kerala, India
- Hertz L. 2008. Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacology* 55:289–309

- Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, Tohyama M. 2003. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neuroscience Letters* 357:127–130
- Hussain SG, Ramaiah KVA. 2007. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *Current science* 93:1684-1696
- Kaufman RJ. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 110:1389-1398
- Kim I, Xu W, Reed JC. 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews* 7:1013-1030
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. 2006. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11: 5-13
- Kumar R, Azam S, Sullivan JM, Owen CR, Cavener DR, Zhang P, Ron D, Harding HP, Chen JJ, Han A, White BC, Krause GS, DeGracia DJ. 2001. Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 α kinase, PERK. *Journal of Neurochemistry* 77:1418–1421
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 22:193–201
- Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation* 13:385-392
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275

- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8:1003-1011
- Malhotra JD, Kaufman RJ. 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18:716–731
- Margail I, Plotkine M, Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 39:429–443
- Merksamer PI, Papa FR. 2010. The UPR and cell fate at a glance. *Journal of Cell Science* 123:1003-1006
- Messari SE, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M. 1998. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (glut4) in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 399:492–512
- Nakagawa T, Zhu H, Miroshima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan JY. 2000. Caspase-12 mediated endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98–103.
- Neumar RW. 2000. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Annals of Emergency Medicine* 36:483-506
- Olney JW. 1994. Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiology of Aging* 15: 259-260
- Oyadomari S, Mori M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation* 11:381–389

- Páramo B, Hernández-fonseca K, Estrada-sánchez AM, Jiménez N, Hernández-cruz A, Massieu L. 2010. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167:1057–1069
- Paschen W 2000. Role of calcium in neuronal cell injury: Which subcellular compartment is involved? *Brain Research Bulletin* 53:409–413
- Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, Mengesdorf T. 2003. Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 mRNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23:449–461
- Paschen W, Mengesdorf T. 2005. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409–415
- Patocková J, Marhol P, Tumova E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkovska J, Andel M. 2003. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiological Research* 52:131-135
- Popescu BO, Oprica M, Sajin M, Stanciu CL, Bajenaru O, Predescu A, Vidulescu C, Popescu LM. 2002. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6:565–569
- Raghubir R, Nakka VP, Mehta SL. 2011. Endoplasmic reticulum stress in brain damage. *Methods in Enzymology* 489:259-275
- Rao RV, Bredesen DE. 2004. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Current opinion in cell biology* 16:653-662

- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 277:21836–21842
- Rasheva VI, Domingos P. 2009. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 8:996-1007
- Reijonen S, Putkonen N, Nørremølle A, Lindholm D, Korhonen L. 2008. Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Experimental Cell Research* 314:950-960
- Ron D, Walter P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:519-529
- Ruiz A, Matute C, Alberdi E. 2009. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP₃ receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium* 46:273–281
- Sandberg M, Butcher ST, Hagberg H. 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 47:178–184.
- Saunders J, Ross HM. 2002. Hypoglycemia. The classic healthcare handbook. Edit. Kensington Books
- Schröder M, Kaufman RJ. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry* 74:739–789

- Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y. 2003. Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 118:491–499
- Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL. 2006. Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Seventh edition. Edit. Elsevier Academic Press
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27:1766–1791
- Singh P, Jain A, Kaur G. 2004. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Molecular and Cellular Biochemistry* 260:153–159
- Smith WW, Jiang H, Pei Z, Tanaka Y, Morita H, Sawa A, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. 2005. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Human Molecular Genetics* 14:3801–3811
- Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L. 2007. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *The Journal of Neuroscience* 27:901–908
- Suh, SW, Aoyama K., Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA. 2003. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *Journal of Neuroscience* 23:10681–10690

- 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. *The Journal of Clinical Investigation* 117:910–918
- Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, Chan PH, Swanson RA. 2008. Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28:1697–1706
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis. The story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010:186-194
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM and Samali A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. *EMBO reports* 7:880-885
- Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada J-I, Ushio Y, Mori M. 2004. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death and Differentiation* 11:403–415
- Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi M, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, Tohyama M. 2001. ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nature Medicine* 7:317–323
- Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, Maher F, Simpson IA. 1998. Glucose transporter expression in brain: Relationship to cerebral glucose utilization. *Developmental Neuroscience* 20:369-379

- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21:2-21
- Verkhratsky A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiological Reviews* 85:201-279
- Wieloch T. 1984. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683
- Wu J, Kaufman RJ. 2006. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death and Differentiation* 13:374–384
- Yang W, Paschen W. 2009. The endoplasmic reticulum and neurological diseases. *Experimental Neurology* 219:376-381
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *Journal of Biological Chemistry* 276:13935–13940
- Zhao L, Ackerman SL. 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology* 18:444-452
- Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes and Development* 12:982–995