



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inducción de Estrés Oxidante en el Cerebro
del Ratón *in vivo* por la Hipoglucemia Aguda
y su Relación con la Muerte Neuronal**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

LETICIA AMADOR ALVARADO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Inducción de estrés oxidante en el cerebro del ratón in vivo por la hipoglucemia aguda y su relación con la muerte neuronal

realizado por **Amador Alvarado Leticia** con número de cuenta **3-0329592-5** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Tutora

Suplente Dr. Octavio César García González

Suplente Dra. Milagros Méndez Ubach

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, 17 de mayo de 2013
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

FACULTAD DE CIENCIAS
ACT. MAESTRO ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Lourdes Massieu Trigo en el laboratorio AL-302 del Departamento de Neuropatología Molecular de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, y fue financiado a través del proyecto S-112179 otorgado por el CONACyt.

Agradezco a la Biol. Teresa Montiel Montes por su ayuda en el establecimiento del modelo de hipoglucemia en el ratón, la supervisión de los experimentos y por su valiosa asesoría técnica.

Se agradece al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela por su asistencia en microscopía confocal

Gracias a los sinodales que revisaron esta tesis, por brindarme sus valiosos comentarios y correcciones: Dr. Julio Morán Andrade, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dra. Milagros Méndez Ubach y Dr. Octavio César García González.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

. . . A ti, por guiarme a lo largo del camino, que en medio de tanta confusión me hizo resistir y superar tantas caídas, pero con este logro aprendí que uno debe caer para saber realmente a dónde quiere ir y que por más complicada que parezca la proeza, el seguir soñando y hacerlo palpable es a lo que yo nombro vivir. Por cada persona que me fue permitido conocer a su tiempo y espacio trayendo siempre a mi vida una razón . . . Gracias

A mis padres, que sin ellos no estaría aquí, por su amor, paciencia y comprensión a lo largo de esta vida, por ser su hija y perdón si no me se comportar. Por acompañarme en este sueño que les aseguro dará muchos frutos. Mami gracias por buscar mi mirada perdida y hacerla regresar, recordarme que soy un ser vivo con defectos y virtudes. Por saber que pase lo que pase van a estar conmigo, los amo. Gracias

A mis hermanos por todo lo vivido, por mostrarme todos mis defectos y aun así seguir siendo mis hermanos. No es fácil, pero más difícil es aceptar algo que no se quiere por miedo a no luchar por lo que realmente uno es capaz y vale la vida. Gracias por estar ahí y criticarme, sonreírme y/o alejarse. Por permitirme escuchar cantar a un niño, por jugar con ellos y presenciar tanta sabiduría junta, por mis peques. Por ser mis hermanos, los amo. Gracias

A Ye por encaminarme y acompañarme en esta aventura de lucha y sacrificio, de miedo y esperanza, de enojos y risas, de apoyo y gratitud. Por tus libros y pláticas locas, por ser mi ejemplo a seguir. Gracias hermana

A JM pieza clave en este sueño, por enseñarme que la victoria no se disfruta hasta que se está en el campo de batalla, que es vida cuando nuestro cuerpo siente los dolores de la batalla pero que goza por estar ahí luchando, por enfrentarse y no ser cobarde al no asistir. Por enseñarme a querer, por los momentos mágicos que me hiciste creer y vivir, en verdad eres alguien mágico. Gracias.

A Erick por el cariño, apoyo y hacer cada momento más ameno. Por enseñarme que esta vida está llena de retos y oportunidades que no tengo porque cedérselos a alguien más sabiendo que poseo la capacidad de hacerlos míos. Por mostrarme que la vida está llena de sacrificios y uno tiene que saber afrontarlos por más duros que parezcan, que de segundos y decisiones está hecha la vida, por compartirla conmigo. Aquí estamos y seguimos en la lucha. Gracias

A Dra. Lourdes Massieu Trigo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por permitirme construir este sueño que hoy culmina para comenzar uno de muchos. Gracias por su apoyo,

interés y persistencia en este proyecto y demás, por el tiempo dedicado, por su comprensión y gratos consejos en estos años. Me quedaría corta al escribir mi agradecimiento. Gracias

A la Biol. Teresa por su destacada capacidad de transmitir sus amplios conocimientos científicos así como su calidad humana. Por ser un ejemplo a seguir. Y venga esa frase célebre que tanto me hizo enojar, comprender y que ahora tanto valoro y vivo. . . “más lento que voy de prisa”. Por ese manjar que a todos nos hace salivar y tanto disfrutar, “la cochinita”. Gracias

Gracias a los revisores de esta tesis, especialmente a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por su esmero en la revisión de este proyecto, por su tiempo dedicado y valiosas correcciones y comentarios. Al Dr. Morán por esa tarde llena de sinceridad y regalos, sabios consejos, que estoy dispuesta a enfrentar y que quiero hacerlo.

A mis compañeros de laboratorio Tere, Gaby, Selene, Eva, Marlene, A.Julio, Cristian y por supuesto Ceci, con quienes compartí pláticas y risas. Por algo nos toco reunimos ahí, justo nosotros. Aprecie mucho el equipo de trabajo que me dio el laboratorio, les deseo lo mejor.

A Don Gabo (Gaby) y a Cherto (Abra-ham) por sorprender mi vida, por ser parte de mi presente y que los aprecio por lo que son y estoy lista para aprender más mucho más. Por esas charlas, retos, penas, miedos, risas, dudas que nunca olvidare y las que faltan. Por esas comidas donde me sentía más fuerte y poderosa que nunca. Por ayudarme a descifrar más que las manos y que todo tiene una razón por más pequeña e insignificante que parezca, por enseñarme a aventarme y trascender. Por escuchar personas tan locas como yo o peor, sabía que existían. Por construir sueños conmigo que iremos realizando día a día, por estar conmigo en esos momentos de intranquilidad y desequilibrio mental, perdón por tanto trauma. Por acompañarme en una nueva etapa. Gracias

A la biología por hacerme ver que la vida realmente es complicada pero que vale la pena vivir descubriéndola. Gracias

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a sus instalaciones por acogerme y brindarme todo lo que se requiere para mi formación. Gracias

"Su universo es un gran triunfo. Quiero compartir mi entusiasmo y emoción acerca de esta búsqueda. Así que recuerden mirar a las estrellas y no a sus pies . . . sean curiosos. Y a pesar de lo difícil que la vida pueda parecer, siempre hay algo que pueden hacer y ser exitosos en ello". Stephen Hawking

"Jamás algo que valga la pena será sencillo"

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN	5
I.I GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO	5
I.II METABOLISMO ENERGÉTICO DEL CEREBRO	7
I.II.I Transportadores de la glucosa en el cerebro	7
I.II.II Otros sustratos cerebrales	9
I.III RUTAS METABÓLICAS DE LA GLUCOSA	10
I.IV LA HIPOGLUCEMIA	13
I.IV.I La hipoglucemia en la Diabetes Mellitus	14
I.IV.II Respuestas contrareguladoras ante la hipoglucemia	14
I.IV.III Alteración del ciclo de Krebs	17
I.IV.IV Vulnerabilidad Selectiva de las Neuronas ante el daño hipoglucémico	19
I.V TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA	20
I.V.I Excitotoxicidad	22
I.V.II Excitotoxicidad asociada a la muerte neuronal	23
I.VI ESPECIES REACTIVAS	26
I.VI.I Radical libre	26
I.VI.II Especies Reactivas del Oxígeno	26
Superóxido	27
Peróxido de hidrógeno	28
Radical Hidróxilo	28
I.VI.III Especies Reactivas del Nitrógeno	28
I.VI.IV Función de las Especies Reactivas del Oxígeno	29
I.VI.V Fuentes productoras de ERO	29
Producción de ERO por la mitocondria	30
Producción de ERO por la NADPH oxidasa	30
I.VI.VI Sistemas de defensa antioxidante	31
I.VII ESTRÉS OXIDANTE	31
I.VII.I Estrés Oxidante y Daño Hipoglucémico	32
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35

III.	JUSTIFICACIÓN	35
IV.	HIPÓTESIS	36
V.	OBJETIVO	36
	V.I Objetivos Particulares	36
VI.	METODOLOGÍA	37
	VI.I Modelo Experimental	37
	VI.II Implantación de Electrodo Craneales	37
	VI.III Análisis de la Actividad Eléctrica Cerebral	38
	VI.IV Inducción de Hipoglucemia	38
	VI.V Perfusión y Obtención del Tejido Cerebral	40
	VI.VI Tinción de Núcleos	40
	VI.VII Determinación de ERO	41
	VI.VIII Determinación de la Muerte Neuronal	43
	VI.IX Análisis Estadístico	43
VII.	RESULTADOS	44
	Análisis EEG durante la caída progresiva de la glucosa sanguínea	45
	Producción de ERO durante la hipoglucemia severa después de la RG	47
	Generación de ERO en la corteza cerebral	47
	Producción de ERO en las distintas áreas de la corteza cerebral	50
	Producción de ERO en el cuerpo estriado	55
	Producción de ERO en el hipocampo	56
	Muerte Neuronal asociada a la hipoglucemia severa	64
VIII.	DISCUSIÓN	65
IX.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	72
X.	REFERENCIAS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín Trifosfato
CA ₁	Cuerno de Ammon 1
CA ₃	Cuerno de Ammon 3
CA ₄	Cuerno de Ammon 4
Cx	Corteza cerebral
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
DHE	Dihidroetidio
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMT ₁	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DMT ₂	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
EEG	Electroencefalograma
ER	Especies Reactivas
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
Et	Etidio
FJB	Fluoro-Jade B
FJB ⁺	Células positivas a Fluoro-Jade B
GD	Giro dentado hipocampal
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HGS	Hipoglucemia Severa
RG	Hipoglucemia Severa con reintroducción de glucosa
PR	Hipoglucemia Severa con presencia de pérdida del reflejo de enderezamiento y con reintroducción de glucosa
i.p.	intraperitoneal
NADPH	Nicotinamida Adenín Dinucleótido Fosfato Reducido
O ₂ ^{•-}	Superóxido
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia

RESUMEN

La hipoglucemia es la principal complicación común de la terapia de insulina en pacientes que padecen Diabetes Mellitus tipo 1 expuestos al estricto control glucémico. Cuando la hipoglucemia está acompañada por coma (cese de la actividad eléctrica cerebral o isoelectricidad), la muerte neuronal masiva se presenta en regiones cerebrales vulnerables tales como el hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza cerebral. Recientemente se ha sugerido que la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN), así como el estrés oxidante están involucrados en el daño cerebral hipoglucémico. Sin embargo, la distribución de las ERO en regiones cerebrales discretas no se ha estudiado en detalle. Previamente se ha sugerido que la producción de ERO es estimulada por la reintroducción de glucosa (RG), seguido de un episodio de hipoglucemia con isoelectricidad. Usando al dihidroetidio (DHE) como marcador sensible a la oxidación, hemos investigado la distribución de las ERO en diferentes regiones cerebrales durante la hipoglucemia severa y prolongada en ausencia de isoelectricidad, así como el impacto que tiene la RG en la producción de ERO. Nuestros resultados muestran que en el hipocampo, la corteza cerebral y el cuerpo estriado incrementa la generación de ERO después de la hipoglucemia severa antes de la RG, siendo el hipocampo donde ocurre el mayor incremento. La RG estimula aún más la producción de ERO en el hipocampo, particularmente en las regiones CA₁, CA₃ y la región del giro dentado e hilus, así como en el cuerpo estriado, mientras que en la corteza cerebral las áreas más susceptibles a la RG son la corteza somatosensorial y la corteza retrosplenial. Los resultados sugieren una producción diferencial de ERO durante la hipoglucemia así como una diferente respuesta ante la RG.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso está dividido en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). En los mamíferos, el SNC se encuentra protegido contra las influencias externas por el cráneo, una triple capa de membranas, las meninges¹, y está bañado por el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Pasantes et al., 1991; Brodal, 1998). Por otro lado, el SNP lleva la información desde y hacia el SNC está protegido por la fascia, piel, músculos y órganos donde se encuentra distribuido (Stanley y Elliott, 2008).

El sistema nervioso contiene dos clases principales de células: neuronas y células gliales. Las neuronas son el elemento conductor básico en el cerebro, constituidas principalmente por un cuerpo celular o soma, dendritas y axón. El sitio de contacto entre el axón de una célula nerviosa y las dendritas y el soma de otra neurona es la sinapsis (Purves et al., 2008). Se estima que el cerebro humano contiene más de 100 mil millones de neuronas, mientras que el número de células gliales supera entre 5 y 10 veces a la población neuronal (Kandel y Schwartz, 1985).

Las células gliales incluyen a los astrocitos, oligodendroglia y microglia, cada uno con funciones específicas y bastante diferentes. Durante mucho tiempo se pensó que el papel de las células gliales estaba limitado al mantenimiento de la citoarquitectura del cerebro. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que las células gliales establecen una estrecha relación con las neuronas a través de sistemas denominados neuro-gliales, que se encargan de mantener la homeostasis cerebral (García y Massieu, 2004).

El SNC se divide en: médula espinal, tallo cerebral, cerebelo, diencefalo y encéfalo, regiones que a su vez tienen otras subdivisiones. Entre las categorías básicas² de las neuronas, las interneuronas forman la gran mayoría de células en el SNC.

La organización celular del sistema nervioso es distinta respecto a la de los demás tejidos, ya que éste se encuentra formado por varios tipos celulares, que morfológicamente difieren en

¹ Las meninges están constituidas por tejido conectivo elástico y poseen un número importante de vasos sanguíneos. La más exterior, la duramadre, está adosada a las paredes interiores de los huesos y tiene a la segunda, la membrana aracnoidea, adherida a su superficie interior. La meninge más interior, la piamadre, cubre toda la superficie del SNC. La aracnoidea y la piamadre se conocen como las leptomeninges, y el espacio entre ellas se llama espacio leptomeníngeo (Pasantes et al., 1991).

² Hay tres categorías básicas de neuronas: 1) receptoras, los ganglios de las raíces dorsales espinales y de los nervios craneales con componentes sensoriales generales; 2) efectoras, las células del asta ventral, los núcleos motores de los pares craneales, y la división motora del sistema nervioso autónomo; y 3) las interneuronas, forman la gran mayoría de las células en el SNC (stanley y Elliott, 2008).

tamaño, número y complejidad de las dendritas, el número de conexiones sinápticas, longitud de los axones y la distancia a través de la cual se establecen las conexiones sinápticas, el grado de mielinización axonal, entre otras. Por lo tanto, cada célula nerviosa al poseer distintas porciones, bien definidas, también posee funciones específicas dentro de la función celular global (Pasantes et al., 1991). Además, las neuronas pueden ser clasificadas químicamente en base al neurotransmisor que utilizan para la transmisión química o neuromodulación; por ejemplo, glutamato, GABA, acetilcolina, dopamina, adenosina o péptidos transmisores y neuromoduladores, entre otros. Esta gran diversidad entre las poblaciones neuronales es una fuerte indicación de que aunque todas las neuronas contienen el mismo código genético en su genoma, cada población neuronal tiene su propio perfil de expresión génica (Wang y Michaelis, 2010).

I.II METABOLISMO ENERGÉTICO DEL CEREBRO

El cerebro recibe el 15% del flujo sanguíneo y aunque representa aproximadamente el 2% del peso total del cuerpo humano, se estima que consume alrededor del 25% del total de glucosa y el 20% del total de oxígeno consumido por el cuerpo (Magistretti y Pellerin, 1999). La glucosa es el sustrato energético más importante en el cerebro capaz de mantener la actividad cerebral, por lo que la función cerebral se ve comprometida ante la baja disponibilidad de glucosa (Gibson y Dienel, 2007). Dada la baja eficacia del cerebro para almacenar sustratos energéticos como el glucógeno, el cerebro depende del aporte continuo de glucosa para su funcionamiento normal. La alta actividad metabólica que llevan a cabo las neuronas se relaciona con la gran cantidad de mitocondrias en su citoplasma, las cuales dependen del aporte de glucosa para producir adenosin trifosfato (ATP) (Brodal, 1998).

Se estima que aproximadamente el 75% del consumo energético del cerebro está relacionado con la señalización, mientras que el 25% restante lo utiliza en funciones esenciales como la síntesis y degradación de proteínas, nucleótidos y fosfolípidos, el transporte axoplásmico, así como prevenir la pérdida de protones en la mitocondria. Se estima que el uso energético total del cerebro es de 21 $\mu\text{mol ATP/g/min}$, teniendo tasas más altas la materia gris que la materia blanca (Siegel, 2006).

I.II.I Transportadores de glucosa en el cerebro

El cerebro depende de un continuo abastecimiento de glucosa desde el torrente sanguíneo. La glucosa, al ser una molécula altamente hidrofílica, es transportada al cerebro a través de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral por difusión facilitada a través de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs). Los GLUTs son una familia de proteínas formadas por doce segmentos transmembranales (Zigmond, 1999), de las que hasta el momento se han identificado 13 miembros denominados GLUT1-GLUT12 y el transportador de mioinositol (Maher et al., 1994; Nehlig, 1997; Choeiri et al., 2005; Simpson et al., 2007). Por otra parte, el transportador de monocarboxilatos (MCT) es responsable del transporte de lactato, piruvato, acetoacetato y β -hidroxibutirato. Ocho miembros diferentes de la familia de MCT se han identificado, sin embargo, solo los transportadores MCT1-4 se han caracterizado en detalle en el cerebro (Simpson et al., 2007).

Aunque los GLUTs se han detectado en el SNC, sólo algunos miembros de la familia están ampliamente distribuidos en el cerebro de los mamíferos (Choeiri et al., 2005). Con la excepción de GLUT1, que se encuentra expresado ubicuamente, los demás miembros de la familia tienen distintos patrones de expresión tanto celular, como tisular (Simpson et al., 2007). GLUT1 y GLUT3 predominan en los mamíferos (Maher et al., 1994).

El GLUT1 se encuentra presente en dos isoformas de masa molecular de 55 kDa y 45 kDa, quienes difieren en su grado de glucosilación (Vannucci y Vannucci, 2000). GLUT1 de 55 kDa se encuentra principalmente en los microvasos, el plexo coroideo y en las células endoteliales (Figura 1), mientras que GLUT1 de 45 kDa³ se localiza predominantemente en los astrocitos, incluida la barrera hematoencefálica (BHE) (Simpson et al., 2007). El GLUT3 se expresa principalmente en las neuronas (Zigmond et al., 1999).

El GLUT5⁴ está localizado exclusivamente en la microglía, los macrófagos residentes del cerebro, participando en las respuestas inmunes e inflamatorias del SN. Este transportador se ha encontrado en niveles bajos, tanto en el cerebro del humano como en el ratón (Vannucci et al., 1997). GLUT2 está selectivamente ubicado en los astrocitos en áreas discretas del cerebro, como el hipotálamo y el tallo cerebral, los cuales participan en la regulación de la conducta alimentaria

³ Bajo condiciones de cultivo celular, todas las células neuronales expresan GLUT1 de 45 kDa. Sin embargo, este fenómeno parece ser debido a la capacidad de GLUT1 a ser inducido por el estrés celular (Zigmond et al., 1999).

⁴ En el tejido periférico, particularmente en el intestino delgado, de donde fue clonado, funciona como un transportador de fructosa, cuya concentración es muy baja en el cerebro, por lo que en el SN, el GLUT5 podría transportar otros sustratos.

así como en el control central de la liberación de insulina. El GLUT₄ sensible a insulina, se encuentra localizado en el endotelio vascular del cerebro (Zigmond et al., 1999). Varias técnicas *in vivo* han permitido evidenciar que algunas regiones poseen una alta densidad de transportadores de glucosa, como son la corteza cerebral y el hipocampo (Maher et al., 1994). La expresión de los dos principales transportadores del cerebro, GLUT₁ y GLUT₃, está regulada de acuerdo a la demanda metabólica y a la tasa de utilización de energía en las diferentes regiones.

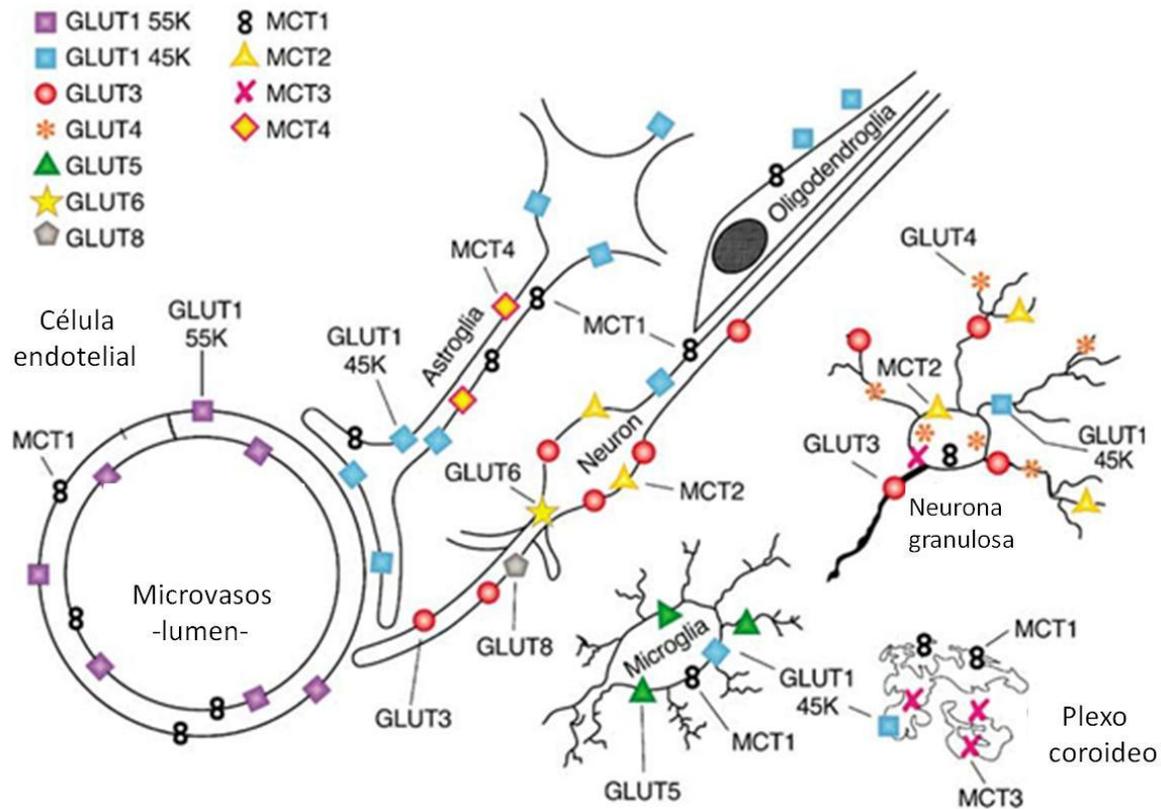


Figura 1. Representación esquemática de la localización celular de los transportadores de glucosa (GLUTs) y los transportadores de monocarboxilatos (MCTs) en el cerebro de los mamíferos (Tomado de Simpson et al., 2007).

I.II.II Otros sustratos cerebrales

Aunque la glucosa es el principal sustrato del metabolismo energético neuronal, en determinadas circunstancias el cerebro tiene la capacidad de usar otros sustratos energéticos derivados del torrente sanguíneo, como son los cuerpos cetónicos. Estas circunstancias se presentan durante la lactancia debido al alto contenido de ácidos grasos en la leche materna o durante el ayuno prolongado en donde aumenta la lipólisis (Lodish et al., 2008). Por otra parte, se propone que durante la actividad intensa el lactato producido por la glucogenólisis mantiene la

actividad neuronal (Secher y Quistorff, 2005). La concentración de glucógeno en el cerebro es mucho más baja en relación a otros tejidos, por lo que la reserva energética es limitada, ubicándose predominantemente en los astrocitos. A pesar de la capacidad del cerebro por usar otros sustratos en ciertas condiciones, la glucosa es el principal sustrato obligado para el metabolismo energético cerebral.

I.III RUTAS METABÓLICAS DE LA GLUCOSA

Una vez que la glucosa entra a la célula tiene tres principales destinos: 1) Puede ser procesada a través de la glucólisis para proveer a la célula de ATP a partir de moléculas de tres carbonos como el piruvato; 2) puede ser almacenada en forma de glucógeno o almidón, y 3) puede ser oxidada por la vía de las pentosas fosfato para dar lugar a la ribosa 5 fosfato que es necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos y NADH como producto reductor (Nelson y Cox, 2008), como se observa en la figura 2. La glucosa en el cerebro es casi completamente oxidada a CO_2 y H_2O a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y la fosforilación oxidativa, produciendo 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Zigmond et al., 1999). Además, a través de las diferentes vías de oxidación de la glucosa se produce un amplio rango de intermediarios metabólicos que posteriormente se pueden oxidar para producir energía (lactato, piruvato, glutamato o acetato) (Bélanger et al., 2011).

La glucólisis es una vía central casi universal del catabolismo de la glucosa; además, es la vía con el mayor flujo de carbono en la mayoría de las células. En algunos tejidos y tipos celulares de los mamíferos como los eritrocitos, la médula renal, el cerebro, y los espermatozoides, entre otros, el metabolismo de la glucosa es la única fuente de energía (Nelson y Cox, 2008). Esta vía se lleva a cabo en el citosol y no requiere de oxígeno molecular, proceso denominado catabolismo anaeróbico de la glucosa (Lodish et al., 2008). La glucólisis consta de diez reacciones enzimáticas citosólicas solubles en agua, donde una molécula de glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato (Figura 2), que posteriormente se transformará en acetil CoA para entrar al ciclo de Krebs (Lodish et al., 2008).

Durante el proceso, se obtiene un balance neto de energía de 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Esta ruta generalmente es agrupada en dos fases: 1) fase preparativa o de gasto energético, en donde se consumen 2 moléculas de ATP por cada glucosa –reacciones 1 y

3; y 2) fase oxidativa o de obtención de energía, en donde se reduce el NAD, que se transforma en NADH + H⁺ y se forman 4 moléculas de ATP por transferencia de grupos fosfato al ADP (Nelson y Cox, 2008).

El piruvato producido por la glicólisis entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs, que consta de nueve reacciones, en donde la acetilCoA es oxidada a CO₂ (Figura 4).

El resultado total es que por cada grupo acetilo que entra al ciclo como acetilCoA se producen 2 moléculas de CO₂, 3 moléculas de NADH, una de FADH₂ y un GTP (Lodish et al., 2008), los cuales son transferidos a la cadena respiratoria y a la subsecuente producción de ATP en la mitocondria.

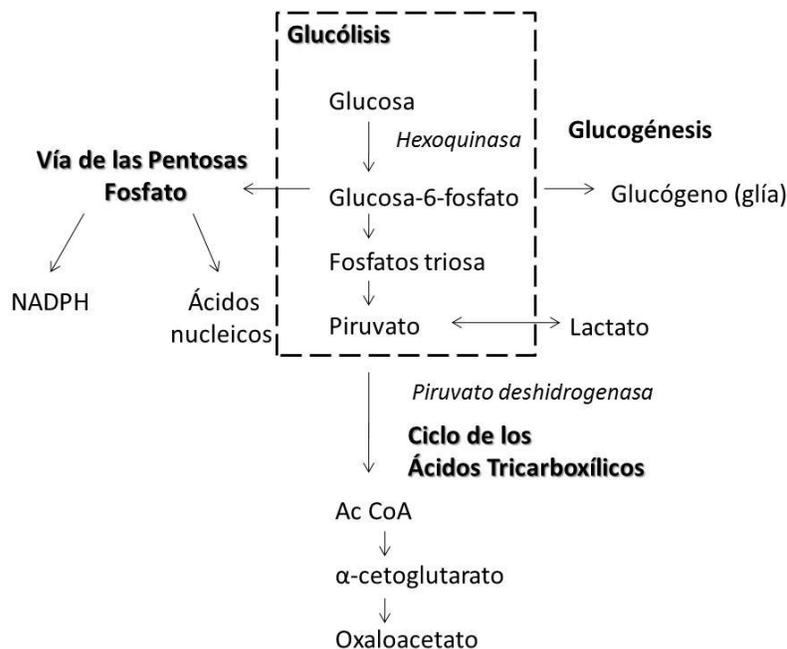


Figura 2. Las distintas vías metabólicas donde se oxida la glucosa son de vital importancia para el buen funcionamiento del cerebro. En este esquema se ilustran algunas de las relaciones entre el metabolismo de la glucosa y un número de metabolitos intermedios importantes, así como de compuestos importantes para la neuroquímica derivada de ellos (Modificado de McCall., 2004).

La vía de las pentosas fosfato, también denominada vía de las hexosas monofosfato o vía del fosfogluconato, tiene dos funciones primordiales: generar poder reductor en forma de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y obtener pentosas, concretamente ribosa. Esto se logra a través de la descarboxilación oxidativa del carbono-1 de la Glucosa-6-fosfato en dos reacciones consecutivas que conducen a la producción de CO₂ + ribulosa-5-fosfato y 2 NADPH + 2 H⁺ (Riganti et al., 2012). El NADPH, además de ser utilizado para la producción de nucleótidos, se requiere como un agente reductor en varios pasos de la síntesis de ácidos grasos, colesterol y hormonas esteroideas, así como en varias reacciones de desintoxicación. El NADPH es el sustrato

de la glutatión reductasa (GSR), enzima que regenera glutatión reducido (GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG), que es previamente producido por reacciones catalizadas por la GSH peroxidasa (GSHPx). La alteración de estas enzimas desencadena que la célula tenga una mayor susceptibilidad al estrés oxidante (Riganti et al., 2012). Comparado con las vías productoras de energía como la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, la vía de las pentosas fosfato contribuye en mucho menor medida a la oxidación total de glucosa. En condiciones basales solamente el 5% de la glucosa es oxidada por esta vía en el cerebro adulto (Siegel, 2008). Sin embargo, como ya se mencionó, los productos obtenidos de esta vía son esenciales para las células como equivalentes reductores para procesos antioxidantes y biosintéticos (Gibson y Dienel, 2007).

En todos los organismos, el exceso de glucosa es convertido a formas poliméricas para almacenamiento como glucógeno en vertebrados. En los mamíferos, el glucógeno se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo esquelético (Brown et al., 2005). El glucógeno se ha localizado casi exclusivamente en los astrocitos en el cerebro adulto (Bélanger et al., 2011). A pesar de su bajo nivel en el SNC comparado a los tejidos periféricos (de 6-12 μmol , mientras que en el hígado es de 100-500 μmol), el glucógeno es la única reserva energética del cerebro. Dada su baja concentración, si el glucógeno fuese la única forma de energía en el cerebro, se consumiría en minutos. Por otro lado, se ha sugerido que el lactato formado a partir del glucógeno puede ser transportado de los astrocitos a las neuronas durante la actividad intensa (Brown et al., 2005).

La obtención de energía a través del rompimiento del glucógeno en glucosa, representa una forma favorable de almacenamiento de glucosa, ya que puede ser rápidamente metabolizado sin gasto de ATP, y puede producir ATP bajo condiciones anaeróbicas (Bélanger et al., 2011). La síntesis de glucógeno se da por la fosfoglucomutasa quien convierte a la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, quien reacciona con el uridin trifosfato (UTP; por sus siglas en inglés, uridine triphosphate) y forman el nucleótido activo, uridin-difosfato-glucosa (UDP-glucosa); proceso en el cual se liberan dos grupos fosfato. La reacción es catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa, y ésta es la fuente de los residuos glucosilo que donan a la molécula de glucógeno (Brown y Ranson, 2007).

Cuando el consumo de glucosa disminuye severamente, el glucógeno sostiene el metabolismo de las neuronas. Para ello, el glucógeno es metabolizado para liberar sustratos como glucosa libre o glucosa-6-fosfato (Siegel et al., 2006).

I.IV LA HIPOGLUCEMIA

El rango fisiológico de la concentración de glucosa sanguínea oscila entre 70 y 128 mg/dl (3.9-7.1 mM) (Cryer, 2006). Cuando los niveles de glucosa sanguínea se encuentran por debajo de este rango se considera que hay un estado hipoglucémico.

En el 2004, la American Diabetes Association determinó como hipoglucemia la disminución de la glucosa plasmática a niveles iguales o menores a 70 mg/dl (3.9 mmol/l). Aunque no hay una definición estricta, esta asociación ha clasificado los episodios de hipoglucemia en cinco categorías distintas: 1) hipoglucemia severa (HGS), cuando se presentan cambios neurológicos tales como para requerir de la ayuda de terceras personas; 2) hipoglucemia sintomática documentada, cuando la concentración de glucosa plasmática es igual o menor a 70 mg/dl y está acompañada por síntomas típicos de la hipoglucemia (ver abajo); 3) hipoglucemia asintomática; 4) hipoglucemia sintomática probable e 5) hipoglucemia relativa, cuando se presentan síntomas que sugieren hipoglucemia a una concentración de glucosa plasmática superior a 70 mg/dl (Tesfaye y Seaquist, 2010). Sin embargo, generalmente la hipoglucemia se clasifica como leve (3.2 a 3.6 mM), moderada (2.3 a 3.2 mM) y severa (<2 mM) (Mohseni, 2001; Cryer, 2007; Suh et al., 2007a; Lancherade et al., 2009).

La hipoglucemia está asociada a una serie de enfermedades y trastornos metabólicos, entre los que se encuentran la presencia de insulinomas, desórdenes hepáticos, insuficiencia renal, trasplantes en el tejido de los islotes pancreáticos, malnutrición y también puede presentarse en el recién nacido. Sin embargo, su importancia clínica se encuentra principalmente asociada al tratamiento de la *Diabetes Mellitus* (DM), ya que la administración de insulina y/o sulfonilureas para controlar los niveles elevados de glucosa sanguínea y disminuir las complicaciones microvasculares derivadas de este padecimiento, produce episodios de hipoglucemia (Cryer, 2002). La hipoglucemia neonatal es una condición relativamente común que puede resultar en alteraciones neurológicas permanentes e incluso en la muerte (Vermeulen y Valk, 2005). La hipoglucemia en infantes se puede deber a la producción inadecuada de glucosa, el incremento en la utilización de glucosa o anomalías de la regulación endocrina del metabolismo (Mohseni, 2001).

Los síntomas de la hipoglucemia son categorizados como neurogénicos y neuroglucopénicos. Los síntomas neurogénicos son el resultado de los cambios fisiológicos causados por la activación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), en respuesta a la hipoglucemia

y son claves para la percepción de la hipoglucemia. Entre estos síntomas se encuentra: sudoración, hambre, sensación de hormigueo y debilidad/temblor, palpitaciones, y ansiedad. Los síntomas neuroglucopénicos son el resultado de la privación de glucosa al cerebro, e incluyen calor, debilidad, dificultad para pensar/confusión y cansancio/somnolencia. Se pueden presentar convulsiones, coma y hasta la muerte si la hipoglucemia no es corregida (Diedrich et al., 2002; Tesfaye y Seaquist, 2010). Estas observaciones clínicas resaltan la importancia de que el suministro constante de glucosa sanguínea es un requerimiento esencial para mantener la función normal del cerebro.

I.IV.I La Hipoglucemia en la Diabetes Mellitus

La Diabetes mellitus es un desorden causado por una deficiencia relativa o absoluta de la hormona insulina. Hay dos tipos de este desorden, la Diabetes tipo 1 y la tipo 2 (DMT₁ y DMT₂, respectivamente). La DMT₁ se desarrolla en etapas tempranas de la vida y se asocia con la pérdida de las células β , secretoras de insulina del páncreas. La DMT₂ ocurre principalmente en adultos y es caracterizada por la respuesta reducida a la insulina en conjunto con el deterioro de la función de las células β (Suh et al., 2007a; McCall, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes. Se calcula que en el 2004 fallecieron 3.4 millones de personas como consecuencia del exceso de azúcar en la sangre (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>). El tratamiento de hoy en día para esta alteración es el control estricto de los niveles de glucosa sanguínea, a través de la administración de insulina, lo cual resulta peligroso debido al riesgo de un mal control de la glucemia que conduce a la presencia de periodos de hipoglucemia.

Datos del DCCT⁵ (Diabetes Control and Complications Trial Research Group), muestran que el control de los niveles de glucosa sanguínea en pacientes diabéticos disminuye o previene las complicaciones de esta alteración, como son la retinopatía, neuropatía, y la nefropatía. Sin

⁵ The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) es un estudio multicéntrico, histórico; diseñado para evaluar las complicaciones de la diabetes mellitus en relación al aumento en la concentración de glucosa plasmática. Es un estudio a largo plazo, donde se analizaron dos grupos de pacientes; el grupo tratado de forma convencional y otro grupo bajo un tratamiento intensivo (normalización de la glucosa en sangre). El beneficio de la terapia intensiva resultó en una reducción del 60% en la retinopatía, nefropatía y neuropatía, por lo que el DCCT es un estudio que demuestra que la disminución en la concentración de glucosa sanguínea disminuye o previene el desarrollo de las complicaciones diabéticas. La Asociación Americana de la Diabetes (American Diabetes Association), considera que DCCT es un estudio con gran importancia tanto estadística como clínicamente (American Diabetes Association, 2003).

embargo, también se ha observado que la incidencia de la hipoglucemia severa incrementa con este tratamiento (Auer, 2004; Cryer, 2007; Lacherade et al., 2009).

En la DMT₁ la concentración de glucosa plasmática puede alcanzar niveles hipoglucémicos menores a 2.8 mmol/l (<50 mg/dl), el 10% del tiempo durante la terapia glucémica con insulina. En promedio los pacientes experimentan 2 episodios de hipoglucemia moderada por semana y un episodio al año de hipoglucemia severa, temporalmente incapacitante y a menudo con presencia de convulsiones o coma (Cryer, 2007), por lo que la hipoglucemia iatrogénica (o inducida por fármacos) continúa siendo un problema clínico, debido a la dificultad para mantener la normoglucemia en los pacientes con diabetes.

La hipoglucemia sintomática ocurre con mayor frecuencia en los pacientes diabéticos que reciben insulina u otros medicamentos hipoglucemiantes y con menor frecuencia se presenta en pacientes con tumores secretores de insulina o falla hepática, aunque también se puede presentar en personas sanas con ayuno prolongado (Suh, 2007a).

La isquemia cerebral es otra condición patológica asociada con alteraciones severas en el suministro de glucosa al cerebro debido a la interrupción del flujo sanguíneo cerebral y se ha sugerido que la hipoglucemia es un componente importante de la neuropatología isquémica (Oehmichen et al., 2006; Haces et al., 2010).

I.IV.II Respuestas contrarreguladoras ante la hipoglucemia

La respuesta fisiológica hormonal contrarreguladora hace frente a la caída en la concentración de glucosa sanguínea (Figura 3). Inicialmente las defensas fisiológicas conducen a una reducción en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas (80 mg/dl). El glucagón y la epinefrina son secretados cuando los niveles de glucosa se encuentran alrededor de 68 mg/dl. Si estas defensas fallan, los niveles más bajos de glucosa desencadenan una respuesta simpático-adrenal de mayor severidad que causa los síntomas neurogénicos (o autónomos), provocando la ingesta de alimento (Cryer, 2007; Smith y Amiel, 2002). Esta activación del SNA aumenta la cantidad de norepinefrina en las terminales y de epinefrina en la circulación para incrementar la producción de glucosa (Tesfaye y Seaquist, 2010).

Al disminuir la relación insulina/glucagón, los ácidos grasos libres son convertidos en cuerpos cetónicos en el hígado, y son utilizados por el cerebro como una fuente de energía. No

obstante, alteraciones en la secreción de insulina (insulinoma), previene la lipólisis y la producción de los cuerpos cetónicos por parte del hígado (Lacherade et al., 2009).

Cuando los niveles de glucosa descienden a los 66 mg/dl, se secreta la hormona del crecimiento (por la glándula pituitaria anterior) y a los 58 mg/dl la secreción de cortisol (por la corteza adrenal). La segregación de estas hormonas promueve cambios en los procesos metabólicos durante periodos de hipoglucemia prolongados, al estimular la lipólisis en el tejido adiposo, así como la cetogénesis y la gluconeogénesis en el hígado (Bakatselos, 2011).

Si todas estas defensas fallan, la caída en los niveles de glucosa trascienden en una alteración funcional del cerebro que puede desencadenar alteraciones cognitivas. Cerca de los 50 mg/dl (2.8 mmol/l) se presentan conductas aberrantes, convulsiones y coma (41-49 mg/dl 2.3-2.7 mmol/l). Sin embargo, estas respuestas se pueden corregir con la reintroducción de glucosa (Cryer, 2007).

En los pacientes con diabetes tipo I la respuesta contrarreguladora no se lleva a cabo adecuadamente (Figura 3), provocando falla en la respuesta simpatoadrenal y causando la inadvertencia del episodio hipoglucémico (hipoglucemia asintomática). En estos pacientes los rangos glucémicos donde se presentan las respuestas simpatoadrenal y neurogénicas se presentan a concentraciones de glucosa más bajas, ocasionando que la hipoglucemia pase inadvertida (hypoglycemia unawareness). Se ha observado que la hipoglucemia recurrente o aún con un solo episodio de hipoglucemia precedente, puede inducir la falla de la respuesta contrarreguladora, llevando a un círculo vicioso e incrementando el riesgo de hasta 25 veces o más de presentar hipoglucemia durante el tratamiento de insulina (Diedrich et al., 2002; Cryer, 2006; Sanders et al., 2006).

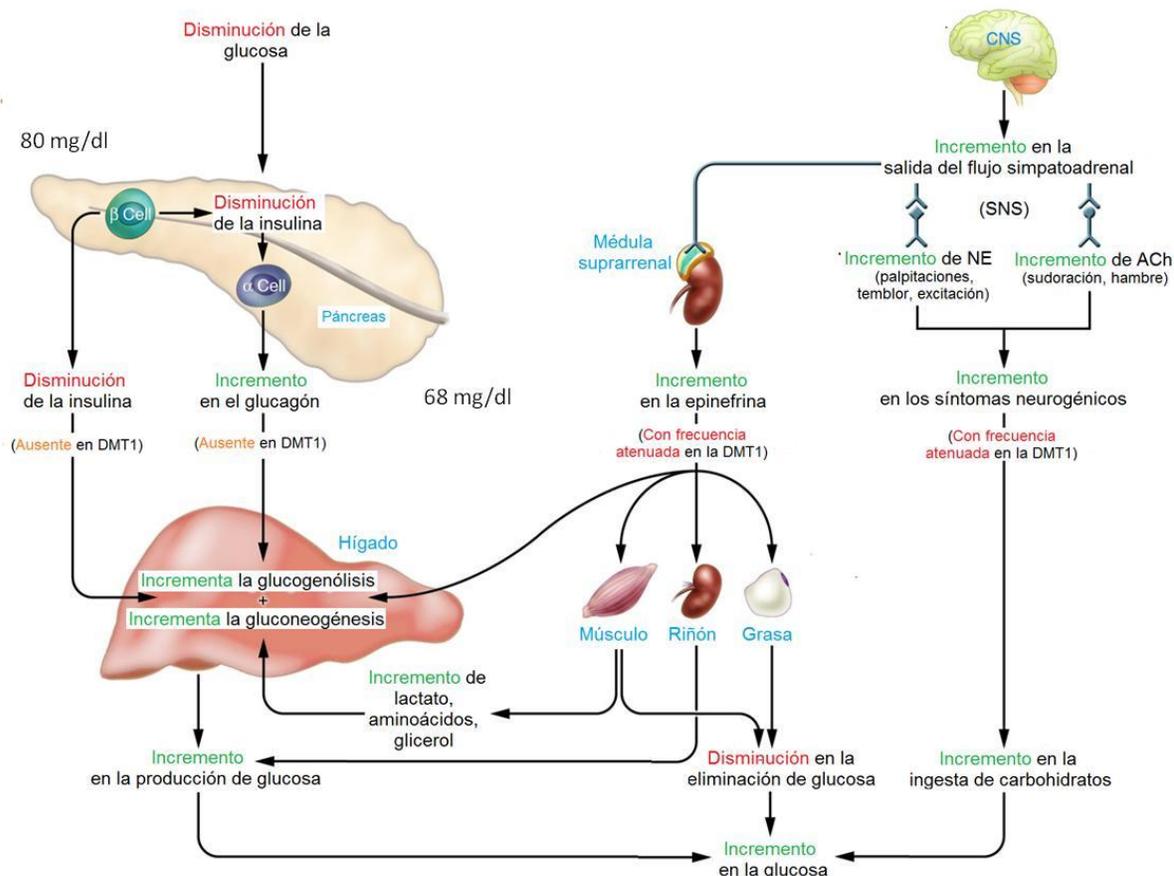


Figura 3. Ante el descenso de los niveles de glucosa sanguíneos, el organismo induce una serie de defensas fisiológicas contra el descenso en la concentración de glucosa plasmática como son la disminución en la secreción de insulina por parte de las células β de los islotes del páncreas; incremento de la secreción de glucagón en las células α en los islotes pancreáticos; y, en ausencia de este último, incremento en la secreción de epinefrina en la médula adrenal. Esta última, induce la liberación de glucagón hacia la sangre y la acción conjunta de todas ellas favorecen principalmente la liberación hepática de glucosa. Si alguno de estos mecanismos reguladores falla, los niveles de glucosa pueden llegar a ser menores a 20 mg/dl, induciendo el cese de la actividad eléctrica cerebral y la muerte neuronal subsecuente. La forma conductual de defensa es la ingesta de alimento provocado por los síntomas de la hipoglucemia. Todas estas defensas están comprometidas en la DMT1 y la mayoría de los pacientes con DMT2. Modificado de Cryer, 2006.

I.IV.III Interrupción del Ciclo de Krebs

Estudios pioneros sugieren que algunos aminoácidos excitadores (glutamato, glutamina y aspartato), pueden llegar a ser fuentes principales de carbono en apoyo al mantenimiento de la actividad cerebral a través del CAT, cuando el metabolismo de la glucosa está comprometido.

Al estar la glucosa severamente limitada, el CAT se ve alterado ya que no se produce acetato, lo que impide la formación de citrato y la acumulación de oxaloacetato, como se observa

en la figura 4 (Sutherland et al., 2008). En presencia de glutamato, el oxaloacetato es transaminado a aspartato generándose α -cetoglutarato, el cual se metaboliza en el CAT.

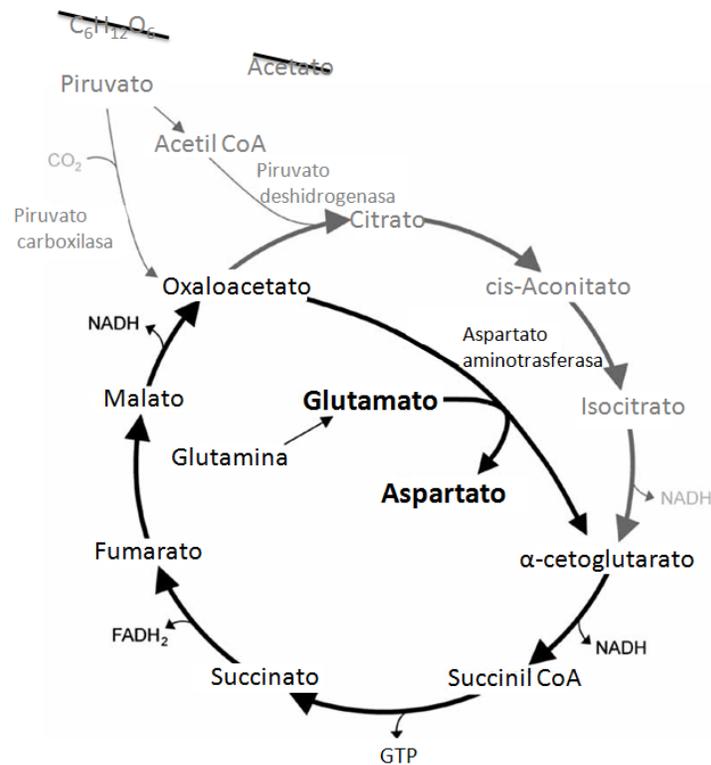
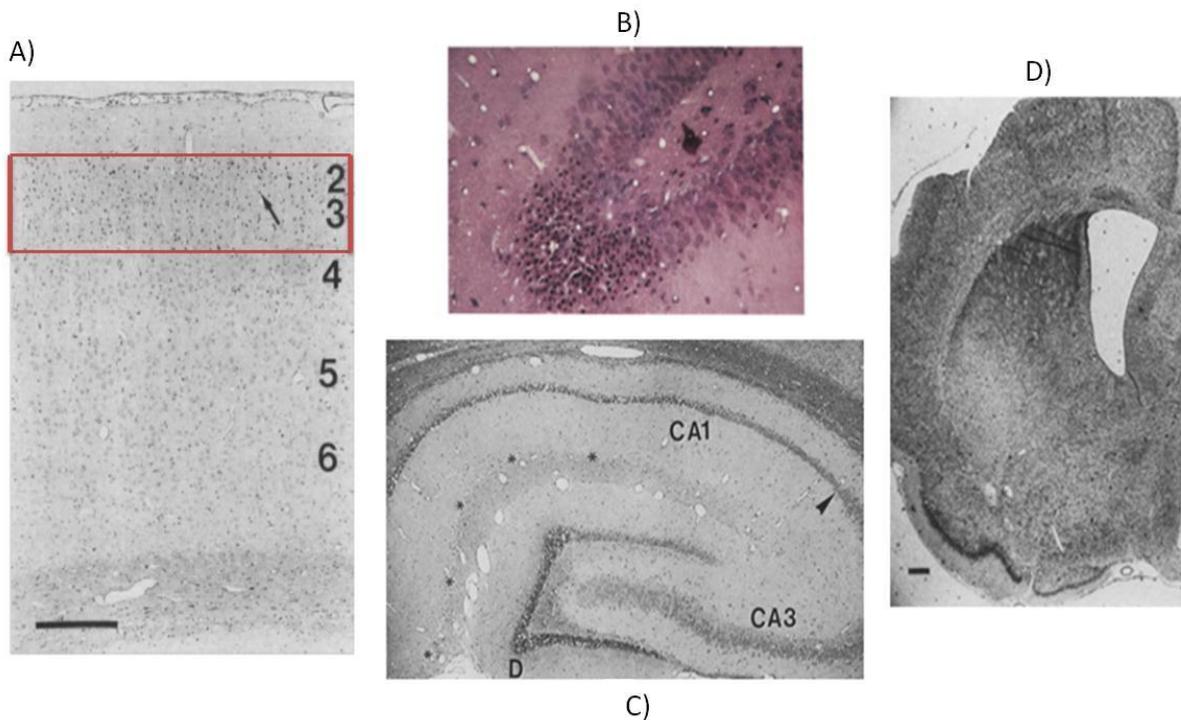


Figura 4. La falta de piruvato durante la hipoglucemia severa impide que se complete el ciclo de Krebs. La disminución del flujo glucolítico provoca una reacción de transaminación por la transaminasa glutamato-aspartato debido a los bajos niveles acetato o falta de piruvato proveniente de la glucosa, desencadenando así la acumulación del oxaloacetato, que promueve la formación de aspartato. La concentración de aspartato llega a incrementar hasta 1600% del control. Imagen modificada de Sutherland et al., 2008.

Sandberg y colaboradores (1986), reportaron un incremento dependiente del tiempo del aspartato en paralelo a la disminución en los niveles de glutamato y glutamina, sugiriendo que el glutamato, por la aminotransferasa, es convertido en fuente de carbono al no haber piruvato, proveniente de la glucosa. Esta conversión de glutamato a aspartato ocurre cuando se llega al estado de inconsciencia o coma hipoglucémico (EEG plano). Esto conduce a un aumento en los niveles de aspartato de hasta aproximadamente 15 veces en el espacio extracelular (Wieloch, 1986; Sandberg et al., 1986). Por otro lado, el aspartato puede activar al receptor de glutamato de tipo NMDA y contribuir al mecanismo excitotóxico de daño asociado con la hipoglucemia, como se describe más adelante.

I.IV.IV Vulnerabilidad selectiva de las neuronas ante el daño hipoglucémico

No todas las neuronas son igualmente sensibles ante el daño hipoglucémico. En estudios usando modelos animales y en humanos a través de autopsias de personas con diabetes, fallecidos después de HGS, se ha observado que las poblaciones neuronales más susceptibles son el subículo, las neuronas pequeñas y medianas del caudado, la región ca1 y la cresta del giro dentado del hipocampo y las capas superficiales (2 y 3) de la corteza cerebral (Auer et al., 1984a,b; 1985a,b; Kalimo et al., 1985) (Figura 5), mientras que las neuronas en el tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal generalmente no son dañadas, así como las células gliales. Cabe señalar, que la resistencia de varias poblaciones neuronales ante la HG es relativa (Agardh et al., 1981). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a esta vulnerabilidad diferencial del cerebro, no han sido aclarados en su totalidad.



La vulnerabilidad al daño es similar al observado en la reperfusión de la isquemia, por lo que durante mucho tiempo se pensó que la distribución del daño cerebral de ambas patologías era idéntica. Además, se creía que bajos niveles de oxígeno y de glucosa tenían el mismo

potencial para causar la muerte a las neuronas (Oehmichen et al., 2006). Sin embargo, en la isquemia cerebral, el giro dentado es mucho menos vulnerable (Figura 6) y las capas profundas de la corteza cerebral son más vulnerables que las capas superficiales (Auer, 1986). Además, la región CA₃ del hipocampo es más susceptible al daño isquémico.

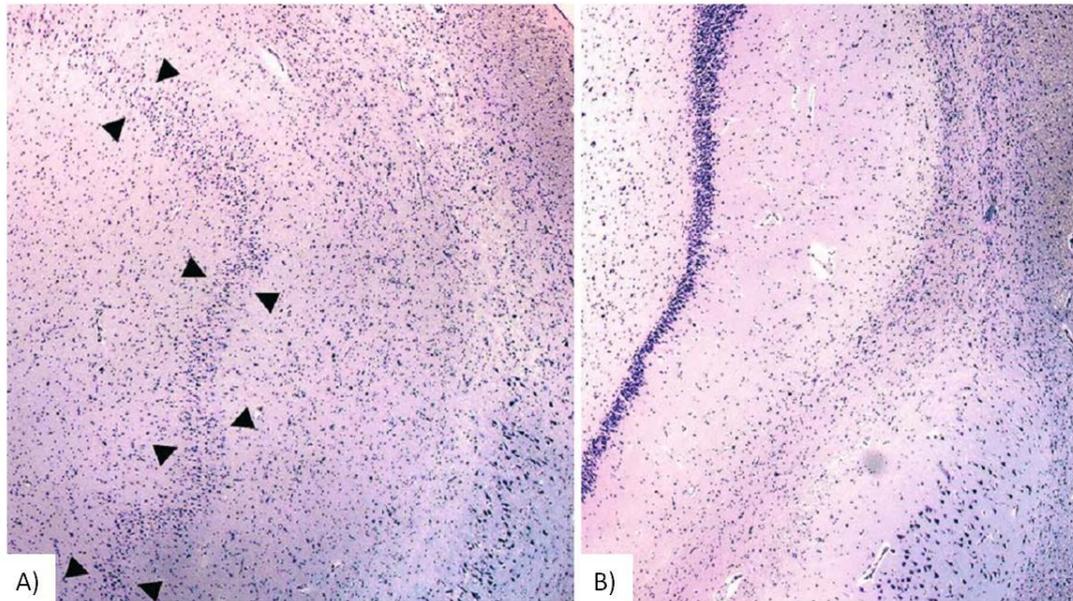


Figura 6. Comparación entre el daño hipoglucémico y el daño isquémico. A) Daño provocado por la hipoglucemia en el giro dentado del hipocampo (cabeza de la flecha), mientras que en B) No se muestra alteración en el giro dentado no después de un evento isquémico. (Tinción de H-E; magnificación x200). Tomado de Oehmichen et al., 2006.

Las neuronas del hipocampo en particular son importantes para el aprendizaje y la memoria, y los pacientes que sobreviven al coma hipoglucémico pueden resultar con significativas alteraciones cognitivas, mismas que se han observado en animales (Suh et al., 2007b). Recientes estudios indican que la hipoglucemia moderada recurrente puede causar alteraciones sinápticas en el hipocampo, incluso en la ausencia de la muerte neuronal (McGowan et al., 2006).

Experimentos pioneros sugieren que la neurotransmisión excitadora puede estar involucrada en el daño neuronal inducido por la hipoglucemia severa (Westerberg y Wieloch, 1989). Antes de adentrarnos a este tema, analizaremos algunos conceptos básicos de la transmisión glutamatérgica.

I.V TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC, se estima que más del 50% de todas las sinapsis encefálicas liberan este neurotransmisor (Lau y Tymianski, 2010). El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Bonde et al., 2005). Además, el glutamato es un importante neurotransmisor para el desarrollo neural, la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje (Wang y Qin, 2010). Cuando este neurotransmisor está presente en exceso, por la liberación masiva o por una remoción deficiente, puede conducir a la muerte celular por excitotoxicidad (Tzingounis y Wadiche, 2007; Joseph et al., 2008), como es el caso de la hipoglucemia severa, donde los niveles de glutamato y particularmente de aspartato aumentan notablemente conduciendo a la actividad prolongada de sus receptores y desencadenando la muerte neuronal (Sandberg et al., 1986).

Una vez liberado el glutamato, las respuestas postsinápticas se producen a través de receptores farmacológicamente y funcionalmente diferentes, los receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos están asociados a un canal iónico, e incluye al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionato (AMPA) y subtipos del receptor a kainato (Prehn, 1998). La activación de los receptores ionotrópicos conduce a la permeabilidad de iones de sodio, potasio y/o calcio (Arundine y Tymianski, 2003). Los canales del receptor NMDA se encuentran bloqueados por Mg^{2+} de una manera dependiente de voltaje, que cuando se libera permite la entrada de iones (Henneberry, 1989), lo que lleva a cambios duraderos en la eficacia de la transmisión glutamatérgica, constituyendo un aspecto esencial en los fenómenos de plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria cerebrales. Los receptores metabotrópicos median sus acciones a través de mecanismos dependientes de proteínas unidas a GTP que provocan la movilización de Ca^{2+} de los almacenes internos, como la mitocondria. Este tipo de receptores está dividido en tres grupos funcionales, basados en la homología de secuencia de aminoácidos, la farmacología de agonistas y las vías de transducción de señales a las que están acoplados: Grupo I (mGluR1 y 5), grupo II (mGluR2 y 3) y grupo III (mGluR4, 6, 7 y 8) (Pinheiro y Mulle, 2008). Tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos se encuentran en la terminal pre-sináptica, la terminal post-sináptica y en los astrocitos (Figura 7).

Bajo condiciones fisiológicas, el glutamato es removido de la hendidura sináptica en milisegundos por una familia de transportadores de alta afinidad, dependientes de Na^+ (Sheldon y

Robinson, 2007). Se conocen cinco subtipos de estos transportadores: el acarreador 1 de aminoácidos excitatorios (EAAC₁), el transportador de glutamato y aspartato (GLAST), localizados principalmente en las células gliales; el transportador 1 de glutamato (GLT-1) localizado en las neuronas y en la glía (Figura 7); el transportador 4 de aminoácidos excitatorios (EAAT₄) presente en las células de Purkinje en el cerebelo, el transportador 5 de aminoácidos excitatorios (EAAT₅) localizado en la retina (Selkirk et al., 2005).

El transporte de glutamato depende de la presencia del gradiente transmembranal de sodio generado por la ATPasa de Na⁺/K⁺, y por lo tanto es dependiente de energía. Los transportadores unen una molécula de glutamato y dos iones de sodio y lo translocan al citoplasma y un ion de potasio es liberado al medio extracelular (Tanaka, 2000). Este transporte es esencial para finalizar la transmisión sináptica durante condiciones fisiológicas (Bonde et al., 2005). Sin embargo, cuando no hay suficiente energía, el transportador de glutamato puede funcionar de manera inversa transportando Na⁺ y glutamato al exterior.

I.V.I Excitotoxicidad

Por más de 40 años, se ha reconocido que el glutamato y los agonistas de sus receptores pueden causar toxicidad en el sistema nervioso (Sheldon y Robinson, 2007). Existen fuertes evidencias de que la activación excesiva de los receptores de glutamato puede causar muerte celular tanto in vitro como in vivo.

El término excitotoxicidad fue acuñado por Olney en 1971 al observar que la capacidad tóxica del glutamato y sus análogos correlaciona con su capacidad excitadora. Denominando así al proceso desencadenado por la activación sostenida de los receptores a glutamato, lo cual puede conducir a la muerte neuronal excitotóxica (Joseph et al., 2008), en particular durante condiciones limitantes de ATP. Esto asociado a que durante la falla energética, el gradiente electroquímico Na⁺/K⁺ se colapsa provocando que la recaptura de glutamato se altere por el funcionamiento inverso de los transportadores de glutamato, liberándose éste de la astroglía al espacio extracelular (Sheldon y Robinson, 2007). Esta sobreactivación de los receptores a glutamato se observa en diversas alteraciones neurológicas (enfermedad de Alzheimer, de Huntington, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica), accidentes cerebrovasculares, trauma cerebral, crisis epilépticas, isquemia e hipoglucemia (Massieu et al., 2001; Lau y Tymianski, 2010).

Este mecanismo se sugiere como el responsable del aumento extracelular de glutamato y aspartato en condiciones de hipoglucemia.

La muerte excitotóxica es dependiente del incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), después de su entrada por los canales del receptor NMDA (Randall y Thayer, 1992; Choi, 1994). Varias enzimas activadas por el calcio, como proteasas, endonucleasas y fosfolipasas, contribuyen a la degradación de diferentes componentes celulares que culminan en la muerte neuronal (Figura 7). La concentración de Ca^{2+} es regulada por sistemas dependientes de energía (ATPasas Ca^{2+} citoplásmica y del retículo endoplásmico). La entrada masiva de Ca^{2+} durante la excitotoxicidad conduce a la sobrecarga de Ca^{2+} intramitocondrial, alterando su actividad e interrumpiendo la producción de ATP. Como consecuencia, la eliminación del Ca^{2+} es debilitado acarreado un incremento sostenido en el Ca^{2+} intracelular (Choi, 1994). Otro evento clave involucrado en la muerte excitotóxica, es la generación de radicales libres, como resultado de la disfunción mitocondrial y la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , como son la xantina oxidasa y la óxido nítrico sintasa (Bondy y Lee, 1992; Lafon, 1993). Los radicales libres pueden dañar componentes celulares, contribuyendo a la cascada de muerte neuronal. En la siguiente sección se describirá cuáles son estas especies, como se forman y los sistemas endógenos antioxidantes que las contrarrestan.

I.V.II Exitotoxicidad asociada a la muerte neuronal hipoglucémica

En base a dos evidencias principales se propuso a la excitotoxicidad como el mecanismo responsable del daño neuronal hipoglucémico: 1) experimentos del grupo de Wieloch (1985) demostraron que la muerte neuronal se previene tras la administración de antagonistas de los receptores a glutamato de tipo NMDA y no-NMDA (Butcher et al., 1987a); 2) a través de microdiálisis se demostró que al iniciarse el período isoelectrico aumentan los niveles de glutamato, y principalmente aspartato, en el espacio extracelular de animales inyectados con insulina (Sandberg et al., 1986). Por otra parte, usando anticuerpos contra el aspartato, se observó que éste se encuentra dentro de vesículas sinápticas en el cerebro de animales hipoglucémicos inyectados con insulina, sugiriendo su liberación (Butcher et al., 1987b). La eliminación de aferentes corticales glutamatérgicas hacia el estriado, reduce la muerte neuronal en ratas con hipoglucemia (Nellgard y Wieloch, 1992).

En estudios más recientes, Swanson y colaboradores han identificado otros factores que participan en la cascada de muerte celular hipoglucémica tales como la activación de la poli(ADP ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) y la liberación de zinc de las terminales nerviosas (Suh et al., 2003, 2008). Además, este grupo ha mostrado que la producción de superóxido por la NADPH oxidasa (NOX), principalmente durante la reintroducción de glucosa, está implicada en la muerte neuronal (Suh et al., 2007b). De acuerdo con estos estudios en cultivos neuronales y en modelos de hipoglucemia en roedores *in vivo*, el daño neuronal es desencadenado después de la reintroducción de glucosa por la producción de óxido nítrico, que induce la liberación de zinc vesicular. El zinc se transloca a las neuronas postsinápticas y activa a la NOX y a la PARP-1, lo que lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), a la depleción de NAD^+ y a la muerte neuronal. La producción de ERO por la óxido nítrico sintasa y la NOX induce daño al ADN y la consecuente activación de PARP-1, que consume NAD^+ necesaria para la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica.

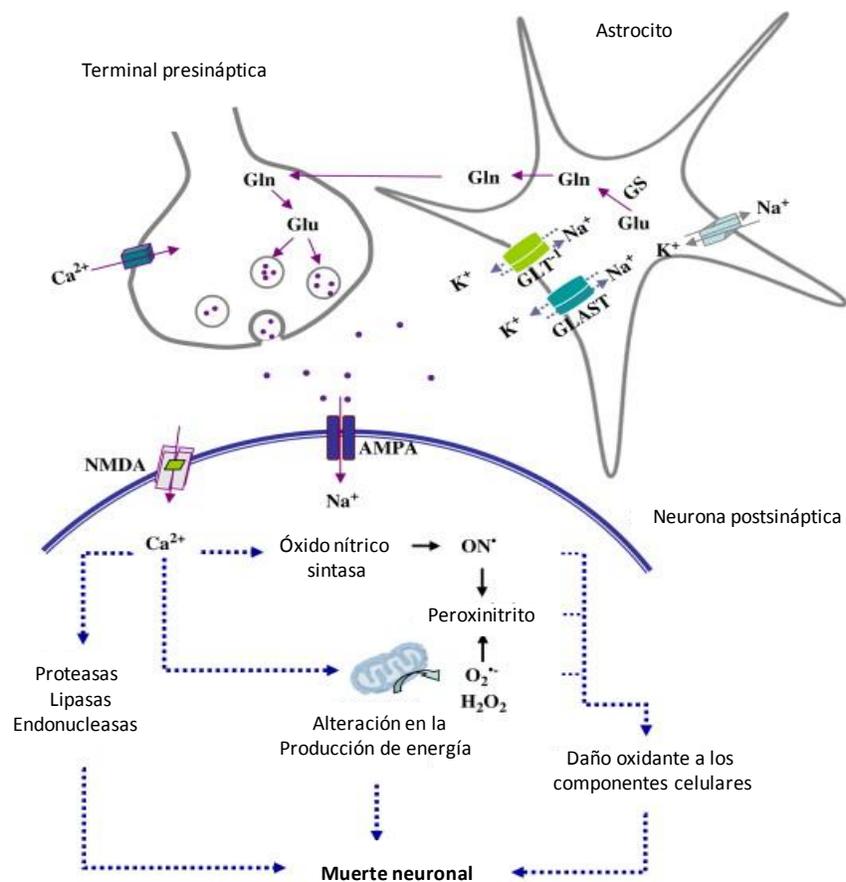


Figura 7. Esquema de una sinapsis excitadora y la cascada de muerte celular excitotóxica. La liberación del glutamato de las terminales pre-sinápticas activa a los receptores NMDA y no NMDA, así como los metabotrópicos de glutamato. La captura del glutamato está mediada por GLT_1 y el GLAST , una familia de transportadores de glutamato dependientes de Na^+ . Las células gliales poseen la glutamino sintetasa (GS), que convierte al glutamato en glutamina, y

que es transportada a las neuronas a través de los transportadores de glutamina, y convertida nuevamente a glutamato. La alteración de la eliminación del glutamato después de su liberación conduce a la acumulación de este aminoácido en la hendidura sináptica provocando sobreactivación de sus receptores, lo cual puede resultar en la muerte neuronal excitotóxica. La entrada masiva de calcio durante la sobreactivación de los receptores NMDA estimula la actividad de diversas enzimas. El calcio induce la producción de especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial y daño oxidativo a lípidos, proteínas y al ADN. La disfunción mitocondrial puede interrumpir la producción de ATP contribuyendo así a la muerte celular (Imagen tomada y modificada de Estrada et al., 2008).

Además, en estudios recientes de nuestro laboratorio hemos observado que la privación de glucosa en cultivo de neuronas de hipocampo lleva a la producción de ERO por medio de la activación de varias vías enzimáticas, entre las que se encuentra la NOX, xantina oxidasa y fosfolipasa A2 (Páramo et al., 2010), que a su vez contribuye a la activación de calpaína (Páramo et al., enviado). Asimismo, la inhibición de la actividad de la calpaína previene el daño neuronal sugiriendo un papel de esta proteasa en la muerte neuronal inducida por la privación de glucosa (Páramo et al., enviado). Por otra parte, Won y colaboradores (2012) han sugerido que una respuesta inflamatoria también participa en el daño celular hipoglucémico, ya que se ha observado reactividad de la microglía en el hipocampo de la rata de 1-7 días después de un periodo de 30 minutos de isoelectricidad hipoglucémica.

Otros estudios han sugerido la participación de un mecanismo apoptótico en la muerte celular hipoglucémica asociada con la despolarización de la membrana mitocondrial, la apertura del poro de transición de permeabilidad de la mitocondria, la liberación de citocromo c y la activación de caspasa-3, lo cual se observó principalmente después de la reintroducción de glucosa en ratas hipoglucémicas expuestas a isoelectricidad (Ferrand-Drake, 2003; Friberg et al., 1998). Además, la activación de la calpaína se observó a las 3 h después de la reintroducción de glucosa en animales sometidos a coma hipoglucémico inducido por insulina (Ferrand-Drake et al., 2003). En conjunto, estas observaciones sugieren la contribución de múltiples factores a la muerte neuronal asociada con la hipoglucemia severa.

I.VI ESPECIES REACTIVAS

I.VI.I Radical libre

En los átomos y moléculas los electrones ocupan espacios llamados orbitales, los cuales puede contener un máximo de dos electrones. Si un orbital contiene solamente un electrón, se

dice que este electrón esta desapareado, formando un radical libre. Un radical libre es capaz de existir de forma independiente, con uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1999), lo que les otorga un grado considerable de reactividad.

I.VI.II Especies Reactivas del Oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son una variedad de moléculas y radicales libres procedentes del oxígeno molecular (dioxígeno; O₂) (Covarrubias et al., 2008). Este término global incluye tanto a los radicales del oxígeno como a las especies no-radicales de esta molécula (Tabla 1). Los radicales tienen la tendencia a eliminar su electrón no apareado, ya sea mediante la aceptación de otro electrón o donándolo a otra molécula o especies (Hancock et al., 2001).

Aunque el O₂ es necesario para mantener la vida, puede ser tóxico a través de la formación de estas ERO, al ser reducido parcialmente (Darley-Usmar et al., 1995; Matough et al., 2012).

Especies Reactivas de Oxígeno	
Radical	No radical
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peróxido de hidrógeno, H ₂ O ₂
Radical Hidroxilo, OH [•]	Ácido hipocloroso, HOCl
Radical Peroxilo, ROO [•]	Ozono, O ₃
Alcoxilo, RO [•]	Oxígeno singulete, ³ O ₂
Hidroperoxilo, HO ₂ [•]	Peroxinitrito, ONOO ⁻
Especies Reactivas de Nitrógeno	
Oxido nítrico, NO [•]	Peroxinitrito, ONOO ⁻
Dióxido de nitrógeno, NO ₂ [•]	Peroxinitritos alquilo, ROONO
	Trióxido de dinitrógeno, N ₂ O ₃
	Tetróxido de dinitrógeno, N ₂ O ₄
	Ácido nitroso, HNO ₂
	Anión nitroxilo, NO ²⁺
	Catión nitrosilo, NO
	Cloruro nitrilo, NO ⁺

Tabla 1. Listado general de ERO y ERN, donde las principales ER de oxígeno y de nitrógeno (O₂^{•-} y NO[•], respectivamente), son poco reactivas, mientras que OH[•] es muy reactiva. Las ER tienen importantes funciones fisiológicas, pero en exceso son tóxicas, frecuentemente a través de la generación de otros oxidantes.

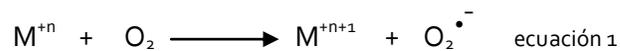
Las principales ERO incluyen al anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Además de las ERO, las especies reactivas de nitrógeno (ERN), incluyen al óxido nítrico y al peroxinitrito.

Superóxido

El radical anión superóxido (O₂^{•-}) se forma por la adición de un electrón al O₂, resultando ser el precursor de la mayoría de las ERO, al interactuar con otras moléculas y generar ERO

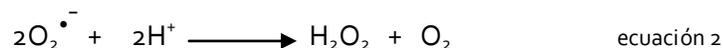
secundarias, ya sea de forma directa o a través de procesos catalizados por enzimas o metales (Valko et al., 2007).

Un gran número de diferentes iones metálicos se ha demostrado que reaccionan con el oxígeno para producir $O_2^{\bullet-}$, (ecuación 1) entre los más importantes para los sistemas biológicos se encuentran el Fe^{2+} , Fe^{2+} -EDTA, y Cu^+ (Hancock et al., 2001).



Peróxido de hidrógeno

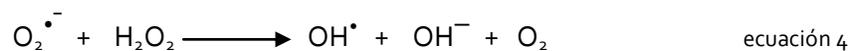
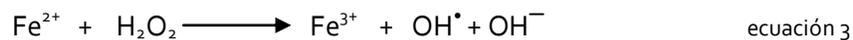
El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), puede surgir de la dismutación del superóxido (ecuación 2) o presentarse de forma espontánea, especialmente a pH bajo (Hancock et al., 2001).



La formación del H_2O_2 también puede ser catalizada por una familia de enzimas conocidas como superóxido dismutasa (SOD). Bajo condiciones fisiológicas, una vez que el superóxido se forma, la presencia del peróxido de hidrógeno es casi inevitable (Hancock et al., 2001). El H_2O_2 no es tan reactivo como el OH^{\bullet} , sin embargo, el OH^{\bullet} es fácilmente generado cuando el H_2O_2 está en presencia de Fe^{3+} (reacción de Fenton) o Fe^{2+} (ecuación 3).

Radical Hidroxilo

El radical hidroxilo (OH^{\bullet}), tiene una alta reactividad, lo que lo convierte en un radical muy peligroso, con una vida media muy corta *in vivo*, de aproximadamente 10^{-9} s (Valko et al., 2007). Además, la presencia de iones metales a través de las reacciones de Fenton (ecuación 3) o de Haber-Weiss (ecuación 4), pueden llevar a la formación del OH^{\bullet} (Halliwell, 1999).



I.VI.III Especies Reactivas de Nitrógeno

El nitrógeno también desempeña un papel central en la biología y se incorpora a todas las clases principales de biomoléculas. El óxido nítrico, compuesto formado a partir del nitrógeno y del oxígeno, se produce in vivo y tiene una acción vasodilatadora importante (Darley-Usmar, 1995). Entre las ERN se encuentran el óxido nítrico, el dióxido de nitrógeno, el trióxido de dinitrógeno y el peroxinitrito. Este último es un potente agente oxidante (ecuación 5) (Rains y Jain, 2010).



I.VI.IV Función de las Especies Reactivas

Las ERO son productos normales del metabolismo celular, tienen un papel importante en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Entre los procesos fisiológicos se ha analizado que su inhibición endógena provoca el arresto del ciclo celular en la fase G₁, demostrando así que se requieren ciertos niveles de ERO para entrar a la fase S. Por otro lado, se ha visto en animales que influyen en la proliferación celular, muerte celular y en la expresión de genes, además pueden estar involucradas en la activación de varias vías de señalización, gracias a su tamaño y a que pueden difundir distancias cortas (Forman et al., 2009).

El papel de las ERO como agentes en las vías de señalización depende del tipo celular, del compartimento intracelular donde son producidas, el tipo de ERO y la dosis (Covarrubias et al., 2008). Por ejemplo, a bajos niveles de ERO se promueve la muerte celular tipo 1 o apoptosis, a niveles intermedios causan la muerte tipo 2 o autofagia, mientras que a altas concentraciones conduce a una muerte tipo 3 o necrosis (Hernández et al., 2010). Por otro lado, principalmente el O₂^{•-} y el H₂O₂, conducen a modificaciones de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que resultan en cambios estructurales de estas macromoléculas desencadenando disfunción o pérdida de su actividad (Rains y Jain, 2010).

Para protegerse de los efectos perjudiciales de estas modificaciones oxidativas, las neuronas emplean una variedad de mecanismos de defensa que incluyen el intercambio de lípidos, el re-plegamiento de proteínas o degradación, y la escisión del ADN o su reparación. Cuando estos mecanismos están comprometidos, la homeostasis neuronal es alterada y se produce estrés oxidante (Wang y Michaelis, 2010).

I.VI.V Fuentes productoras de ERO

Algunas ERO están vinculadas a diversos procesos fisiológicos y son sintetizadas como producto secundario del metabolismo celular o por enzimas específicas como la familia de la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y el citocromo P₄₅₀ y la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La PLA₂ produce ácido araquidónico cuyo metabolismo a prostaglandinas y leucotrienos genera O₂^{•-} (Páramo et al., 2010), esta enzima es una fuente potencial de ERO en el SN debido a que resulta ser activada al aumentar la concentración intracelular de calcio, tras la activación de los receptores de glutamato. En los sistemas biológicos, la mitocondria y la NAD(PH) oxidasa son las principales fuentes de la producción de las ERO (Covarrubias et al., 2008).

Producción de ERO por la mitocondria

En la mitocondria las ERO son producidas como subproductos del metabolismo oxidativo, donde los electrones son transferidos de moléculas reducidas al O₂ a través de la cadena de complejos enzimáticos, I-IV. El complejo IV (citocromo c oxidasa), garantiza la reducción completa de O₂ a H₂O sin la formación de ERO. Sin embargo, la reducción parcial del O₂ genera O₂^{•-} o H₂O₂, lo que puede ocurrir si el O₂ interactúa con complejos "río arriba", principalmente los complejos I y III (Hernández et al., 2010; Bae et al., 2011). Se estima que ~0.1% del O₂ consumido por la mitocondria es reducido a O₂^{•-}. Por otro lado, la mitocondria produce H₂O₂ a través de la superóxido dismutasa y la monoamina oxidasa, ésta última muy abundante en el sistema nervioso (Hernández et al., 2010).

Producción de ERO por NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa es una enzima de múltiples subunidades que cataliza la reducción del oxígeno y la oxidación de NADPH para generar radicales O₂^{•-}. Fue descubierta en neutrófilos y sus subunidades se encuentran localizadas en la membrana plasmática (p22^{phox} y gp91^{phox}, que forman el citocromo b₅₅₈) y en el citoplasma (p47^{phox}, p67^{phox} y p70^{phox}). Tras la estimulación de esta enzima, la activación de la proteína Rho y la fosforilación de p47^{phox} inicia la translocación de los complejos citosólico a la membrana plasmática, donde forman el complejo funcional que genera O₂^{•-} (Brennan et al., 2009; Infanger et al., 2006; Groemping y Rittinger, 2005).

Ahora se sabe que la enzima NADPH oxidasa tiene varios homólogos, denominados NOX₁ a NOX₅, que se encuentran en el sistema nervioso y están ampliamente distribuidos en el cerebro de los mamíferos (Serrano et al., 2003).

I.VI.VI Sistemas de defensa antioxidante

Los distintos mecanismos que el organismo ha desarrollado como defensa ante los radicales libres, se encuentran categorizados en dos sistemas; los enzimáticos y los no enzimáticos.

El sistema no enzimático está a cargo principalmente del glutatión y las tiorredoxinas. Una vez que GSH es oxidado (GSSG), la forma reducida puede ser regenerada por la GSH reductasa (Gr). El balance entre GSH y GSSG es una vía para determinar el estado redox en la célula. Por otra parte, las tiorredoxinas (Trx) como las glutaredoxinas (Grx), son proteínas pequeñas que contienen un sitio activo con un disulfuro activo redox. Estas proteínas mantienen un estado redox intracelular reducido en las células de los mamíferos por la reducción de los grupos tioles de la proteína (Covarrubias et al., 2008).

Otros antioxidantes no enzimáticos son las vitaminas (A, C y E, B₁, B₂, B₆ y B₁₂), el ácido α -lipoico, los carotenoides, la coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀), varios bioflavonoides, minerales antioxidantes (cobre, zinc, manganeso y selenio) y cofactores como el ácido fólico, el ácido úrico y la albúmina (Matough et al., 2012).

Los antioxidantes enzimáticos están formados por la dismutasa de superóxido (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Matough et al., 2012).

Existen tres tipos de SOD: SOD₁ (citoplásmica) y SOD₃ (extracelular o secretada) que son dependientes de Cu/Zn (SOD-CuZn), mientras que SOD₂ (mitocondrial) es dependiente de Mn (SOD-Mn). SOD convierte al O₂^{•-} en H₂O₂. Por otro lado, la catalasa (CAT) y/o la glutatión peroxidasa, convierten el H₂O₂ en agua (Seifried et al., 2007).

I.VI.VII ESTRÉS OXIDANTE

La homeostasis celular de las ERO se mantiene a través de su producción y degradación. Al ser alterada esta homeostasis se desencadena el estrés oxidante y estrés nitrosativo (Acker y

Acker, 2004). Cuando la producción de ERO excede la capacidad de las defensas celulares, resulta ser dañino para las células, conduce al daño oxidante principalmente de moléculas de importancia esencial para la células como son los lípidos, proteínas y el ADN (Figura 8).

El cerebro es particularmente susceptible al daño oxidante debido a su alta demanda de oxígeno, la abundancia de metales redox activos (hierro y cobre) y a los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados oxidables (Halliwell, 1992).

La susceptibilidad del cerebro al daño oxidante resulta ser una característica clave en varias condiciones neuropatológicas, como son los accidentes cerebrovasculares, la lesión traumática cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo a la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington y a la esclerosis lateral amiotrófica (Matough et al., 2012). El daño oxidante también está asociado al proceso de envejecimiento (Finkel y Holbrook, 2000). En las últimas décadas, se ha asociado a otras condiciones patológicas, como son el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedad inflamatoria crónica, lesión post-isquémica, diabetes mellitus, toxicidad xenobiótica/medicamentos y la artritis reumatoide (Matough et al., 2011).

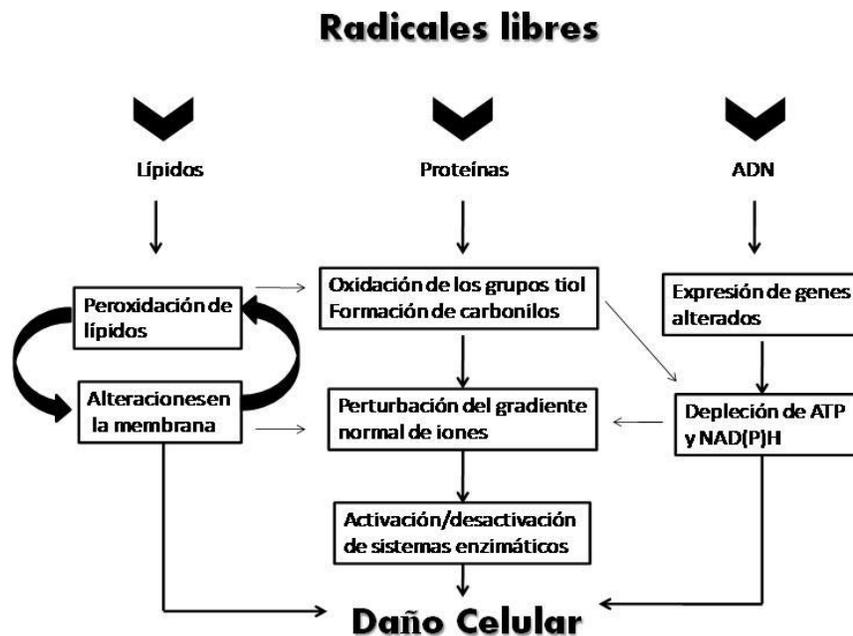


Figura 8. La generación de radicales libres, particularmente ERO y ERN, son perjudiciales, ya que afectan a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que conduce a la oxidación de estas macromoléculas. Modificado de Kurmar et al., 2012

I.VII.I Estrés Oxidante y Daño Hipoglucémico

Patočková y colaboradores (2003), mostraron en el cerebro completo del ratón un incremento en la lipoperoxidación después de 2 h de hipoglucemia severa (niveles de glucosa por debajo de 1mM) antes del inicio del coma. Este grupo reveló una correlación positiva entre la severidad de la hipoglucemia y los niveles de lipoperoxidación, ya que no se observó un incremento en la lipoperoxidación cuando los niveles de glucosa sanguínea están por arriba de 1 mM. De forma similar, Singh y su grupo (2004), reportaron un aumento en la lipoperoxidación y disminución en el contenido de glutatión reducido (GSH), en el momento del coma hipoglucémico en varias regiones del cerebro de la rata, mientras que McGowan y su grupo de trabajo (2006), reportaron un incremento en la producción mitocondrial de superóxido y peróxido de hidrógeno en el cerebro de lechones recién nacidos después de 2 h de hipoglucemia severa (niveles de glucosa de 1 mM). Consistente con estos resultados, nuestro grupo ha observado incremento en la peroxidación de lípidos en homogenados de hipocampo, corteza cerebral y cuerpo estriado, pero no de cerebelo, después de hipoglucemia severa y prolongada (niveles de glucosa de 20 mg/dl por más de 3 h), en ratas antes del inicio del periodo de isoelectricidad. En contraste, observamos un incremento en los niveles de proteínas nitrosiladas durante la reintroducción de glucosa (Haces et al., 2010; Suh et al., 2003).

En un estudio reciente Cardoso y colegas (2010) estudiaron el efecto de la hipoglucemia aguda (niveles de glucosa de 33 mg/dl durante una hora), sobre el estado energético mitocondrial y en el estado oxidante en animales diabéticos tratados con estreptozotocina. Este grupo observó un incremento de la lipoperoxidación en mitocondrias extraídas de la corteza cerebral, pero no en las extraídas del hipocampo de animales hipoglucémicos con diabetes comparado al grupo control. Además, las mitocondrias corticales mostraron una disminución en la relación GSH/GSSG y en la actividad de la glutatión reductasa (GR), mientras que la actividad de la GPx y de la MnSOD aumentó. En contraste a la corteza cerebral, las mitocondrias del hipocampo no mostraron cambios significativos en la lipoperoxidación, en la actividad enzimática de GR y GPx, mientras que la actividad de MnSOD disminuyó. Estas observaciones sugieren una respuesta diferencial de la defensa antioxidante a la hipoglucemia severa en animales diabéticos, mostrando la corteza cerebral los cambios más grandes.

De acuerdo con estas observaciones, en un estudio Bhardwaj y colaboradores (1998), mostraron alteraciones en la defensa antioxidante en ratas hipoglucémicas tratadas con insulina

(40 mg/dl). La GPx incrementó significativamente en los hemisferios cerebrales, mientras que la GR disminuyó. Por otra parte, se observó un incremento en los niveles de catalasa en hemisferios cerebrales, cerebelo y tallo cerebral y de la SOD en cerebelo y hemisferios cerebrales. Por otra parte, se observó una disminución en la actividad de las enzimas mitocondriales de la cadena transportadora de electrones, como es de esperarse debido a la falla energética que acompaña a la condición hipoglucémica. Estudios adicionales son necesarios con el fin de comprender si la respuesta diferencial de la defensa antioxidante está relacionada con la vulnerabilidad de las diferentes regiones cerebrales ante el daño neuronal hipoglucémico.

Por otro lado, en un estudio previo en cultivo de neuronas de hipocampo, hemos reportado que la privación de glucosa rápidamente induce la producción de ERO por medio de la activación de vías enzimáticas productoras de superóxido como la xantina oxidasa, la fosfolipasa A₂ y la NADPH oxidasa (NOX) (Páramo et al., 2010). Los inhibidores de todas estas enzimas y antioxidantes como el trolox, reducen la producción de ERO y la muerte celular bajo estas condiciones (Páramo et al., 2010). La producción de ERO por la mitocondria también se ha observado en neuronas granulares del cerebelo expuestas a la ausencia de glucosa (Isaev et al., 2007). Esta producción es dependiente de calcio y se asocia con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo que la sobrecarga de calcio en la mitocondria estimula la producción de ERO.

En conjunto, estas observaciones demuestran que la hipoglucemia severa, aún en ausencia de coma ó la exposición de neuronas cultivadas a un medio carente de glucosa, estimula la producción de ERO. Queda por determinar si la producción de ERO está relacionada con la vulnerabilidad selectiva al daño hipoglucémico de las distintas regiones cerebrales.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios en animales sugieren que la muerte neuronal hipoglucémica ocurre cuando las concentraciones de glucosa sanguínea caen por debajo de 1 mM (18 mg/dl) y la actividad electroencefalográfica (EEG) se interrumpe por al menos 30 minutos (Auer, 1984a). En humanos se ha observado que se requiere de un grado similar de hipoglucemia para inducir daño cerebral (Masayuki Fujioka et al., 1997). Estudios más recientes asocian la muerte neuronal hipoglucémica con un incremento en la producción de ERO, producidas principalmente durante el periodo de reintroducción de glucosa (RG) (Suh et al., 2007b). Algunos estudios han reportado que la hipoglucemia severa (HGS) y prolongada, aún en ausencia de período isoelectrico, puede inducir muerte neuronal en regiones discretas de la corteza cerebral (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008; Haces et al., 2010). Los mecanismos de la muerte neuronal inducida en estas condiciones no se han identificado. Sin embargo, varios estudios han sugerido la presencia de estrés oxidante en condiciones de hipoglucemia severa en ausencia de coma. En un estudio previo del laboratorio se encontró un aumento en la lipoperoxidación lipídica y en el contenido de proteínas nitrosiladas en regiones cerebrales vulnerables como hipocampo, corteza cerebral y estriado, más no en regiones más resistentes como el cerebelo (Haces et al., 2010). Sin embargo, no se ha estudiado si la producción de ERO aumenta durante un periodo de hipoglucemia severa antes de llegar al estado de coma, y si ésta ocurre de manera diferencial en las regiones y subregiones cerebrales más vulnerables al daño hipoglucémico. Por otra parte, aunque se sabe que la RG promueve la formación de ERO, tampoco se ha explorado en detalle su producción en distintas regiones del cerebro después de la reintroducción de glucosa.

En esta tesis se investigó la posible producción diferencial del ERO en ratones con HGS inducida por insulina en ausencia de coma, antes y después de la RG. También se investigó su posible relación con la inducción de muerte neuronal.

III. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes muestran que es el cese de la actividad cerebral junto con una concentración de glucosa por debajo de 1 mM conducen a una muerte neuronal. Por otro lado, la reintroducción de glucosa es un factor que incrementa la producción de ERO durante un evento de hipoglucemia severa con cese de la actividad cerebral. Sin embargo, hasta la fecha, son contados los estudios que reflejan una importancia evidente de los procesos sucedidos en un modelo de hipoglucemia severa sin isoelectricidad y sin reintroducción de glucosa. Además, es importante dar a conocer que los pacientes con diabetes, la mayoría de los casos, la hipoglucemia severa por el tratamiento con insulina, no culmina en coma. Por lo tanto, nuestro estudio podría permitir una intervención para disminuir el daño de las ERO ante una caída glucémica severa. Demostrar claramente esta producción de ERO durante un evento de hipoglucemia severa sin isoelectricidad cerebral y sin reintroducción de glucosa nos permitirá obtener más información sobre su posible relación con la muerte neuronal o su posible participación en alteraciones cognitivas observadas tanto en niños como en adultos expuestos a hipoglucemia moderada repetida, los cuales pueden desarrollar alteraciones a largo plazo en la función cognitiva y tienen el riesgo de desarrollar epilepsia (Joseph et al., 2008), y en caso de ocurrir en forma severa pueden presentarse alteraciones neurológicas permanentes o incluso la muerte (Mohseni, 2001). A pesar de los importantes avances tecnológicos, la terapia de insulina u otros agentes hipoglucemiantes sigue siendo el principal tratamiento para el control de la glucemia en los pacientes con DMT1.

IV. HIPÓTESIS

Las ERO se generarán de manera diferencial en el cerebro durante la HGS en ausencia de coma y su producción será estimulada por la reintroducción de glucosa. La generación de ERO será mayor en las regiones y subregiones cerebrales vulnerables al daño hipoglucémico.

V. OBJETIVO

Determinar en un modelo *in vivo* de HGS en ausencia de coma, si la producción de ERO ocurre de manera diferencial en el cerebro y su posible estimulación por la reintroducción de glucosa.

Determinar si la producción de ERO en las distintas regiones cerebrales correlaciona con aquellas que se sabe son más vulnerables al daño.

V.I Objetivos Particulares

- Determinar si hay una producción diferencial de ERO en corteza cerebral, hipocampo y estriado del ratón hipoglucémico.
- Establecer si la producción de ERO es estimulada por la RG
- Determinar si las ERO se producen en las regiones ó subregiones cerebrales que son más vulnerables al daño hipoglucémico.
- Determinar si existe una relación entre las células en proceso de degeneración y la producción de especies reactivas de oxígeno.

VI. METODOLOGÍA

VI.I Modelo Experimental

Todos los animales se trataron de acuerdo con la Guía de Salud para el cuidado y uso de Animales del Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (Publicaciones NIH N°. 80-23), revisado en 1996 y con la aprobación del Comité local del Cuidado Animal. Se hicieron todos los esfuerzos requeridos para minimizar el número de animales usados así como su sufrimiento. Para este estudio se utilizaron ratones macho, adultos de la cepa CD₁ adquiridos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México), con un peso de entre 28-38 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y luz (ciclo de 12 h) con acceso *ad libitum* a alimento y agua, en el vivario del Instituto de Fisiología Celular. En cada uno de los experimentos se incluyó 1 ratón control y dos hipoglucémicos, los cuales fueron trabajados en paralelo.

VI.II Implantación de Electrodo Craneales

Los animales fueron anestesiados con 2-3% de isoflurano en 95% O₂/5%CO₂, y se implantaron cuatro electrodos superficiales a cada uno de los animales para el registro del EEG, siguiendo el atlas de Paxinos and Franklin (2004). La determinación de las coordenadas estereotáxicas para la implantación de los electrodos se realizó, tomando como referencia la línea craneal Bregma a partir de la cual se midió 2 mm a cada lado hemisférico y se colocaron los primeros dos electrodos. A partir de estos puntos craneales se midieron 4 mm hacia el punto craneal lambda en cada uno de los hemisferios y se colocaron los otros dos electrodos, como se observa en la figura 9. Una vez posicionados los electrodos epidurales en la corteza frontal y parietal de ambos hemisferios, se fijaron al cráneo con cemento dental. Al cabo de la cirugía los ratones se monitorearon hasta que se recuperaron completamente y se colocaron en cajas individuales con acceso libre al alimento y agua. Durante la etapa post-quirúrgica se vigiló el comportamiento de los animales hasta el día de la inducción de la hipoglucemia.

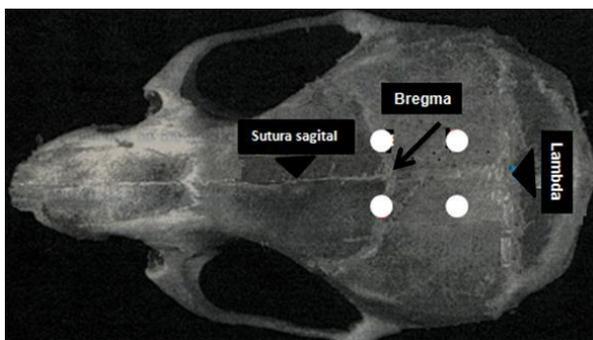


Figura 9. Esquema craneal. Superficie dorsal del cráneo del ratón, donde se muestra la localización de la implantación de los electrodos (círculos color blanco) para el análisis de EEG durante la HGS. Para ello se tomó como referencia a los puntos del plano horizontal bregma y lambda. Modificado de Paxinos y Franklin (2004).

VI.III Análisis de la Actividad Eléctrica Cerebral

La actividad cerebral se monitoreó una semana después de la cirugía usando un polígrafo Grass modelo 79E (Quincy, MA, USA, filtros 0.3-300 Hz). El EEG basal se monitoreó durante 15 min antes y después de la administración de insulina y se continuó hasta el final de la infusión de glucosa.

VI.IV Inducción de la Hipoglucemia

Para inducir la hipoglucemia los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de 24U de insulina bovina (Sigma, St. Louis, MO, USA). La sangre obtenida de la punta de la cola se usó para determinar las concentraciones de glucosa sanguínea con un glucómetro (Abbott Lab, Bedford, MA, USA) antes y cada hora después de la administración de insulina (30 min, 1-3 h post-ins, 1-3 h post-infusión de glucosa y 24 h post-insulina) como se observa en la figura 10 (a, b y c).

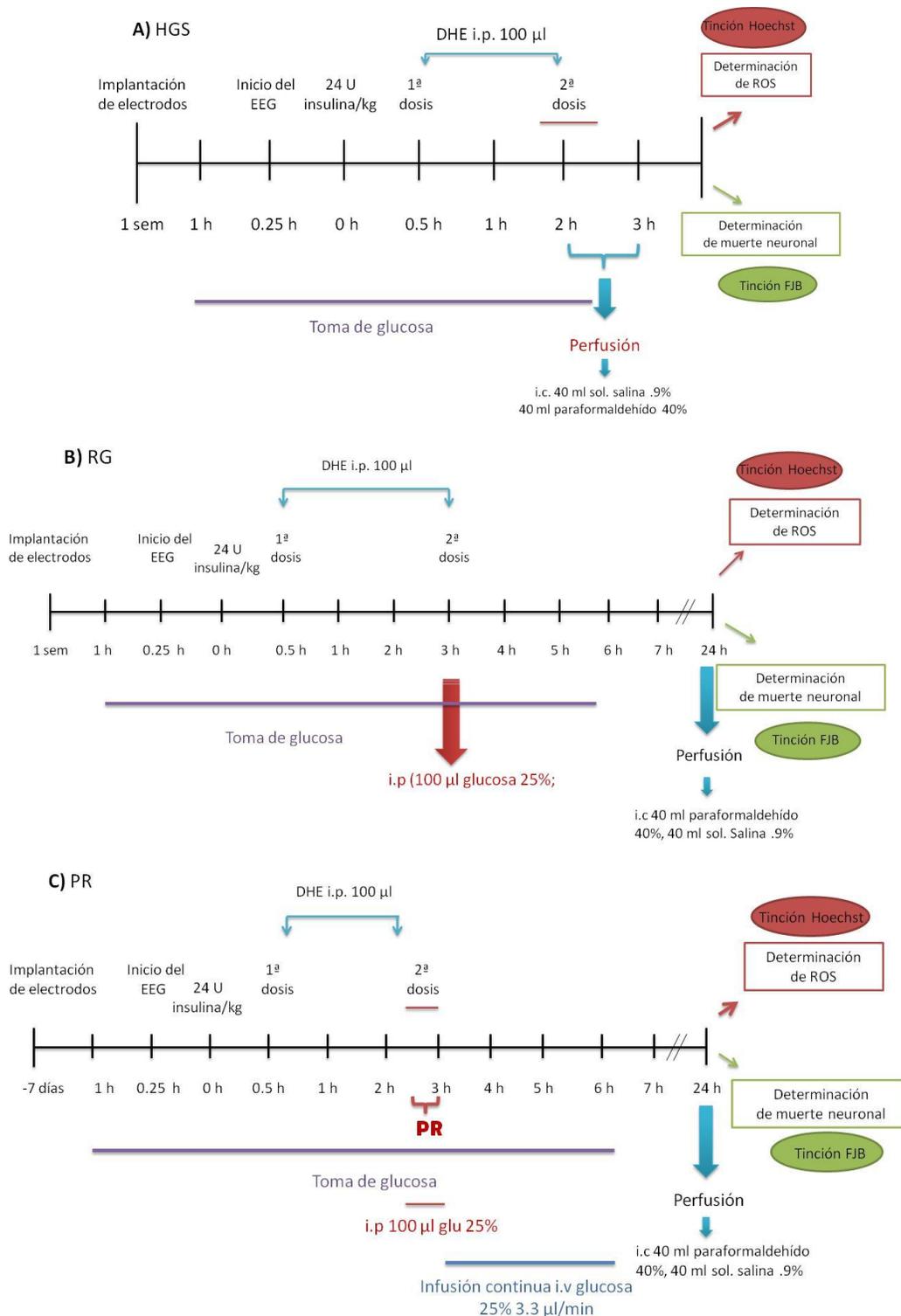


Figura 10. En el diagrama se muestran los tiempos en los que se llevó a cabo cada uno de los procesos experimentales. Una semana antes de inducir la hipoglucemia a través de la insulina se realizó la implantación de los electrodos. La concentración de glucosa sanguínea se midió a la par con el análisis EEG; antes de la administración de la insulina, se tomó el EEG basal durante 15 min y después de la administración de insulina hasta el término de la infusión continua de glucosa. Por otro lado, la toma de glucosa sanguínea se midió antes de la administración de insulina y a partir de los 30 min hasta el término de la infusión continua de glucosa y a las 24 h después del evento de hipoglucemia severa.

A) Grupo de hipoglucemia severa (HGS), **B)** Grupo con hipoglucemia severa y reintroducción de glucosa (RG; HGS/RG), y **C)** Grupo que presentó pérdida de reflejo de enderezamiento con RG (PR/RG). DHE, dihidroetidio; i.p., intraperitoneal.

A un grupo de animales se les indujo hipoglucemia severa durante 2.5-3 h (HGS, Fig. 10a) e inmediatamente después se les anestesió para extraer el cerebro y procesarlo para el análisis histológico. A un segundo grupo (RG, Fig. 10b), se les administró glucosa 3 h después de la administración de insulina (3 hr post-ins), por medio de una inyección i.p. de 100 µl de glucosa al 25% (glucosa al 50% en solución Krebs-Henseleit al 50%), para terminar la hipoglucemia. A un tercer grupo (PR, Fig. 10c), se dejó progresar la hipoglucemia hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento (PR), que es el momento en el que los animales pierden la capacidad de recuperar la posición horizontal después de haberlos colocado boca arriba, y antecede el estado de coma. En el momento en el que se presentó la PR se les administraron los 100 µl de glucosa al 25%, e inmediatamente después se les introdujo un catéter de polietileno a través de la vena femoral que se fijó con cinta adhesiva para la infusión continua de glucosa. Esta cirugía tomó alrededor de 2-5 min y la infusión continua de glucosa se llevó a cabo a través de una bomba de perfusión (Harvard Apparatus 22, South Natick, MA, USA) a un flujo de 3.3 µl/min de glucosa al 25% durante 3 h, como se reportó por Haces et al., (2010). Al cabo de 1 h de la infusión de glucosa el EEG normalmente muestra una actividad cerebral en proceso de recuperación. En el caso de que la concentración de glucosa en sangre continuara bajando se administró un bolo de glucosa (100 µl de glucosa al 25%, i.p). Cuando los animales se encontraron ambulatorios se les retiró el catéter y se colocaron en caja individuales con libre acceso a alimento y agua. 24 h después los animales fueron sacrificados, previo a esto se les midió la glucosa (Glu 24, ver figura 10).

VI.V Perfusión y Obtención del Tejido Cerebral

Los animales se sacrificaron a las 24 h de la inducción de la hipoglucemia en los grupos RG y PR, y 3 h después de la inyección de insulina en el grupo HGS. Se anestesiaron con pentobarbital y se procedió a perfundirlos con 40 ml de solución salina al 0.9% a través de la zona coronaria izquierda y se fijaron con 40 ml de paraformaldehído al 4%. Se extrajo el cerebro y se sumergió en paraformaldehído durante una noche. Posteriormente se pasó por un gradiente de sacarosas (20-30%). Se realizaron cortes coronales de los cerebros por medio de un criostato y se obtuvieron 2 series de cortes cada una con 6 láminas y cada lámina con 12 cortes de 25 µm.

VI.VI Tinción de Núcleos (Tinción de Hoechst)

El reactivo Hoechst es un compuesto fluorescente que se une al ADN, por lo que se utiliza habitualmente para el marcaje de los núcleos celulares. Para llevar a cabo esta tinción se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con solución D-PBS que contiene: KCl 2.68 mM, KH_2PO_4 1.46 mM, NaCl 136.8 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM. Al finalizar los 10 min, se incubó con el reactivo Hoechst durante 15 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados con D-PBS y se cubrió durante 10 min. El montaje de la muestra se realizó con fluoromount-G (EMS, Hatfield, PA, USA). Posteriormente las muestras se observaron en un microscopio Olympus de epifluorescencia usando los filtros: U-MNG2 (528-605 nm) para el conteo de la producción de ROS a través de la fluorescencia de Et y U-MNU2 (355-465 nm) para observar los núcleos.

VI.VII Determinación de ERO

La producción de ERO se determinó utilizando un marcador fluorescente sensible a la oxidación, el dihidroetidio (DHE; Invitrogen/Molecular Probes). El DHE es oxidado preferentemente por el superóxido (O_2^{\bullet}) a etidio (Et) y a 2-hidroxi-etidio (OH-Et) (Bindokas et al., 1996), transportándose al núcleo e intercalándose entre las bases del ADN y emitiendo fluorescencia roja. Para llevar a cabo esta tinción se realizó una contratinción con Hoechst para poder así poder identificar la ubicación de la marca roja en las células (ver tinción de Hoechst).

La DHE se preparó como una solución de 1 mg/ml y se administró a 25 mg/kg en 100 μl de dimetil sulfoxido (DMSO) y 100 μl de solución de fosfatos (PO_4) 10 mM y se inyectó en dos dosis (100 μl c/una), de forma i.p.: la primera a los 30 min después de la administración de insulina (post-ins), para todos los grupos y la segunda dosis dependiendo de la condición: 1) para los animales con HGS se les administró 2:30 – 3 hr post-ins, cuando los animales ya no responden a estímulos externos y pierden el reflejo de enderezamiento; 2) para el grupo con RG fue a las 3 hr post-ins cuando se administra glucosa, y 3) en el momento de la PR (2:30 hr post-ins).

Para llevar a cabo el conteo de la producción de ERO se capturaron diferentes campos de cada corte a través de un microscopio Olympus de epifluorescencia con el filtro U-MNG2 (528-605 nm), como se muestra en la figura 12. Para esto se tomaron imágenes de 4 campos para la corteza cerebral en un total de nueve cortes a partir de bregma: 1.34 mm, 0.86 mm, -0.10 mm, -0.58 mm, -1.06 mm, -1.34 mm, -1.82 mm, -2.30 mm y -2.70 mm Fig. 11a-b). Para el estriado se consideraron los cortes de los siguientes niveles: 1.34 mm, 0.86 mm, -0.10 mm, -0.58 mm, -1.06 mm y se

consideraron 3 campos por corte (ver figura 11a-b). Para el hipocampo se consideraron 5 cortes en los siguientes niveles: 1.06 mm, -1.34 mm, -1.82 mm, -2.30 mm y -2.70 mm (figura 11c), tomando como regiones de estudio a CA₁, CA₃, giro dentado/ hilus y subículo en cada condición. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia de etidio (UAF de Et) por área. También se muestran fotografías representativas tomadas con microscopía confocal.

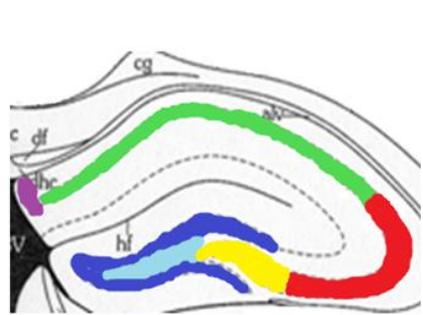
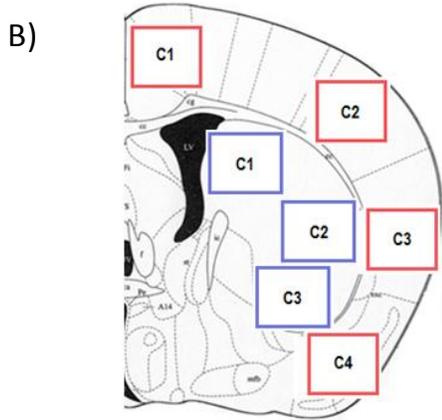
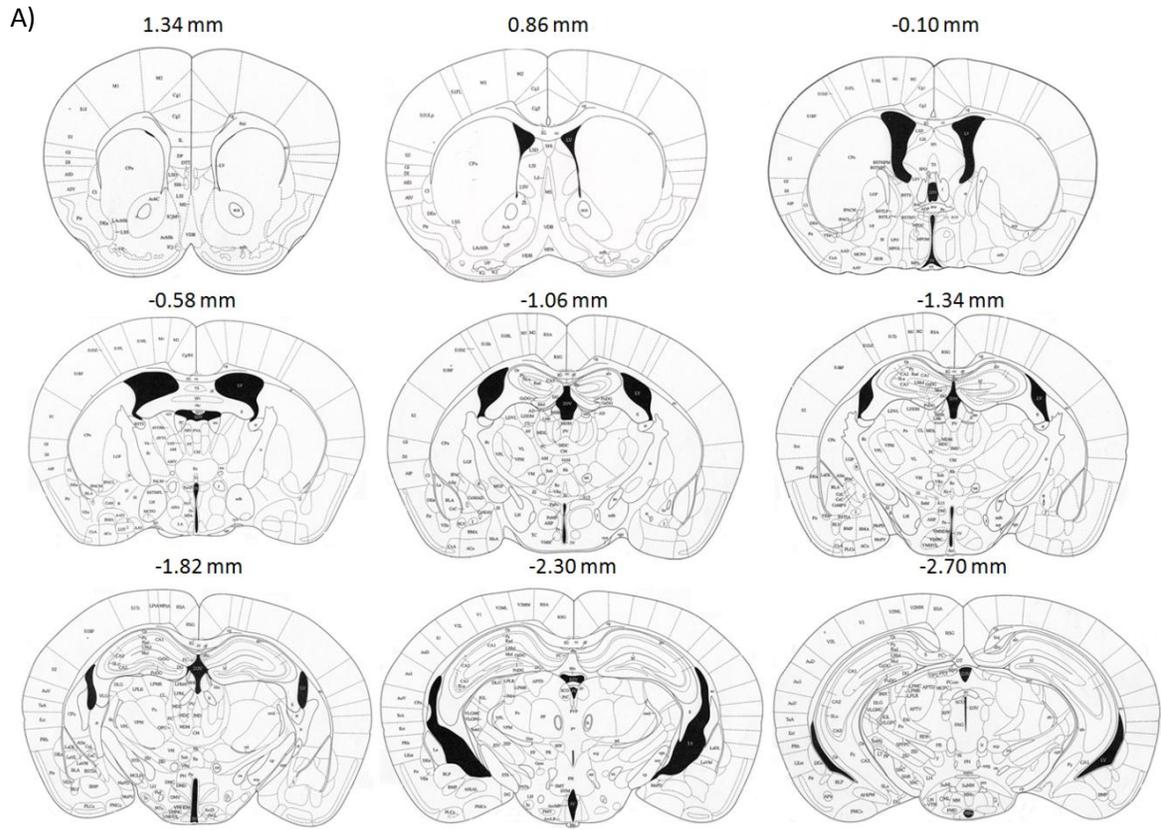


Figura 11. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de ratón estudiadas. A) Niveles antero-posteriores a partir de Bregma tomando las coordenadas esterotáxicas de acuerdo al atlas de Paxinos y Franklin (2004) del ratón. Se consideraron los niveles 1.34 mm a -0.58 mm a partir de Bregma como las secciones anteriores de la corteza cerebral y de -1.06 mm a -2.70 mm de Bregma como las secciones posteriores. B) Representación de una sección coronal donde se muestran los campos capturados por microscopia de epifluorescencia para el conteo de la producción de superóxido tanto en corteza cerebral (recuadros rojos) como en el cuerpo estriado (recuadros de color azul) realizado en ambos hemisferios. C) Representación de las regiones estudiadas del hipocampo: Subículo (púrpura), CA1 (verde), CA3 (rojo), CA4 (amarillo), giro dentado (azul fuerte), hilus (azul claro).

VI.VIII Determinación de la Muerte Neuronal (Tinción de Fluoro-Jade B)

La muerte neuronal se evaluó a las 3 h en el grupo de HGS y en los grupos RG y PR a las 24 h a través de la tinción de Fluoro-Jade B que es un marcador de células en degeneración (Schmued y Hopkins, 2000). La tinción con FJB (Chemicon, Temecula, CA, USA) se realizó como se describió en Haces et al. (2010). De forma breve, las secciones coronales del cerebro (25 μ m) se secaron a 50 °C durante 30 min; se cubrieron con etanol al 80% y 5 min después este se reemplazó por etanol al 70%. Las secciones se cubrieron con permanganato de potasio 0.06% durante 10 min, al cabo de este tiempo se lavaron inmediatamente y se incubaron con la solución de FJB 0.0004% disuelto en ácido acético al 0.1%, durante 20 min. Finalmente, las secciones se lavaron con agua, se secaron a 50 °C, y se deshidrataron con xilol durante 2 min y se cubrieron con fluoromount-G (EMS, Hatfield, PA, USA).

Las secciones se observaron bajo un microscopio Olympus de epifluorescencia usando el filtro U-MNB2 (395-590 nm). Las células positivas totales en cada región cerebral de interés (corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo) se contaron en 24 secciones (cada sección contaba con un intervalo de 150 μ m) por animal a través de conteo directo en ambos hemisferios.

VI.IX Análisis Estadístico

Los datos expresados como la media \pm SEM (error estándar de la media), fueron analizados por un ANOVA de una sola vía seguida por una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple. Los valores de $p < 0.001$ y $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

VII. RESULTADOS

Al inicio del experimento todos los animales mostraron una concentración de glucosa sanguínea dentro de los niveles normales (106-115 mg/dl). Como se esperaba, a los 30 minutos los grupos tratados con insulina manifestaron una caída en la concentración de glucosa sanguínea (Figura 12), llegando hasta aproximadamente 44 mg/dl. Estos animales disminuyeron su desplazamiento a lo largo de la caja de experimentación. Al cabo de 1 h los niveles de glucosa continuaron disminuyendo y se mantuvieron casi tres horas a niveles menores de 20 mg/dl (la medición límite que nos proporciona el glucómetro usado es de 20 mg/dl; por debajo de este rango el aparato marca la concentración de glucosa sanguínea como menor a 20 mg/dl) correspondientes a una hipoglucemia severa. Por esta razón el valor mínimo de glucosa que se presenta en la gráfica es de 19 mg/dl.

El grupo HGS se mantuvo cerca de 2 h en hipoglucemia severa con niveles de glucosa menores a los 30 mg/dl, mientras que en los animales del grupo RG, los niveles de glucosa iniciaron a recuperarse 1 h después de la administración de glucosa y estaban ambulatorios aproximadamente a las 2 h después de la inyección de glucosa. Sin embargo, los animales de este grupo permanecieron en hipoglucemia severa, con los niveles de glucosa sanguínea por debajo de 30 mg/dl hasta por 4 h (Figura 12). Los animales del grupo PR recuperaron sus niveles de glucosa sanguínea más lentamente, permaneciendo en hipoglucemia severa hasta por aproximadamente 6 h, mostrándose ambulatorios cercanamente después de 2 h de finalizar la infusión de glucosa. El grupo control mantuvo sus niveles de glucosa dentro de la glucemia normal. Todos los ratones estuvieron euglucémicos a las 24 h después de la administración de insulina.

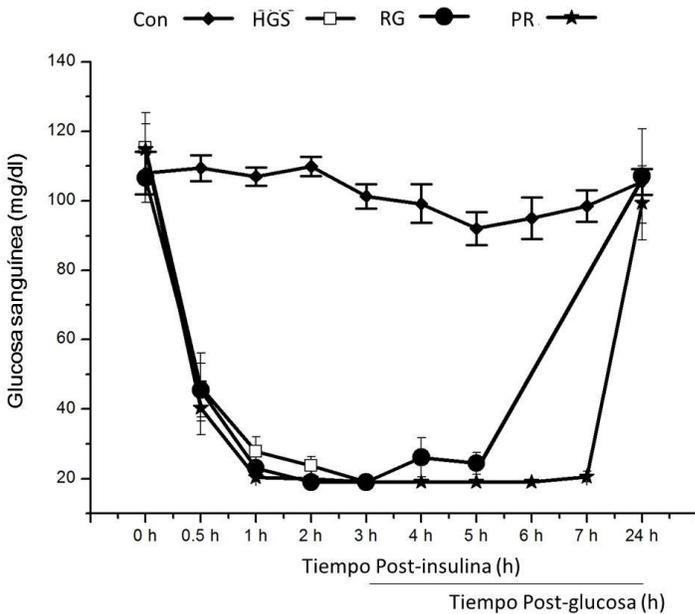


Figura 12. Niveles de glucosa sanguínea en los animales control y tratados con insulina. Los recuadros blancos (\square) representan al grupo de animales que recibió insulina pero que no fue rescatado con la reintroducción de glucosa (HGS). Los círculos negros (\bullet) representan al grupo con hipoglucemia severa más reintroducción de glucosa (RG) a las 3 h después de la administración de insulina (post-insulina). Las estrellas de color negro (\star) simboliza al grupo con hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa y que además presentó pérdida del reflejo de enderezamiento (PR) sin dejar que llegara al periodo de isoelectricidad. Los rombos negros (\blacklozenge) representan el nivel de glucosa sanguínea de los animales control (Con). Cada barra representa la media \pm SEM (n= 6-10).

Análisis EEG durante la caída progresiva de la glucosa sanguínea

Existe una relación entre la concentración de glucosa sanguínea y las características de la actividad eléctrica cerebral monitoreada por medio del EEG durante la hipoglucemia progresiva inducida por insulina, como ha sido reportado antes (Auer et al., 1984; Haces et al., 2010). El análisis EEG ha formado parte esencial en el estudio de la hipoglucemia debido a que gracias a éste se puede monitorear los cambios en la actividad cerebral a lo largo de este evento, determinando cuando un animal entra en estado de coma. Por ello, en nuestro estudio es importante el análisis EEG, ya que nos permitió corroborar la ausencia de isoelectricidad cerebral (Figura 13).

Antes de inducir la HG, 30 min antes de la administración de insulina, el EEG de los animales muestra una actividad normal. Este estado basal muestra una mayor presencia de ondas α y ondas β de menor amplitud y de mayor frecuencia. En este momento el animal muestra un desplazamiento normal a lo largo de la cabina de experimentación, presentando conducta exploratoria. Treinta minutos después de la administración de insulina (0.5 h post-ins), cuando la concentración de glucosa sanguínea muestra un descenso pronunciado, en el EEG no se observa un cambio drástico (Figura 13). Sin embargo, 1 h después de la administración de insulina comienza a observarse una menor frecuencia de ondas α , e incluso en algunos animales se

observa la presencia de ondas teta θ . Para este tiempo, ya casi todos los animales tratados presentan niveles de glucosa sanguínea menores a los 20 mg/dl. Por otro lado, disminuye el desplazamiento de los animales, permaneciendo en ciertas zonas de la cabina de registro. Después de 2 h de la administración de insulina, los animales se muestran completamente inmóviles en un solo lugar, pero aún siguen respondiendo ante estímulos externos.

Por otro lado, las ondas muestran un incremento en la amplitud y una menor frecuencia (desaparecen casi las ondas α y se comienzan a observar las ondas θ); entre las 2.5 y 3 h después de la administración de insulina, se presenta la pérdida del reflejo (PR) de enderezamiento, que se acompaña de la aparición de ondas de alta amplitud y frecuencia espontánea, las ondas θ (4-8 Hz), y las ondas δ (1-4 Hz) comienzan a aparecer. A este tiempo el animal se encuentra postrado y responde ante cambios externos con mucha dificultad. Es en ese momento en el que el animal es rescatado con la RG para impedir que entre en estado de coma. Una hora después de la RG la actividad cerebral se recupera lentamente, mostrando un aumento en la amplitud y frecuencia de las ondas eléctricas, aunque la glucemia tarda en restablecerse principalmente en el grupo con PR (quienes tuvieron infusión continua de glucosa durante 3 h).

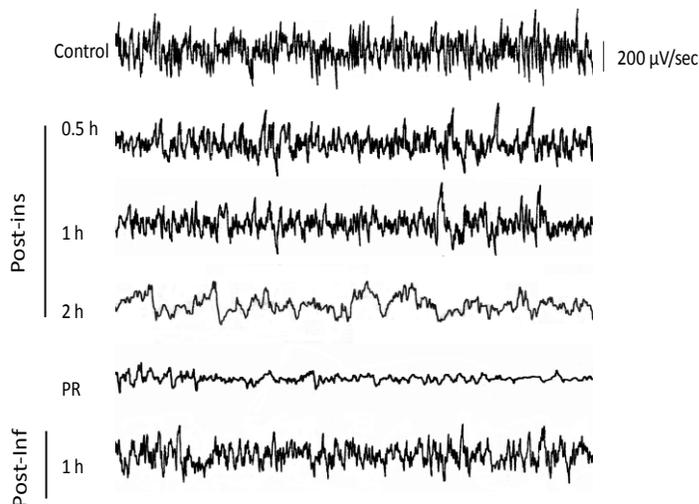


Figura 13. Análisis EEG realizado durante un evento de hipoglucemia severa. Los animales fueron implantados con electrodos epidurales una semana antes del tratamiento de insulina. El análisis EEG se realizó 30 min previo a la administración de insulina, tomado como EEG basal (control); 0.5 y 2 h después de la administración de insulina (post-ins) y 1 h después de la reintroducción de glucosa (post-inf). El EEG control está formado principalmente por ondas α que se ven disminuidas 1 h post insulina. Conforme van decreciendo los niveles de glucosa sanguínea surge un aumento de las ondas lentas θ a las 2 h y las ondas δ (de mayor amplitud y baja frecuencia) se hacen presentes al momento de la pérdida del reflejo del enderezamiento (PR). Después de 1 h de la reintroducción de glucosa (post-inf) el EEG se recupera.

Producción de ERO durante la hipoglucemia severa y después de la RG

Para determinar si la hipoglucemia induce la producción de ERO, y el posible efecto de la RG sobre esta producción en un modelo de hipoglucemia sin coma, procedimos a evaluar la

intensidad de la fluorescencia de Et en el cerebro del ratón después de la administración i.p. de DHE. La producción de ERO se evaluó en las distintas regiones cerebrales señaladas en la literatura como aquellas con mayor vulnerabilidad ante el daño hipoglucémico, como son la corteza cerebral, el estriado, así como las distintas áreas del hipocampo.

Generación de ERO en la corteza cerebral

En la figura 14 se muestran los datos de la producción de ERO en unidades de fluorescencia de Et analizados en la corteza cerebral total de los diferentes grupos experimentales. Encontramos que la HGS estimula significativamente la producción de ERO evaluada a las 3 h después de administración de insulina. Se observó un incremento significativo del 133% por arriba del control (Figura 14). En el grupo con RG la producción de ERO no tuvo una diferencia significativa respecto al grupo HGS. Sin embargo, el grupo PR presentó una oxidación del DHE cerca de 3 veces mayor (219%) respecto al grupo control al evaluarse 24 h después de la administración de insulina.

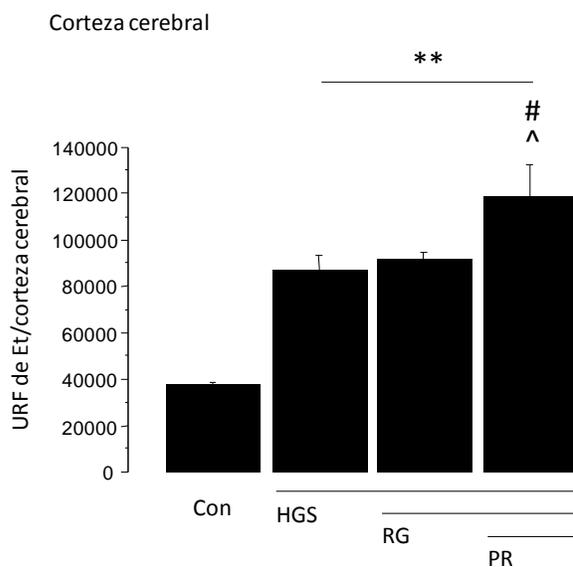


Figura 14. Niveles de ERO en respuesta a diferentes eventos de hipoglucemia severa. Unidades relativas de fluorescencia (URF) de etidio (Et) en la corteza cerebral total de animales sometidos a hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa en ausencia (RG) ó presencia de la pérdida del reflejo de enderezamiento (PR). El conteo de la fluorescencia emitida por el Et se llevó a cabo a partir de imágenes capturadas de los cortes de cerebro a través de un programa de análisis de imágenes (Image J) utilizando un microscopio de epifluorescencia. Se analizaron 9 cortes por animal y 4 campos por corte. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher. ** $p < 0.001$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo de HGS. ^ $p < 0.05$ respecto al grupo con RG.

Para determinar a qué nivel de la corteza cerebral se produce mayor cantidad de ERO, nos dimos a la tarea de separar los campos estudiados, en anteriores y posteriores como se describió en la sección de métodos (Figura 15B y C). Encontramos una mayor fluorescencia en los campos

posteriores, incluso en el grupo control, lo que sugiere que la producción basal de ERO es mayor en las regiones posteriores de la corteza cerebral.

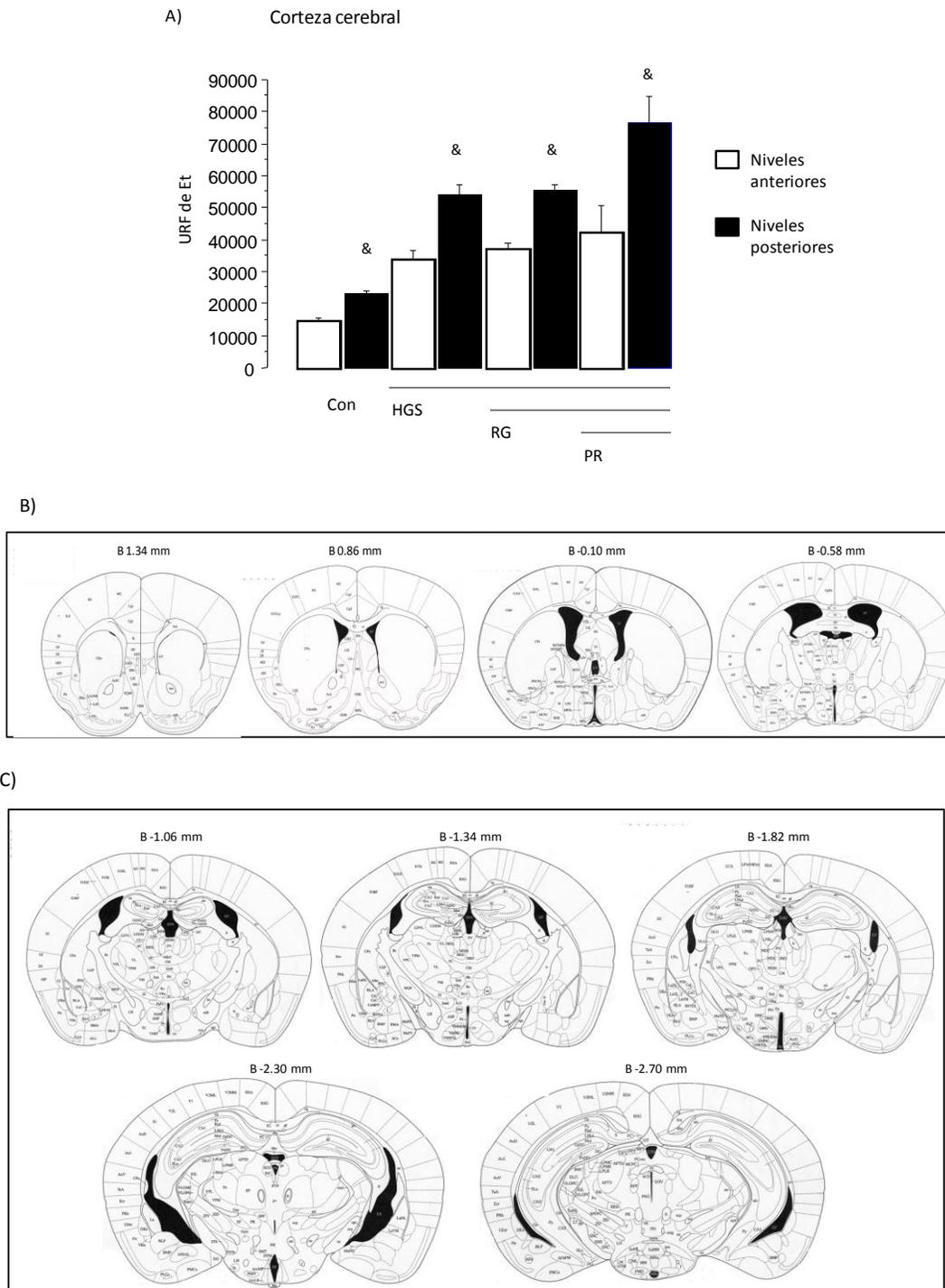


Figura 15. Producción de ERO en niveles anteriores y posteriores de la corteza cerebral con hipoglucemia severa. Unidades relativas de fluorescencia (URF) de etidio (Et) en la corteza cerebral de animales sometidos a hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa en ausencia (RG) ó presencia de la pérdida

del reflejo de enderezamiento (PR). Se muestra la fluorescencia del Et en niveles anteriores y posteriores de la corteza cerebral. (A) Gráfico del conteo en la fluorescencia de Et tanto de los niveles anteriores como posteriores. (A) Niveles anteriores utilizados en este estudio, incluyen del nivel 1.34 mm al -0.58 mm con respecto a Bregma, de acuerdo a las coordenadas descritas en el Atlas del cerebro del ratón de Paxinos y Franklin (2004). En estos niveles se cuantificó la fluorescencia en la corteza motora, somatosensorial, insular y piriforme, indicadas en la Fig. 11B. (B) Los niveles posteriores abarcan de -1.06 mm al -2.70 mm con respecto a Bregma. En estos niveles se cuantificó la fluorescencia en la corteza retrosplenial, somatosensorial, temporal y piriforme, indicadas en la figura 11B a partir de imágenes capturadas de los cortes de cerebro a través de un programa de análisis de imágenes (Image J) utilizando un microscopio de epifluorescencia. Se analizaron 9 cortes por animal y 4 campos por corte. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher, & p<0.001 respecto a los niveles anteriores de cada grupo.

Producción de ERO en las distintas áreas de la corteza cerebral

Se realizó la cuantificación de fluorescencia roja del Et en cada una de las regiones corticales de los distintos niveles analizados, incluyendo la corteza motora (Figura 11B, recuadro C1), corteza somatosensorial (Figura 11B, recuadro C2), corteza insular (Figura 11B, recuadro C3); corteza retrosplenial (surge cuando desaparece la corteza motora), corteza temporal, que abarca la corteza ectorrhinal y perirrinal (surge cuando desaparece la corteza insular) y la corteza piriforme (Figura 11B, recuadro C4). Cada una de las regiones contabilizadas se representa en los esquemas ubicados arriba de cada gráfica.

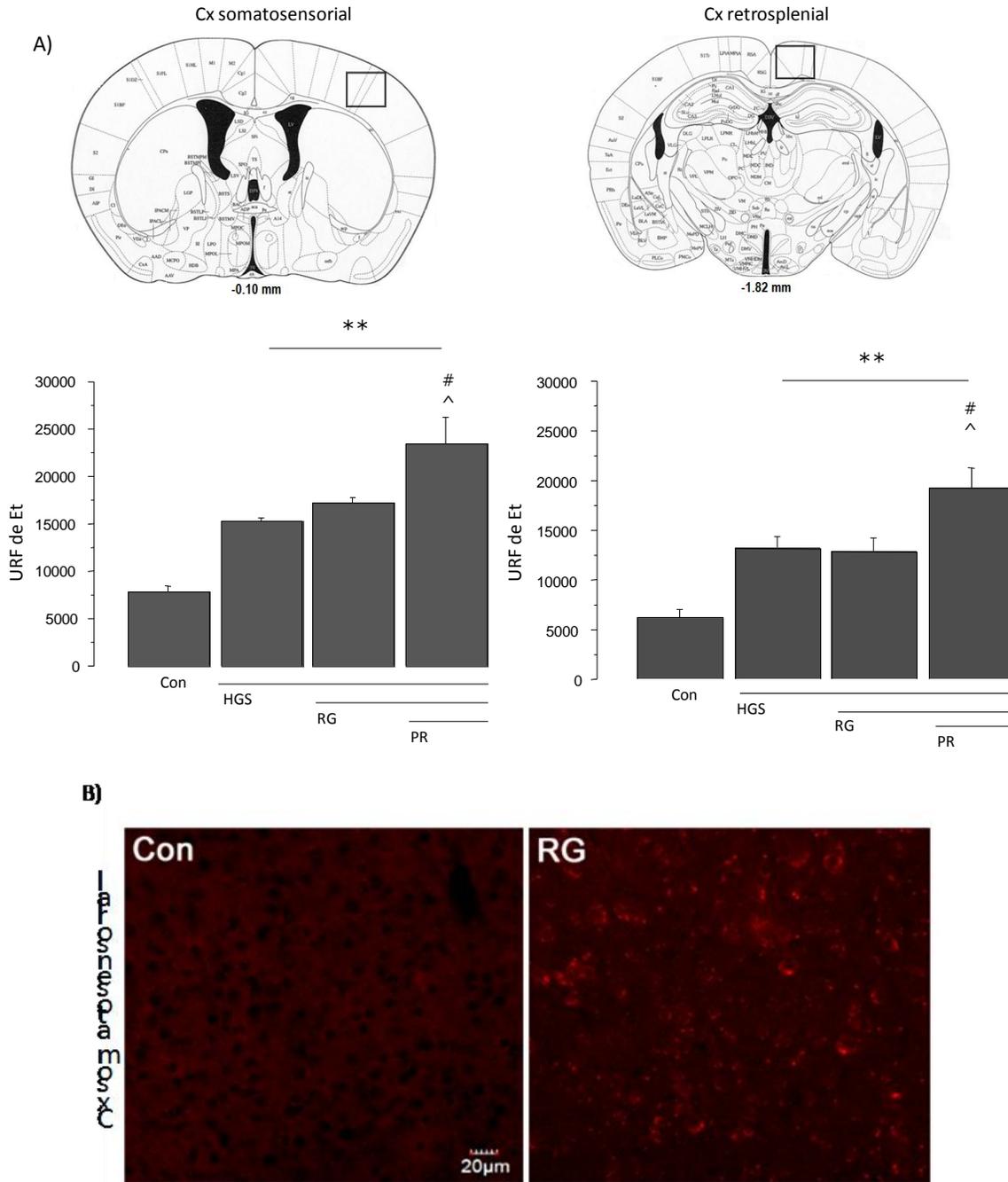
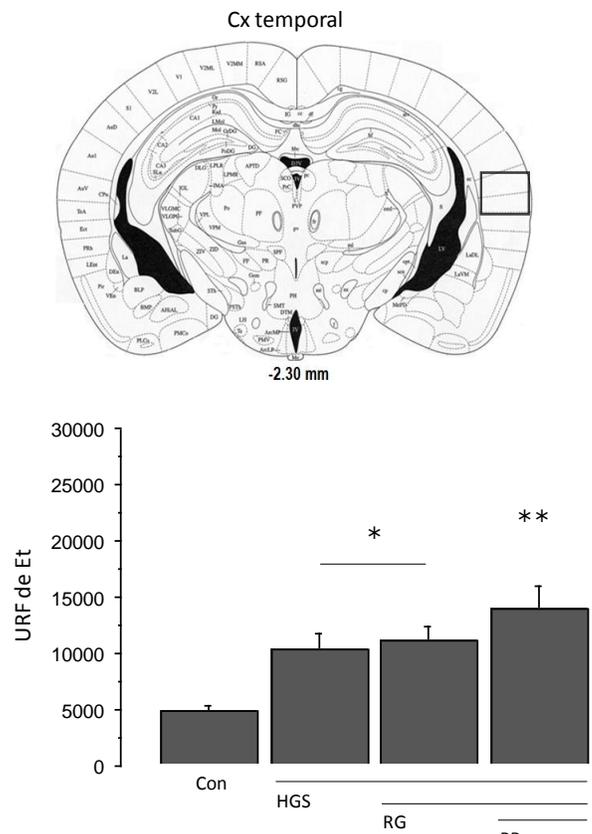
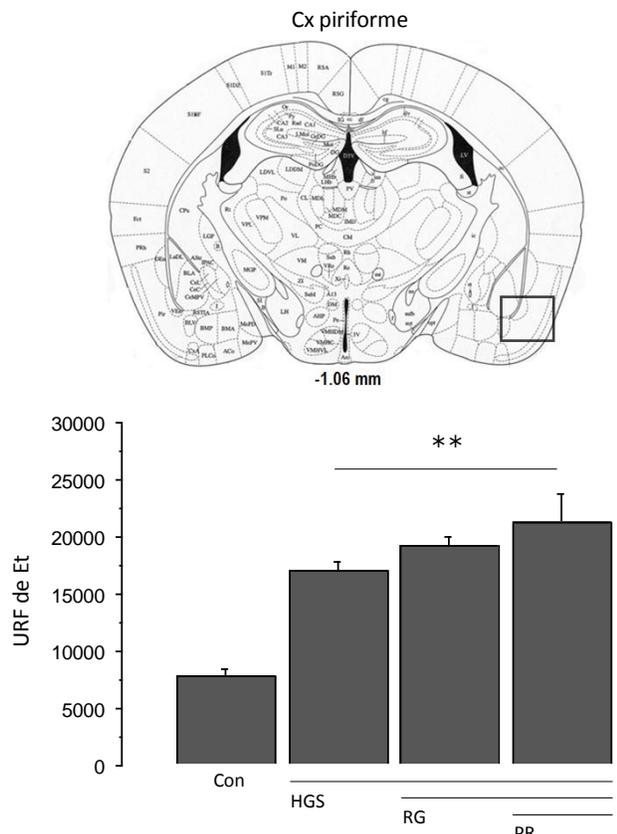
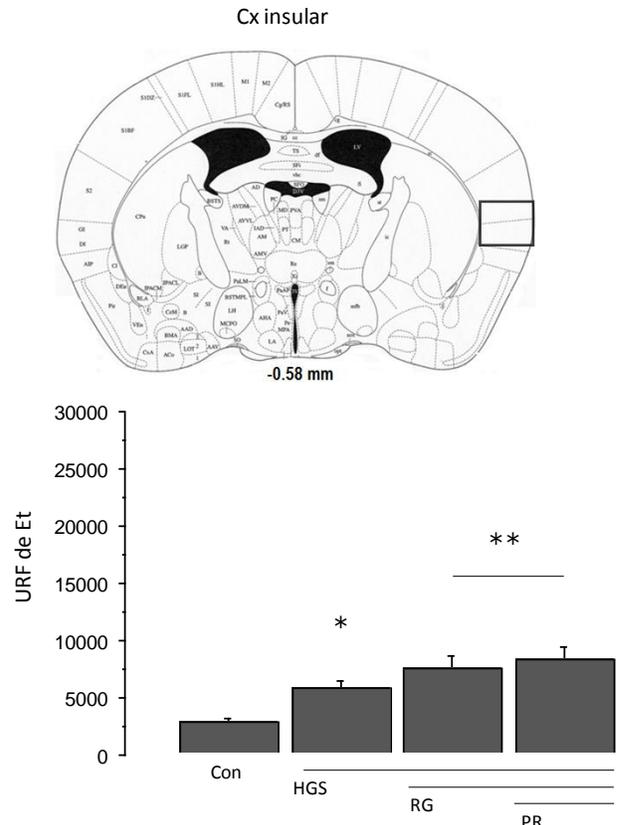
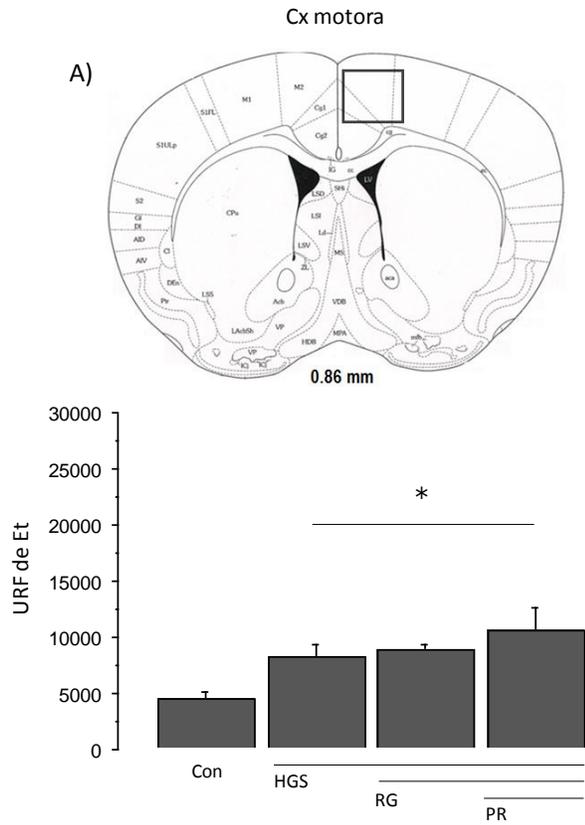


Figura 16. Niveles de ERO en la corteza somatosensorial y retrosplenial en respuesta a diferentes eventos de hipoglucemia severa. Unidades relativas de fluorescencia (URF) de etidio (Et) en la corteza cerebral de animales sometidos a hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa en ausencia (RG) ó presencia de la pérdida del reflejo de enderezamiento (PR). **A)** Gráficos de incremento de la fluorescencia emitida por el Et realizada a partir de imágenes capturadas de los cortes de cerebro a través de un programa de análisis de imágenes (Image J) utilizando un microscopio de epifluorescencia. Se analizaron 9 cortes por animal y 4 campos por corte, para la corteza restrosplenial y para la corteza somatosensorial. La región cuantificada de la corteza se muestra en el recuadro de color negro señalado en el esquema de arriba de cada una de las gráficas. **B)** Micrografías representativas de las secciones de la corteza somatosensorial, 24 h después de la hipoglucemia severa. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos se analizaron por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher. ** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ respecto al grupo control, # $p < 0.05$ respecto al grupo HGS y ^ $p < 0.05$ respecto al grupo con RG.

En todas las áreas, los ratones hipoglucémicos mostraron un incremento significativo en la señal de Et comparado con el grupo control. El incremento de fluorescencia fue similar entre todas las áreas corticales entre 81-117% relativo al grupo control. Cuando los animales recibieron RG el incremento en la señal de Et observada a las 24 h fue muy similar a la que se observó en el grupo con HGS en todas las áreas cerebrales, mientras que en el grupo PR, la fluorescencia de Et tuvo un incremento significativamente mayor en algunas áreas corticales como la corteza somatosensorial (53 % de incremento) y la corteza retrosplenial (47 % de incremento), respecto al grupo HGS (Figura 16A). En las micrografías (Figura 16B), se logra apreciar una mayor intensidad de fluorescencia roja brillante en animales representativos del grupo con RG respecto al grupo control. Por otro lado, la corteza insular y temporal de los animales del grupo PR mostraron un incremento del 43% y del 35% respecto al grupo HGS, pero estos cambios no resultaron estadísticamente significativos (Figura 17). En la figura 17B se muestran micrografías representativas del aumento en la señal fluorescente en la corteza motora de un animal del grupo PR comparado con el animal control, y en la corteza piriforme de un animal del grupo HGS comparado con uno control. Estos datos en su conjunto, sugieren que la corteza es una región muy vulnerable a la producción de ERO ante la hipoglucemia severa, ya que en todas las áreas se observa un incremento significativo en la fluorescencia de Et con respecto al grupo control. Sin embargo, la reintroducción de glucosa no parece estimular más la producción de ERO, salvo en algunas regiones corticales en los animales que presentaron la PR.

:



B)

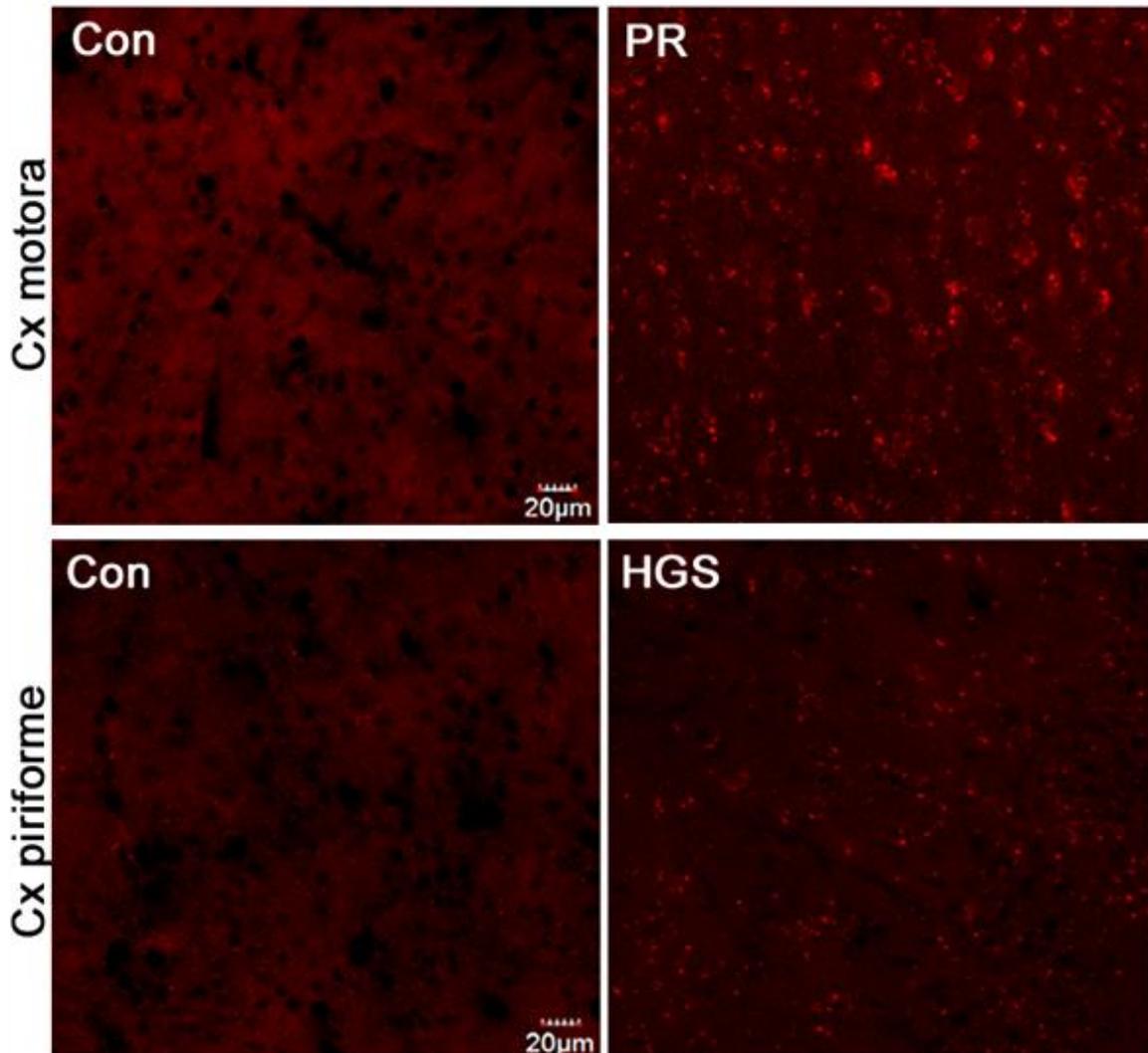


Figura 17. Unidades relativas de fluorescencia (URF) de etido (Et) en la corteza cerebral de animales sometidos a hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa en ausencia (RG) ó presencia de la pérdida del reflejo de enderezamiento (PR). **A)** El incremento de la fluorescencia del Et se realizó como se describe en la figura 16. Se muestran las cortezas: motora, insular, piriforme y temporal. La región cuantificada de cada corteza está representada en los cuadros de cada esquema colocado arriba de cada una de las gráficas. **B)** Micrografías representativas de la fluorescencia del Et en la corteza motora de un animal del grupo control y otro del grupo PR, y de la corteza piriforme de un animal del grupo control y otro del grupo de HGS. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher, ** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

Producción de ERO en el cuerpo estriado

Otra de las regiones cerebrales sensibles al daño hipoglucémico reportado en la literatura es el cuerpo estriado (Auer et al., 1984b, 1985b). Después de la captura de tres campos bajo microscopía de epifluorescencia se realizó un conteo total de la fluorescencia en esta región cerebral. Esta región muestra un incremento significativo del 125% en la fluorescencia de Et en el grupo con HGS respecto al grupo control (Figura 18). En esta región la fluorescencia incrementó del 25-43% en los grupos de RG y PR, respectivamente, relativo al grupo HGS. En esta región la PR no mostró un efecto significativo respecto al grupo RG, sugiriendo que la RG es quien estimula la producción de ERO. Micrografías representativas de cortes de cerebro a nivel del estriado de animales de los distintos grupos se muestran en la figura 18B.

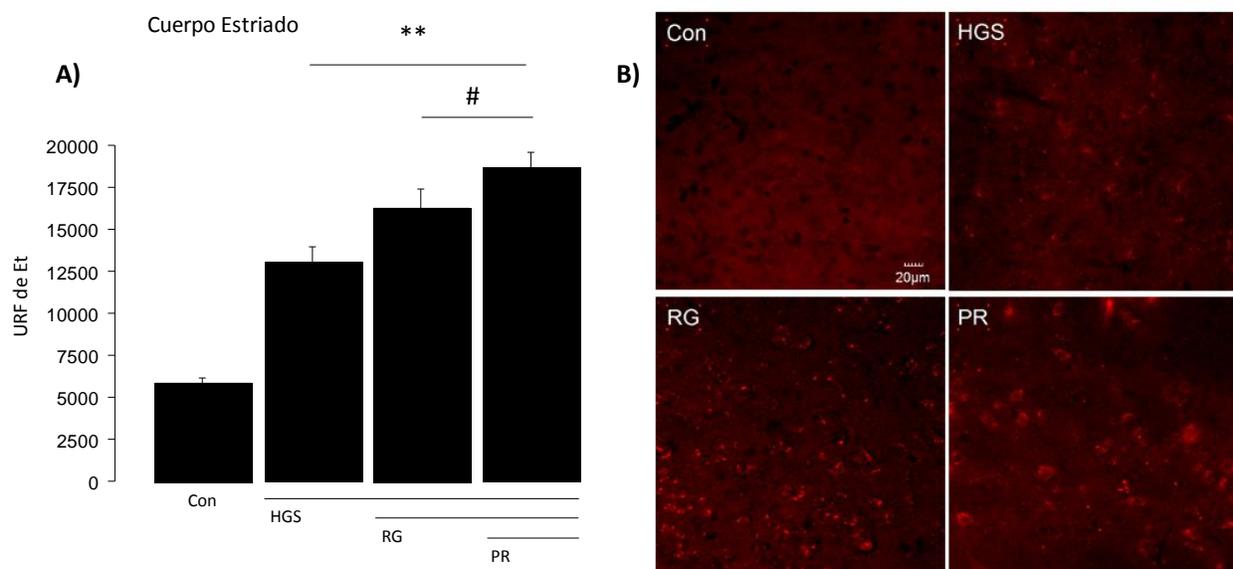


Figura 18. Unidades relativas de fluorescencia (URF) de etidio (Et) en el cuerpo estriado de animales sometidos a hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa en ausencia (RG) ó presencia de la pérdida del reflejo de enderezamiento (PR). **A)** Gráfico del conteo de la intensidad de fluorescencia emitida por el Et, realizada como se describe en la figura 16. **B)** Micrografías del conteo de la fluorescencia de Et. Se analizaron 5 cortes por animal y 3 campos por corte. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 5-7). Los datos fueron analizados por la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher. **p<0.001 y *p<0.05 respecto al grupo control. #p<0.05 respecto al grupo de HGS.

Producción de ERO en el hipocampo

Para identificar la producción de ERO en la región del hipocampo se capturaron cinco imágenes del hipocampo a distintos niveles a partir de Bregma (Figura 11C). Se analizó la generación de ERO desde el corte más anterior del cerebro donde aparece el hipocampo (1.06 mm a partir de Bregma, Figura 19). En este corte sólo se cuantificó la región CA₃, ya que era la única región bien delimitada, y se encontró que la producción de ERO se generó principalmente en el grupo de HGS sin presentarse efecto de la RG ó de la PR (Figura 19), además de que este incremento resultó simétrico en ambos hemisferios (datos no mostrados).

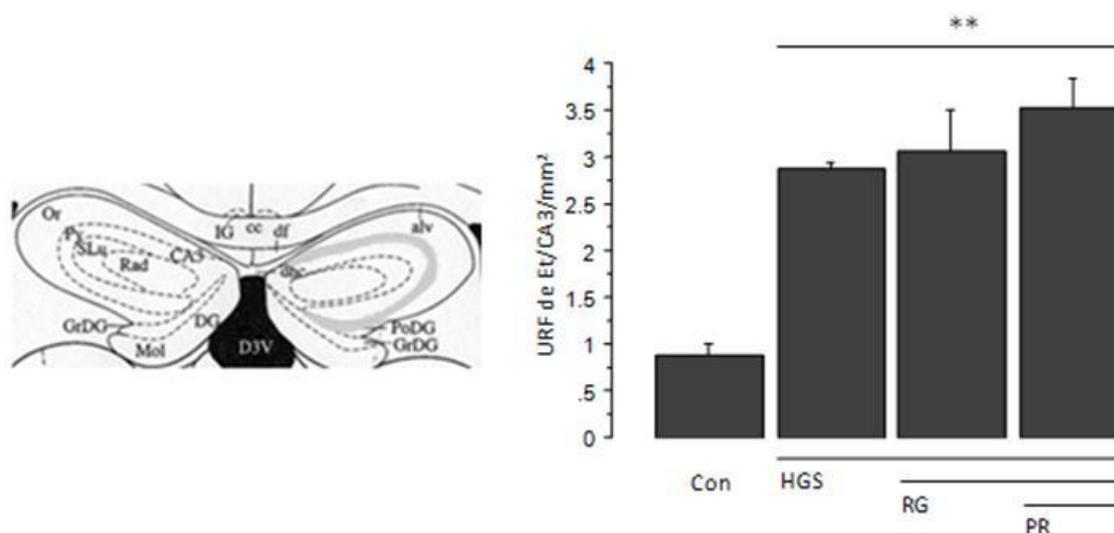


Figura 19. Determinación de la fluorescencia de Et en el corte más anterior del hipocampo. Esquema representativo del nivel -1.06 mm a partir de Bregma, donde se llevó a cabo el conteo de la fluorescencia de Et como se describe en la figura 18. El gráfico muestra las unidades relativas de fluorescencia (URF) de etidio (Et) en el nivel más anterior del hipocampo de animales sometidos a hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa en ausencia (RG) ó presencia de la pérdida del reflejo de enderezamiento (PR). Los datos representan fluorescencia URF/mm². Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher. **p<0.001 respecto al grupo de control.

En los niveles posteriores se cuantificó la producción de ERO en las diversas subregiones del hipocampo: CA₁, CA₃, CA₄, el giro dentado con el hilus (GD/Hi) y el subículo (Sub). Todas las regiones del hipocampo analizadas mostraron un incremento en la fluorescencia de Et en los animales expuestos a HGS respecto al grupo control (Figura 20 y 21 A-E). El incremento en la fluorescencia de Et varió entre 107% y 232% entre las diferentes regiones comparadas con el grupo control. El cambio más bajo se observó en el subículo (107%) y el mayor fue en CA₃ (232%; Figura 20 y 21 B y E). La RG provocó un incremento mayor de la fluorescencia de Et respecto al

grupo de HGS, siendo mayor en CA4 (87 %) y la región CA1 (58%), mientras que CA3 y el GD/Hi mostraron cambios similares (51 % y 43 %, respectivamente) (Figura 20). Los animales con PR, aunque mostraron un mayor aumento en la fluorescencia del Et en CA1 y CA4, éste no fue significativo con respecto al grupo RG. Por último, en la región del subiculum sólo se observó un incremento significativo de aproximadamente 3 veces en la fluorescencia del Et en el grupo de PR, mientras que el incremento en los grupos de HGS y de RG no es significativo estadísticamente debido posiblemente a la alta variabilidad de los datos en estos grupos (Figura 20). En la figura 21 se muestran micrografías representativas de la señal de etidio en las distintas subregiones del hipocampo en los distintos grupos experimentales. En el panel A se muestra el incremento de la fluorescencia en la región CA1 en animales representativos de cada grupo experimental. Como puede observarse, hay un aumento en la fluorescencia del Et en todos los grupos experimentales con respecto al control, y en los animales que recibieron reintroducción de glucosa (RG y PR) la señal fluorescente es mayor. En el panel B se muestra la región de CA3 y puede apreciarse que la condición de PR presenta una intensidad de fluorescencia mayor con respecto a la condición control y la de HGS. En el panel C se muestran cortes representativos de la región de CA4 en donde puede apreciarse mayor señal fluorescente en los cortes de los animales de los grupos HGS y RG con respecto al del grupo control. En el panel D se muestra la región del GD y del hilus, en donde es evidente una mayor señal de fluorescencia en los cortes de cerebro de animales representativos de los grupos RG y PR con respecto a los grupos HGS y control. Finalmente en el panel E, se muestra la región del subículo, en donde puede observarse mayor señal de fluorescencia en los grupos HGS y principalmente en el grupo PR con respecto al control. En la tabla 2 se muestra un resumen de los incrementos en la fluorescencia del Et en cada subregión del hipocampo en cada grupo experimental.

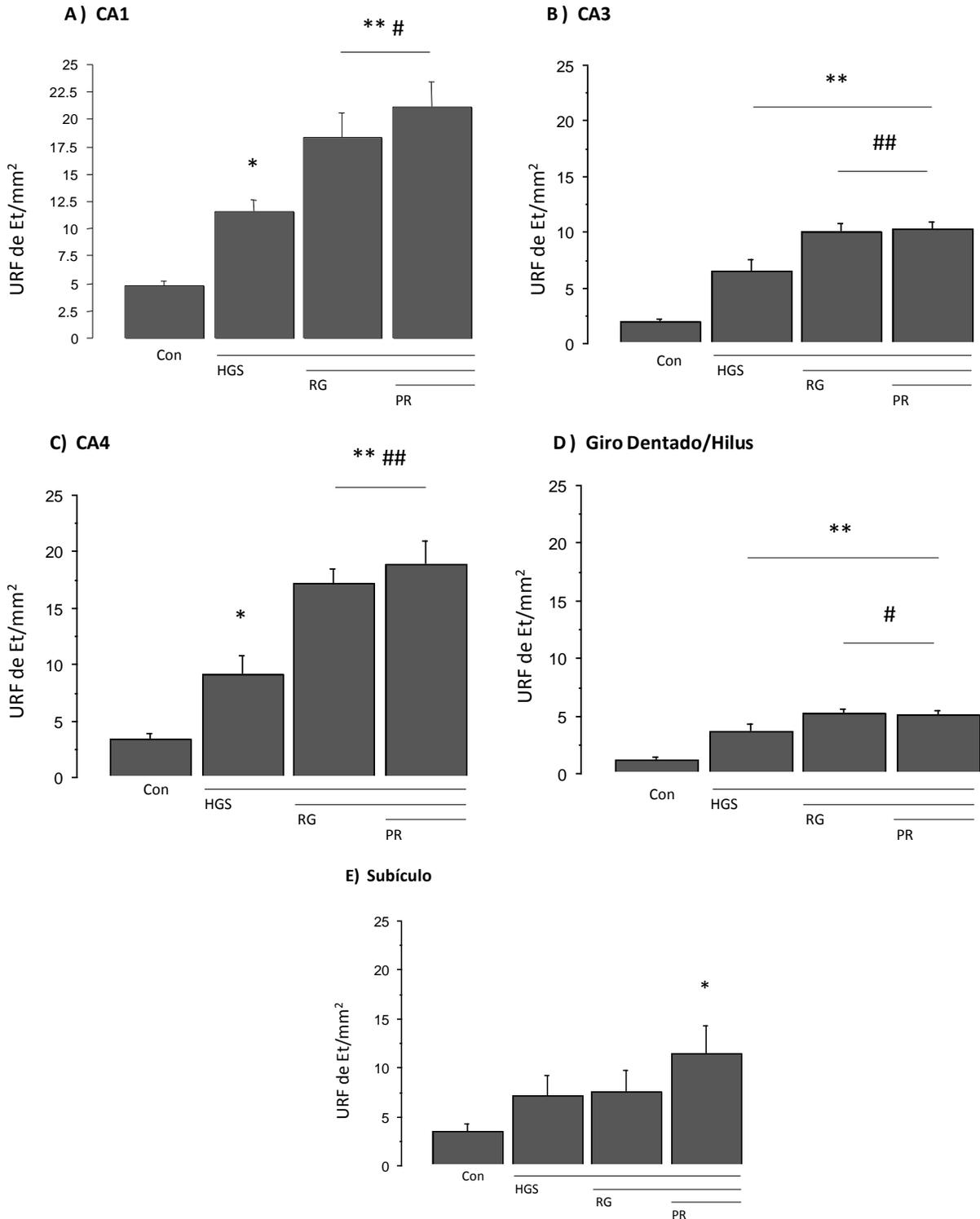
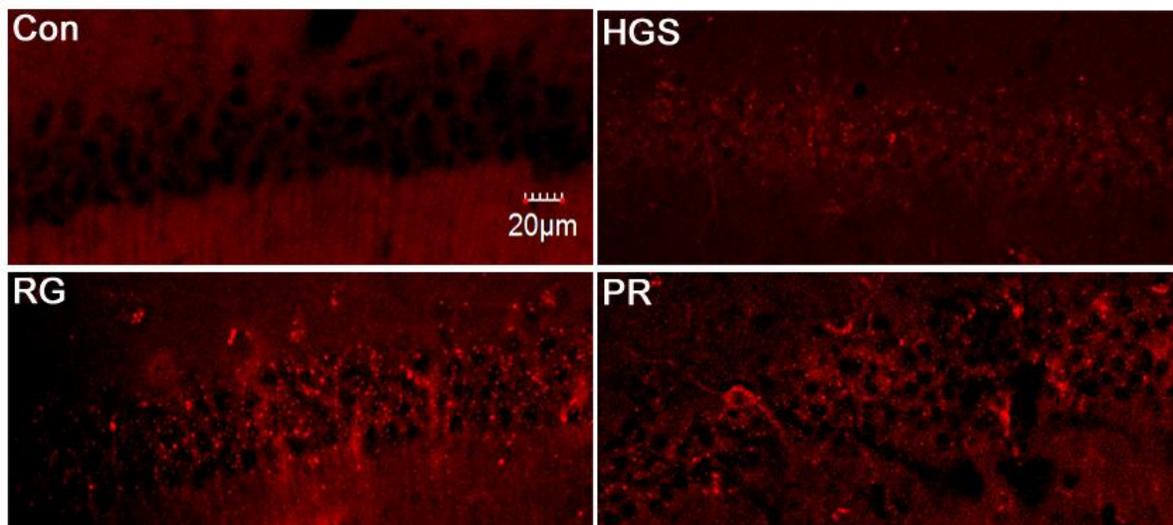


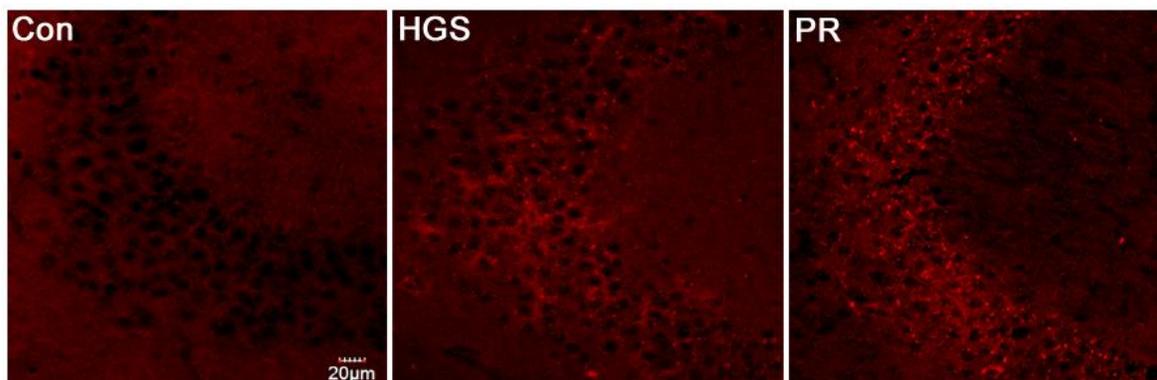
Figura 20. Fluorescencia de Et en los niveles posteriores del hipocampo: -1.34 mm, -1.82 mm y -2.30 mm a partir de Bregma en las distintas regiones del hipocampo. Cuantificación de la intensidad de las URF de Et de animales sometidos los diferentes tratamientos. Los datos son la suma total de los distintos niveles. El conteo de la fluorescencia emitida por el Et se llevó a cabo como se describe en la figura 18. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher. **p<0.001 y *p<0.05 respecto al grupo control. ##p<0.001 y #p<0.05 respecto al grupo de HGS.

Ya que los datos de fluorescencia están corregidos por área, es posible comparar la producción de ERO en las distintas regiones del hipocampo. Como puede observarse CA1 y CA4 son las regiones que presentan una mayor producción de ERO, incluso desde los niveles basales (Figura 20). Además, ambas regiones son altamente sensibles a la reintroducción de glucosa, ya que el grupo reintroducción presentó niveles de fluorescencia con un mayor incremento con respecto al grupo sin reintroducción de glucosa (HGS) en estas regiones. La pérdida del reflejo de enderezamiento no tuvo efecto sobre la producción de ERO en ninguno de los grupos experimentales.

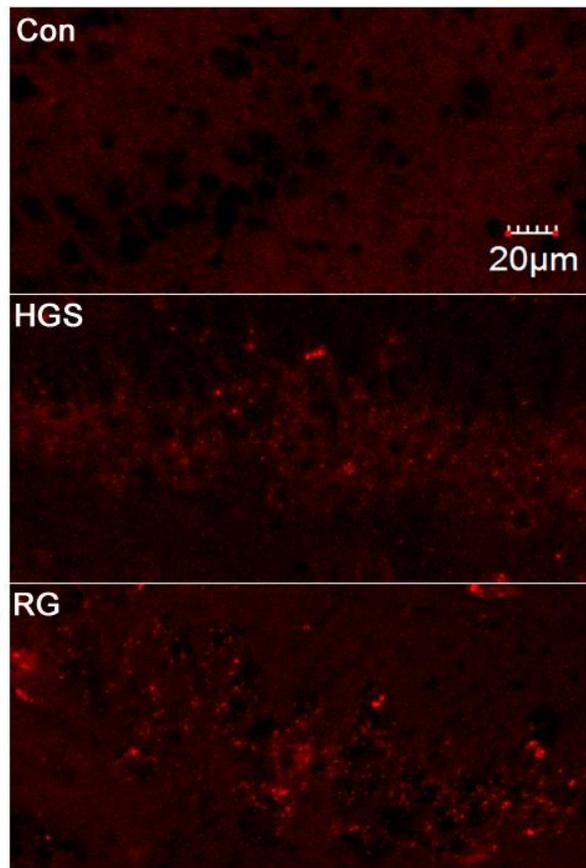
A)



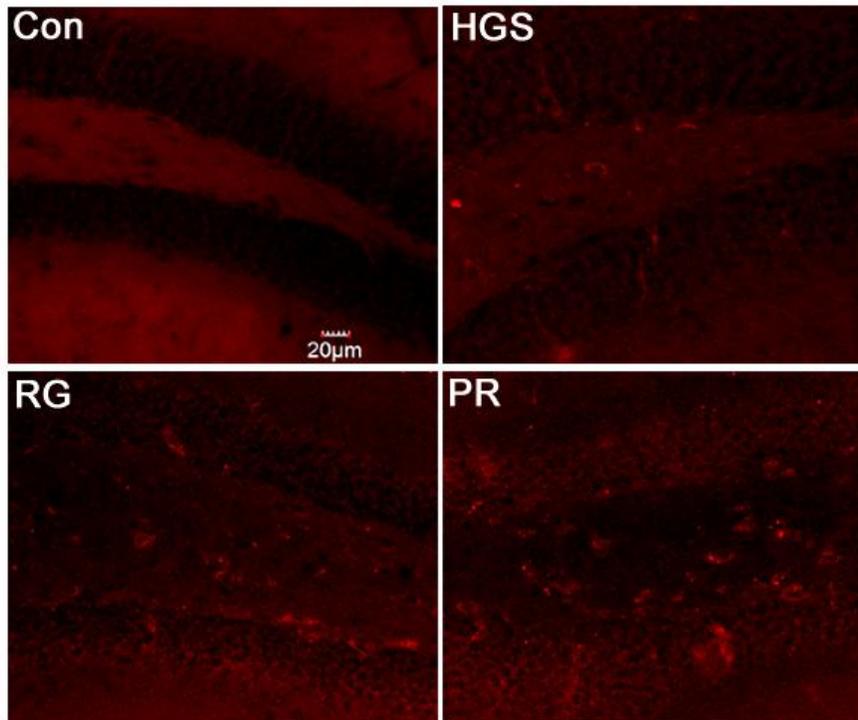
B)



C)



D)



E)

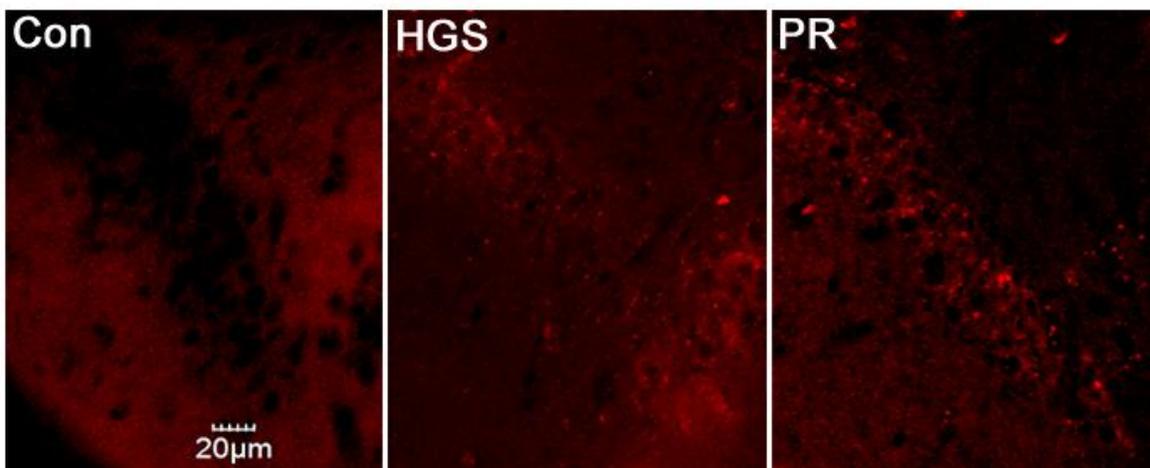


Figura 21. Micrografías representativas del análisis de la fluorescencia de Et en las diferentes regiones del hipocampo después de un evento de hipoglucemia severa. **A)** CA1, **B)** CA3, **C)** CA4, **D)** Giro dentado/Hilus y **E)** Subículo, en el grupo control (Con), los animales con hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (HGS) y con reintroducción de glucosa (RG) y los animales además de la reintroducción de glucosa tuvieron pérdida del reflejo de enderezamiento (PR). La fluorescencia de Et se observó principalmente en el citoplasma de las células corticales, inmediatamente o 24 h después de la hipoglucemia severa. Las imágenes fueron tomadas a la misma magnificación (barra = 20µm), bajo un microscopio confocal. CA1, CA3 y CA4, *Cornu Ammonis* 1 – 4, respectivamente.

% DE INCREMENTO DE FLUORESCENCIA					
Respecto al grupo control					
	CA1	CA3	GD/HI	CA4	Sub
HGS	141.2 % *	232 % *	201 % *	169 % *	107 %
RG	282 % *	402 % *	332 % *	404 % *	149 %
PR	340.3 % *	425 % *	322 % *	487 % *	231 % *
Respecto al grupo de HGS					
	CA1	CA3	GD/HI	CA4	Sub
RG	58.3 % *	51 % *	43 % *	87 % *	21 %
PR	82.7 % *	58 % *	40 % *	118 % *	60 %
Respecto al grupo RG					
	CA1	CA3	GD/HI	CA4	Sub
PR	15.4 %	4.6 %	---	16.5 %	33 %

Tabla 2. Por ciento de incremento de la fluorescencia del Et en los distintos grupos experimentales. CA1-CA4 Cuerno de Ammon 1-4, GD/HI giro dentado e hilus, Sub subículo, HGS hipoglucemia severa, RG grupo con hipoglucemia severa y reintroducción de glucosa, PR grupo con el mismo procedimiento del grupo RG pero con pérdida del reflejo.

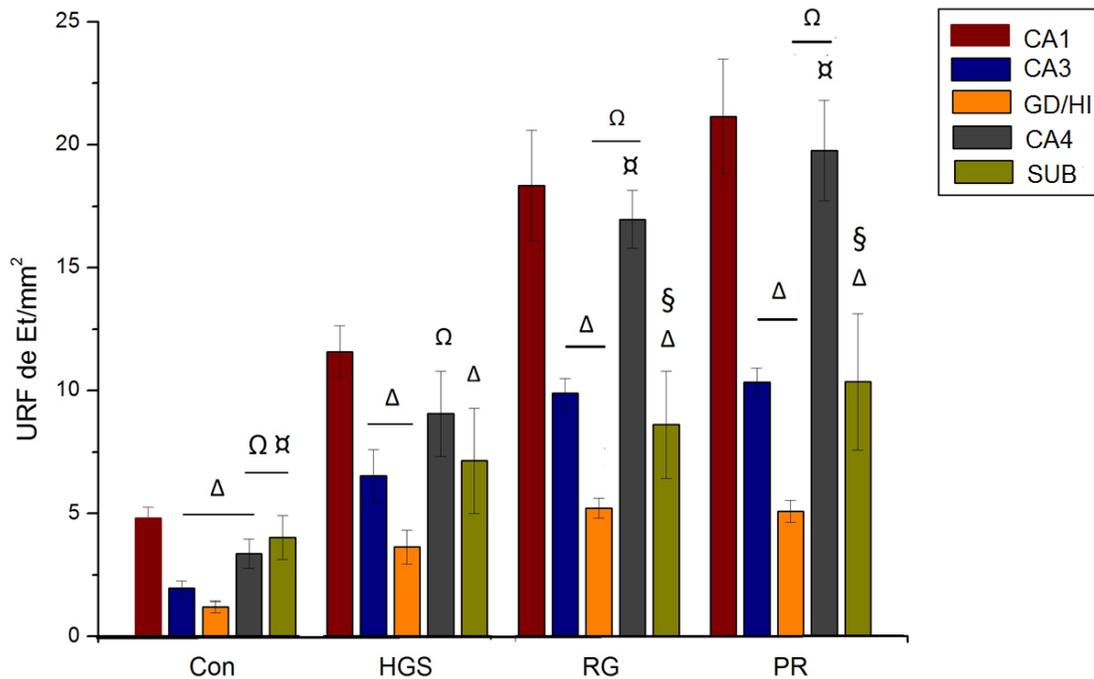


Figura 22. Intensidad en la fluorescencia de Et en las distintas subregiones del hipocampo en cada uno de los tratamientos (Con, control; HGS hipoglucemia severa; RG reintroducción de glucosa; PR pérdida del reflejo de enderezamiento). Cuantificación de la intensidad de las URF de Et de animales sometidos a los distintos tratamientos. Los datos son la suma total de los distintos niveles. El conteo de la fluorescencia emitida por el Et se llevó a cabo como se describe en la figura 19. Cada barra representa la media \pm SEM (n= 4-7). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher. Δ p<0.05 contra CA1; Ω p<0.05 contra CA3; $\♂$ p<0.05 contra GD/Hi; \S p<0.05 contra el CA4. CA1, CA3 y CA4, *Cuerno de Ammon 1, 3 y 4*, respectivamente; GD/Hi, *giro dentado/hilus*; SUB, *subículo*.

Muerte neuronal asociada a la hipoglucemia severa

Posteriormente se llevó a cabo la tinción de Fluoro-Jade B (FJB) para detectar a las neuronas en proceso de neurodegeneración (FJB⁺). En los animales con HGS que no fueron rescatados con glucosa y que se sacrificaron inmediatamente después de la HGS, no se observaron neuronas FJB⁺ en la corteza cerebral, el cuerpo estriado o en las distintas regiones del hipocampo (datos no mostrados) al igual que el grupo control. En los animales rescatados con la RG únicamente se observaron escasas neuronas FJB⁺ (Tabla 3) en cuatro de 15 animales, distribuidas tanto en la corteza cerebral como en el cuerpo estriado y ninguna en el hipocampo. Por lo tanto, no encontramos una relación entre la producción de ERO y la muerte neuronal (Figura 23).

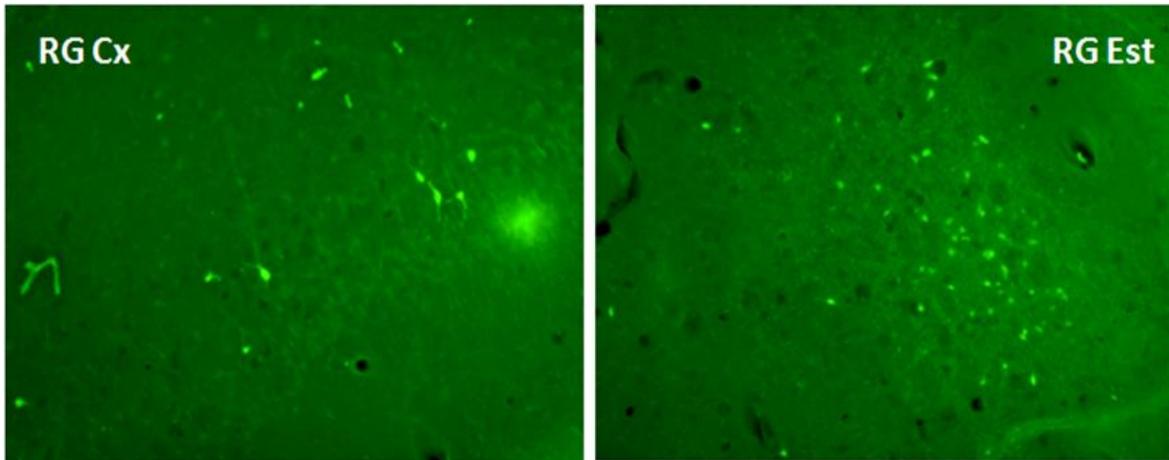


Figura 23. Cuantificación de células FJB⁺ a las 24 h post-insulina. En las imágenes se representan las células FJB⁺ después de un evento hipoglucémico con RG. Las imágenes fueron capturadas a un aumento de 10x bajo un microscopio de epifluorescencia. La imagen del lado izquierdo muestra la Cx somatosensorial y la imagen del lado derecho muestra el cuerpo estriado.

Neuronas FJB+															
Cx	0	3	2	0	41	0	0	3	24	0	0	38	0	0	0
Est	0	0	24	0	8	0	0	0	89	0	0	0	0	0	0

Tabla 3. Conteo total del número de neuronas teñidas con Fluoro-jade B, en los grupos con RG a las 24 de la inducción de hipoglucemia severa.

VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la producción de ERO se incrementa significativamente durante la hipoglucemia severa y con la RG en diferentes regiones cerebrales del ratón, en un modelo de hipoglucemia en ausencia de coma. Observamos que la oxidación de DHE en el cerebro del ratón hipoglucémico se presentó inmediatamente después de un periodo de 3h de hipoglucemia severa en ausencia de isoelectricidad. Estos datos concuerdan con un estudio previo que muestra un incremento de la peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro de ratón, después de 2 h de hipoglucemia severa asociada con niveles de glucosa sanguínea por debajo de 20 mg/dl (o $<1\text{mM}$) (Patočková et al., 2003). De manera similar, en un trabajo previo reportamos que en ratas con hipoglucemia severa (glucosa por debajo de 20 mg/dl por más de 3 h), incrementó la lipoperoxidación en la corteza, el hipocampo y el estriado, al ser evaluada en cerebros obtenidos antes de que los animales presentaran isoelectricidad (Haces et al., 2010). Por otra parte, Singh y colaboradores (2004), también observaron un incremento de la lipoperoxidación después de 3 h de hipoglucemia severa, en los hemisferios cerebrales y el diencefalo de ratas. Este incremento se acompañó de una disminución en los niveles de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD), un incremento en los niveles de la glutatión peroxidasa y una disminución en el contenido de glutatión reducido, sugiriendo cambios en la defensa antioxidante. Además, McGowan y colaboradores (2006), observaron incremento en la producción mitocondrial de superóxido y peróxido de hidrogeno en el cerebro de lechones después de someterlos a un periodo de 2 h de hipoglucemia severa (1 mM). Estos datos en conjunto sugieren la inducción de ERO o ERN durante el periodo de hipoglucemia severa en ausencia de isoelectricidad.

Diversos estudios han reportado que la corteza cerebral es una de las regiones más vulnerables al daño oxidante y a la muerte neuronal inducida por la hipoglucemia. Sin embargo, no se conoce si hay una producción diferencial de ERO en las distintas áreas de la corteza. Puesto que las diferentes áreas de la corteza están relacionadas a diversas funciones, resulta de gran interés conocer la relación entre el estrés oxidante y la vulnerabilidad hipoglucémica en las subregiones corticales. Por otro lado, el hipocampo es una región importante en los procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, por lo que las personas que sobreviven a un coma hipoglucémico pueden presentar alteraciones cognitivas significativas (Suh et al., 2007b). De acuerdo con los presentes resultados, la hipoglucemia estimula la producción de especies

reactivas en todas las regiones estudiadas (corteza, estriado e hipocampo). La mayoría de las áreas corticales examinadas, así como el estriado, mostraron un incremento cercano al 100%. En contraste, se observó un incremento mayor al 100 % en las diferentes subregiones del hipocampo y en algunas de ellas como en la región CA₃ y el GD/HI, los incrementos fueron cercanos al 200%. Los mecanismos que conducen a la generación de ERO durante el periodo hipoglucémico no han sido completamente dilucidados. Las especies reactivas pueden generarse como consecuencia de un mecanismo de excitotoxicidad, ya que la entrada de calcio estimula la producción de ERO mitocondriales y activa sistemas enzimáticos productores de ERO como la xantina oxidasa (XaO), la fosfolipasa A₂ (cPLA₂) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Coyle y Puttfarcken, 1993; Lafón-Cazal et al., 1993). Por otra parte, recientemente se ha sugerido que la NADPH oxidasa también participa en la producción de ERO inducida por la excitotoxicidad (Brennan et al., 2009). En un estudio previo en cultivo de neuronas de hipocampo observamos que la privación de glucosa estimula la generación de ERO de forma dependiente de calcio a través de la activación de diferentes vías enzimáticas, tales como la NOX, cPLA₂, XaO (Páramo et al., 2010). Falta por investigar si estos sistemas podrían contribuir a la producción de ERO observada durante el periodo de hipoglucemia en modelos *in vivo*, y si su activación podría resultar de la activación de los receptores a glutamato. En este sentido podría estudiarse el efecto de la administración i.p de antagonistas de los receptores a glutamato e investigar una posible reducción de la producción de ERO. Por otra parte, la contribución de la mitocondria a la producción de ERO durante el periodo de hipoglucemia se sugirió en el estudio de McGowan y colaboradores (2006), quienes encontraron un incremento en la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno en mitocondrias de cerebro de lechones sometidos a hipoglucemia severa sin coma. Previamente, Bardwaj y su equipo de trabajo (1998) encontraron una disminución en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, y estudios *in vitro* han sugerido la producción de ERO mitocondriales en neuronas cultivadas durante la ausencia de glucosa (Isaev et al., 2008).

La producción diferencial de ERO en regiones discretas del cerebro no se había estudiado previamente. Nuestros resultados demuestran que las ERO se producen de manera diferencial durante el periodo de hipoglucemia, siendo las regiones CA₃ y GD/Hilus del hipocampo las que mostraron un aumento mayor, cercanos al 200% respecto a los niveles basales. El papel de las especies producidas durante este periodo en la muerte neuronal no se ha estudiado en modelos *in vivo*, pero se conoce que la muerte neuronal subsecuente a la hipoglucemia ocurre de manera

retardada durante las siguientes horas o días después de la RG en animales que muestran un periodo de isoelectricidad de al menos 30 minutos (Auer et al., 1984; 1986; Suh et al., 2003). Por tanto, se ha sugerido que la muerte no es únicamente la consecuencia de la falla energética sino de procesos que ocurren después de la RG. El grupo de animales sometido a HGS sin RG no presentó células positivas a FJB puesto que el tejido se extrajo 3 h después de la hipoglucemia, tiempo en el que la muerte neuronal todavía no ocurre. Sin embargo, de acuerdo a la distribución del daño subsecuente al coma que ha sido reportado en el cerebro de la rata, las áreas más vulnerables son CA₁ y el GD, mientras que CA₃ es menos susceptible (Auer et al., 1984; 1986; Suh et al., 2003). Sin embargo, en este estudio encontramos un aumento muy importante de la producción de ERO en la región de CA₃, por lo que podemos concluir que la distribución de ERO observada durante el período hipoglucémico en el hipocampo del ratón no coincide exactamente con la distribución diferencial de la muerte neuronal previamente observada en las ratas hipoglucémicas. Más investigación es necesaria para comparar la vulnerabilidad diferencial al daño hipoglucémico en el cerebro de ratones y ratas y su relación con la producción de ERO.

En cuanto a la corteza cerebral no se han reportado datos acerca de la vulnerabilidad diferencial de las distintas áreas corticales, aunque sí se conoce que son las capas superficiales e intermedias de la corteza (capas 2 y 3), las más vulnerables a la muerte neuronal, en relación a las capas más profundas (capas 5 y 6) (Auer et al., 1984b; 1985a). En el presente estudio encontramos que todas las áreas corticales examinadas mostraron un incremento en la fluorescencia del Et después de un periodo de hipoglucemia severa de 2.5-3 h y ésta se presentó en las capas intermedias de la corteza. En el estriado también se observó la producción de ERO, lo cual concuerda con la vulnerabilidad de estas regiones cerebrales al daño hipoglucémico, reportado previamente (Auer et al., 1984b). Aunque se ha reportado a la región dorso-lateral la zona del estriado que presenta más células dañadas (Auer et al., 1984b). En este estudio las células fluorescentes se encontraron en todo el estriado sin poderse establecer una región en particular. A partir de estos datos podemos concluir que la distribución de las ERO en el cerebro del ratón, no corresponde a la distribución de la muerte neuronal previamente reportada en la rata.

Las causas de una producción diferencial de ERO en el periodo de hipoglucemia en el cerebro del ratón no fueron estudiadas en este trabajo, pero en estudios futuros sería importante conocer si ésta podría explicarse por diferencias en la expresión de los sistemas productores de ERO, como los mencionados arriba o por diferencias en la respuesta antioxidante, en regiones discretas o subregiones del cerebro (ver más adelante). Por otra parte, son necesarios más

estudios para conocer si las ERO generadas durante el episodio hipoglucémico en el cerebro del ratón involucra la activación de los receptores a glutamato.

Con el fin de estudiar el impacto de la RG en la producción de ERO, rescatamos a los ratones hipoglucémicos con la administración de glucosa (grupos RG y PR) y cuantificamos la fluorescencia del Et 24 h después. Se observó que la RG estimuló la producción de ERO particularmente en el hipocampo. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos sugiriendo que la producción de ERO principalmente ocurre durante la RG después de un período del cese de la actividad eléctrica cerebral (Suh et al., 2007b). En contraste con el hipocampo, solamente algunas regiones corticales mostraron mayor fluorescencia del Et después de la RG, en particular, la corteza somatosensorial y la retrosplenial en el grupo PR. Estos resultados sugieren que estas áreas corticales son más vulnerables a la hipoglucemia severa prolongada seguida de la RG. La producción de ERO después de la RG se ha atribuido a la activación de la NOX. La oxidación de la glucosa a través del ciclo de las pentosas fosfato produce NADPH, estimulando la actividad de la NOX (Suh et al., 2007b). Apoyando esta hipótesis se ha reportado que la producción de superóxido en la región de CA1 se reduce en ratones deficientes en NOX sometidos a hipoglucemia en presencia de coma, así como en neuronas corticales cultivadas expuestas a un medio libre de glucosa (Suh et al., 2007b). En estudios futuros podría determinarse si la activación de la NOX está relacionada particularmente con el incremento en la producción de ERO observada en las cortezas somatosensorial y retrosplenial después de la RG en el modelo de hipoglucemia sin coma utilizado en este trabajo.

La presencia de la NOX ha sido determinada por inmunocitoquímica en las neuronas piramidales e interneuronas de la neocorteza del ratón, incluyendo las cortezas motora y somatosensorial (Serrano et al., 2003). De manera similar, la actividad de la NOX podría ser la responsable de la generación de ERO en las diferentes subregiones del hipocampo, como previamente se observó en la región CA1 (Suh et al., 2007b). Estudios de inmunocitoquímica sugieren la presencia de las subunidades citosólicas y membranales de la NOX tanto en CA1 como en CA3 del hipocampo de ratón (Serrano et al., 2003). Sin embargo, es la región CA1 y no la CA3 la más susceptible al daño neuronal hipoglucémico, por lo que el papel de las ERO producidas en esta región está por determinarse.

En el estriado la RG también estimula la generación de ERO en los ratones hipoglucémicos. En un trabajo reciente hemos reportado que la administración de una dosis tóxica de glutamato induce la producción de superóxido y muerte neuronal en una forma

dependiente de la actividad de NOX en esta región cerebral. La inhibición de la enzima reduce la muerte celular y la fluorescencia de Et y los ratones deficientes en la isoforma NOX₂ de la enzima son más resistentes a la toxicidad de glutamato, sugiriendo la participación de esta isoforma de la NOX en el daño excitotóxico (Guemez-Gamboa et al., 2011). La subunidad catalítica de NOX₂, gp91, está presente en el cuerpo estriado del ratón y ha sido localizada en las neuronas espinosas medianas, que son las neuronas más abundantes en esta región (Serrano et al., 2003; Guemez-Gamboa et al., 2011). Por lo tanto, NOX₂ podría tener una contribución a la producción de ERO en esta región en las presentes condiciones experimentales. De estos resultados podemos especular que una diferente expresión y/o activación de la NOX durante la RG podría ser la responsable de la distinta producción de ERO en el cerebro del ratón.

Por otra parte, la expresión diferencial de otras enzimas como la XaO y la cPAL₂, podrían tener también una contribución a la producción de ERO durante la RG. Esta posibilidad no se ha estudiado a la fecha. La expresión de la cPLA₂ se ha observado en las neuronas de CA1-CA₃, las células del giro dentado y la corteza cerebral, y su expresión se regula hacia arriba después de la isquemia en las células del GD y de CA1-CA₃ (Muralikrishna y Hatcher, 2005). Sería importante estudiar los posibles cambios en el nivel de expresión de esta enzima en las distintas regiones del hipocampo y de la corteza después de la hipoglucemia. Por otro lado, la generación de ERO es inhibida al bloquear los receptores NMDA de glutamato en neuronas de hipocampo cultivadas (Páramo et al., 2010), por lo que sería importante determinar si la producción de ERO durante la RG depende o no de la activación de los receptores a glutamato administrando sus antagonistas en esta etapa.

Una respuesta antioxidante diferencial también podría explicar la producción diferencial de ERO en las distintas regiones cerebrales. En el SNC, la SOD se expresa ampliamente en las neuronas piramidales y granulares del hipocampo, las neuronas corticales y las neuronas motoras de la médula espinal (Peluffo et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que estos niveles de SOD disminuyen después de una lesión excitotóxica (Peluffo et al., 2005). La glutatión peroxidasa (GPx) incrementa durante la hipoglucemia, mientras que la concentración de glutatión reducido (GSH) disminuye en los hemisferios cerebrales en los animales hipoglucémicos (Singh et al., 2004). El glutatión es uno de los principales antioxidantes en el cerebro, por lo que el cambio en el cociente de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) puede ser determinante en el control del estrés oxidante. En un estudio reciente Cardoso y colegas (2010), estudiaron el efecto de la hipoglucemia aguda (niveles de glucosa 33 mg/dl durante 1 h) en el metabolismo energético

cerebral y el estado oxidante mitocondrial en animales diabéticos tratados con estreptozotocina. Observaron un aumento en la lipoperoxidación en las mitocondrias corticales pero no hipocampales en los animales diabéticos hipoglucémicos comparados con el grupo control. Además, las mitocondrias corticales mostraron una disminución en el cociente GSH/GSSG y en la actividad de la glutatión reductasa (GR), mientras que la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y la SOD dependiente de manganeso aumentaron (MnSOD). En contraste con la corteza, en las mitocondrias hipocampales no se observaron cambios significativos en la lipoperoxidación y en la actividad de GR y la GPx, mientras que la actividad de la MnSOD disminuyó. Estas observaciones sugieren una respuesta antioxidante diferencial a la hipoglucemia severa en animales diabéticos mostrando la corteza los cambios más evidentes. Falta por determinar si cambios diferenciales en la defensa antioxidante podrían explicar la producción diferencial de ERO observada en el presente estudio. Por otra parte, Bhardwaj y colaboradores (1998), estudiaron la respuesta antioxidante en animales tratados con insulina llegando a concentraciones sanguíneas de glucosa de 40 mg/dl. Encontraron que la GPx aumenta significativamente en los hemisferios cerebrales, mientras que la GR disminuyó. Más aún, la hipoglucemia incrementó los niveles de catalasa y de SOD en los hemisferios cerebrales. Más investigaciones son necesarias para entender si una respuesta antioxidante diferencial puede explicar la vulnerabilidad de las diferentes regiones del cerebro ante el daño neuronal hipoglucémico.

Estudios previos en la rata han sugerido que la corteza cerebral es una de las regiones más vulnerables a la muerte neuronal inducida por la hipoglucemia, aún en ausencia de coma (Tacks et al., 2005; Ennis et al., 2008; Haces et al., 2010). En estos estudios se observó muerte neuronal discreta en la corteza cerebral, principalmente en la corteza frontal, temporal, parietal e insular. Datos recientes de nuestro grupo sugieren que la corteza frontal, parietal y temporal son las que presentan un mayor número de neuronas en degeneración en las ratas hipoglucémicas en ausencia de coma (Amilpas et al., datos sin publicar). En el presente estudio, la relación entre la producción de ERO y la muerte neuronal no pudo determinarse, ya que muchos de los animales antes de caer en la PR, presentaron crisis epilépticas. La mitad de los animales que mostraron neurodegeneración presentaron paroxismos o crisis tónicas de unos cuantos minutos por lo que tuvieron que descartarse del análisis. En los animales que no presentaron crisis, básicamente no se encontraron células marcadas con Fluoro-Jade, por lo que aparentemente en el ratón,

a diferencia de lo observado en la rata, no se presenta muerte neuronal por la hipoglucemia prolongada en ausencia de coma.

Los presentes resultados demuestran que la producción de ERO ocurre como una consecuencia de la reducción sostenida de los niveles de glucosa, independientemente de los eventos asociados con el periodo de isoelectricidad o con la RG. La RG incrementa esta producción en muchas regiones cerebrales, principalmente en el hipocampo, el estriado y sólo en algunas áreas corticales. Es posible que los sistemas productores de ERO y la respuesta antioxidante sean distintos en el periodo de hipoglucemia y en el de RG.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La producción diferencial de ERO en regiones discretas del cerebro inducida por la hipoglucemia no se había estudiado hasta el momento. El presente trabajo ofrece evidencia de una producción diferencial de ERO en el cerebro del ratón, así como un impacto diferente de la RG sobre la producción de ERO. Si bien, Suh y colaboradores (2007b), encontraron que las regiones CA₁ y GD son las más vulnerable al daño, en un modelo de coma hipoglucémico, en el presente estudio encontramos que la región CA₃ presenta una gran cantidad de ERO, tanto en los animales sometidos a HGS sin reintroducción como a los que recibieron RG. Es por tanto importante investigar los factores que intervienen en el daño en esta región.

Como ya se mencionó antes, una perspectiva importante de este trabajo es el estudio de las posibles rutas que dan lugar a las ERO en las distintas regiones del cerebro, así como la respuesta antioxidante. Para esto podrían utilizarse modelos transgénicos de animales deficientes en sistemas específicos productores de ERO, como los deficientes en NOX, XaO ó PLA₂ y con un enfoque farmacológico con inhibidores de estos sistemas.

El estudio de los procesos que tienen lugar durante la hipoglucemia severa y después de la RG puede ayudar a estimar las consecuencias de la hipoglucemia en pacientes diabéticos expuestos a un control estricto de la glucemia, los cuales pueden presentar episodios repetidos de hipoglucemia moderada e incluso de hipoglucemia severa acompañada de coma. Puesto que las diferentes áreas de la corteza están relacionadas a funciones específicas, es de gran interés encontrar si el daño a un área cortical específica puede relacionarse con los cambios en la función cognitiva que se han encontrado en pacientes diabéticos sometidos a periodos de hipoglucemia severa (Xu et al., 2011; Amiel, 1998; Warren y Frier, 2004). En este sentido sería importante conocer el impacto de la producción de ERO en el desempeño cognitivo de animales expuestos a episodios repetidos de hipoglucemia.

X. REFERENCIAS

- Acker T y Acker H (2004). Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Experimental Biology*, 2007:3171-3188.
- Agardh CD, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö K (1981). Hypoglycemic brain injury: Metabolic and structural findings in rat cerebellar cortex during profound insulin induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1:71-84.
- Amaral AI (2012). Effects of hypoglycaemia on neuronal metabolism in the adult brain: role of alternative substrates to glucose. *J Inherit Metab Dis*, 30:1-14.
- Amiel S (1998). Cognitive function testing in studies of acute hypoglycaemia: Rights and wrongs. *Diabetologia*, 41, 713-719.
- Arundine M, Tymianski M (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34:325-337.
- Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK (1984a). Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: A quantitative study. *Diabetes*, 33:1090-1098.
- Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK (1984b). The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathologica*, 64:177-191.
- Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK (1985a). The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathologica*, Springer, 67:13-24.
- Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö K (1985b). The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathologica*, 67:25-36.
- Auer RN (1986). Progress review: Hypoglycemic brain damage. *Stroke*, 17:699-708.
- Auer NR (2004). Hypoglycemic brain damage. *Forensic Science International*, 146:105-110.
- Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells*, 32:491-509.
- Bakatselos SO (2011). Hypoglycemia unawareness. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93S: S92-S96.
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti P (2011). Brain energy metabolism: Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, 14:724-738.
- Beall C, Ashford ML, McCrimmon RJ (2011) The physiology and pathophysiology of the neural of the counterregulatory response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302:R215-223.
- Bhardwaj SK, Sharma ML, Gulati G, Chhabra A, Kaushik R, Sharma P, Kaur G (1998). Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Mol Chem Neuropathol*, 34:157-68.
- Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: Selective imaging with hydroethidine. *J Neuroscience*, 16:1324-1336.
- 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.
- Bondy SC, Lee DK (1992). Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Research*, 610: 229-233
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimham P, Kauppinen TM, Lee H, Ending Y, Chan PH, Swanson RA (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci*, 12:857-863.
- Brodal Per (1998). *The Central Nervous System: Structure and Function*. 2a ed. Oxford University Press, Inc. US.
- Brown AM, Ransom BR (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *GLIA*, 55: 1263-1271.
- Brown AM, Sickmann HM, Fosgerau K, Lund TM, Schousboe A, Waagepetersen HS, Ransom BR (2005). Astrocyte Glycogen Metabolism is Required for Neural Activity During Aglycemia or Intense Stimulation in Mouse White Matter. *J Neuroscience Research*, 79:74-80.
- Butcher SP, Sandberg M, Hagberg H, Hamberger A (1987a). Cellular origins of endogenous amino acids released into the extracellular fluid of the rat striatum during severe insulin-induced hypoglycemia. *J Neurochem*, 48:722-8.
- Butcher SP, Lazarewicz JW, Hamberger A (1987b). In vivo microdialysis studies on the effects of decortications and excitotoxic lesions on kainic acid-induced calcium fluxes, and endogenous amino acid release, in the rat striatum. *J Neurochem*, 49:1355-60
- Butler TR, Self RL, Smith KJ, Sharrett-Field LJ, Berry JN, Littleton JM, Pauly JR, Mulholland PJ, Prendergast MA (2010). Selective vulnerability of hippocampal cornu ammonis 1 pyramidal cells to excitotoxic insult is associated with the expression of polyamine-sensitive N-Methyl-D-aspartate-type glutamate receptors. *Neuroscience*, 165: 525-534.
- Cardoso S, Santos MS, Seíça R, Moreira PI (2010). Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802:942-951.
- Choeiri C, Staines W, Miki T, Seino S, Messier C (2005). Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience*, 130:591-600.
- Choi DW (1994). Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci*, 15:162-71.
- Choi I, Lee S, Kim S, Gruetter R (2001). In vivo measurements of brain glucose transport using the reversible Michaelis-Menten model and simultaneous measurements of cerebral blood flow changes during hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21:653-663.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262:689-95.
- Cooper GM, Hausman RE (2004). *The Cell: A molecular approach*. 3a ed. Sinauer Associated, Inc. Washington, USA.
- Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, 320:1-11.
- Cryer PE (2002). Hypoglycaemia: The limiting factor in the glycaemic management of type I and type II diabetes. *Diabetologia*, 45:937-948.

- Cryer PE (2006). Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 116:1470-1473.
- Cryer PE (2007). Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *The Journal of Clinical Investigation*, 117:868-870.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*, 369:131-135.
- Diedrich L, Sandoval D, Davis S (2002). Hypoglycemia associated autonomic failure. *Clin Auton Res*, 12:358-365.
- Ennis K, Tran PV, Seaquist ER, Rao R (2008) Postnatal age influences hypoglycemia-induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res*, 1224:119-126.
- Estrada SAM, Mejía-Toiber J, Massieu L (2008). Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Archives Of Medical Research*, 39:265-276.
- Ferrand-Drake M, Zhu C, Gildö G, Hansen AJ, Karlsson JO, Bahr BA, Zamzami N, Kroemer G, Chan PH, Wieloch T, Blomgren K (2003). Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem*, 85:1431-42
- Finkel T, Holbrook NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239-47.
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F (2009). Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*, 49:835-842.
- 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. *J Neurosci*, 18:5151-9.
- Fugioka M, Okuchi K, Hiramatsu KI, Sakaki T, Sakaguchi S, Ishii Y (1997). Specific changes in human brain after hypoglycemic injury. *Stroke*, 28:584-7.
- García O, Massieu L (2004). Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch Neurocién*, 1:39-46.
- Gibson G, Diemel G (2007). Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. Brain energetic. Integration of molecular and cellular processes. Springer Science+Business Media, LLC, USA.
- Groemping Y, Rittinger K (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*, 386:401-416.
- Guemez-Gamboa A, Estrada SAM, Montiel T, Páramo B, Massieu L, Morán J (2011). Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70:1020-1035.
- 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.
- Haces del Blanco M, Massieu TL (2005). Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Arch Neurocién*, 10:83-91.
- Halliwell B (1992). Reactive Oxygen species and the central nervous system. *J Neurochemistry*, 59:1609-1619.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free radicals in Biology and Medicine. 3a edición, Oxford University Press.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001). Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemical Society*, 29:345-350.
- Hansberg TW (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico, vol. XXVI, UNAM.
- Henneberry RC (1989). The role of neuronal energy in the neurotoxicity of excitatory amino acids. *Neurobiology of aging*, 10: 611-613.
- Hernández GD, Wood DC, Castro OS, Covarrubias L (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology and Medicine*, 49:130-143.
- Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL (2006). NADPH oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function. *Antioxidants and Redox signaling*, 8:1583-1596.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Plotnikov EY, Kuvshinova EA, Zorov DB (2008). Mitochondrial free radical production induced by glucose deprivation in cerebellar granule neurons. *Biochemistry Mosc*, 73:149-155.
- Joseph A, Antony S, Paulose CS (2008). Increase glutamate receptor gene expression in the cerebral cortex of insulin induced hypoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*, 156:298-304.
- Kalimo H, Auer RN, Siesjö BK (1985). The temporal evolution hypoglucemic brain damage. III. Light and electron microscopic findings in the rat caudoputamen. *Acta Neuropathologica*, Springer, 67:37-50.
- Kandel E, Schwartz J (1985). Principles of neural science. 2ª ed. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Kurman H, Lim H, Vasant S, Kim B, Koppula S, Kim I, Choi D (2012). The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: Convergence and Parallelism. *Int J Mol Sci*, 13:10478-1050
- Lacherade JC, Jacqueminet S, Preiser JC. (2009). An overview of hypoglycemia in the critically ill. *Diabetes Science and Technology*, 3:1242-1249.
- Lafon CM, Pietri S, Culcasi M (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364:535-37.
- Lau A, Tymianski M (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Physiol Rev*, 90:525-542
- Lodish H, Berk A, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Bretscher, Ploegh H, Matsudaira P (2008). Molecular cell biology. 6a ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- Massieu L, Del Rio P, Montiel T. (2001). Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience*, 106:669-677.
- Magistretti P, Pellerin L (1999). Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 354:1155-1163.
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *The FASEB Journal*, 8:1003-1011.
- Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications, 12:5-18.

- McCall AL (2004). Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*, 490:147-158.
- McGowan JE, Chen L, Gao D, Trush M, Wei C (2006). Increased mitochondrial reactive oxygen species production in newborn brain during hypoglycemia. *Neuroscience Letters*, 399:111-114.
- Mohseni Simin (2001). Hypoglycemic neuropathy. *Acta Neuropathol*, 102:413-421.
- Muralikrishna R, Hatcher JF (2005). Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radical Biology & Medicine*, 40:376-387.
- Nehling A (1997). Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: Changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia. *Diabetes & Metabolism*, 23:18-29.
- Nelson DL y Cox MM (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. 4th Edition. W.H. Freeman and company, USA.
- Nellgard B, Wieloch T (1992). Cerebral protection by AMPA- and NMDA-receptor antagonists administered after severe insulin-induced hypoglycemia. *Exp Brain Res*, 92:259-66.
- Oehmichen M, Auer RN, König HG (2006). *Forensic neuropathology and associated neurology*. Springer, Germany
- 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.
- Pasantes H, Sánchez J, Tapia R (1991). *Neurobiología celular*. Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. México.
- Patočková J, Marhol P, Tumova E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkowska J, Andel M (2003). Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res*, 52:131-135.
- Paxinos G, Franklin KJ. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA. Elsevier Academic Press.
- Peluffo H, Acarin L, Faiz M, Castellano B, Gonzalez B. (2005). Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury. *J Neuroinflammation*, 2:1-13.
- Pinheiro PS y Mulle C (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nature Reviews Neuroscience*, 9: 423-436.
- Prehn JH (1998). Mitochondrial transmembrane potential and free radical production in excitotoxic neurodegeneration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 357:316-322.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, White LE (2008). *Neuroscience*, 4a ed. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Rains JL y Jain SK (2010). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 1-9.
- Randall RD, Thayer SA (1992). Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, 12:1882-95.
- Riganti C, Gazzano E, Polimeri M, Aldieri E, Ghigo D (2012). The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*. 53:421-436.
- Sandberg M, Butcher SP, Hagberg H (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem*, 47:178-84.
- Sanders NM, Figlewicz DP, Taborsky GJ, Wilkinson CW, Daumen W, Levin BE (2006). Feeding and neuroendocrine responses after recurrent insulin-induced hypoglycemia. *Physiology & Behavior*, 87:700-706.
- Schmued LC, Hopkins KJ (2000). Fluoro-jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 874:123-30.
- Secher NH y Quistorff B (2005). Brain glucose and lactate uptake during exhaustive exercise. *J Physiol*, 568, p3.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutritional Biochemistry*, 18:567-579.
- Selkirk JV, Nottebaum LM, Vana AM, Verge GM, Mackay KB, Stiefel TH, Naeve GS, Pomeroy JE, Petroski RE, Moyer J, Dunlop J, Foster AC (2005). Role of the GLT-1 subtype of glutamate transporter in glutamate homeostasis: the GLT-1-preferring inhibitor WAY-855 produces marginal neurotoxicity in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 21:3217-3228.
- Serrano F, Kolluri NS, Wienties FB, Card JP, Klann E (2003). NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res*, 988:193-8
- Sheldon AL, Robinson MB (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International*, 51:333-355.
- Siegel G (2006). *Basic Neurochemistry. Molecular, celular and medical aspects*. 7a ed. Elsevier Academic Press, Canada.
- Siesjö Bo K (1981). Cell Damage in the Brain: A Speculative Synthesis. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1:155-185.
- Siesjö Bo K. (1988). Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 4: 113-144
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Flow and 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 D, Amiel SA (2002). Hypoglycaemia unawareness and the brain. *Diabetologia*, 45:949-958.
- Stanley J y Elliott MM (2008). Introduction to the Central Nervous System. In *Neuroanatomy for the Neuroscientist*. Springer Science + Business Media, LLC, USA.
- Suh WS, 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. *J Neuroscience*, 23:10681-10690.
- Suh WS, Hamby AM, Swanson RA (2007a). Hypoglycemia, brain energetic, and hypoglycemic neuronal death. *GLIA*, 55:1280-1286.
- Suh S, Gum E, Hamby A, Chan P, Swanson R (2007b). 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. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28:1697-1706.

Sutherland GR, Tyson RL, y Auer RN. (2008). Truncation of the Krebs cycle during hypoglycemic coma. *Medicinal Chemistry* 4:379-385.

Tanaka K (2000). Functions of glutamate transporters in the brain. *Neuroscience research*, 37:5-19.

Tesfaye N y Seaquist ER (2010). Neuroendocrine responses to hypoglycemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1212:12-28.

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

Tzingounis AV, Wadiche JI (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nature reviews*, 8: 935-947.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39:44-84.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, 21:2-21.

Vannucci RC, Vannucci SJ (2000). Glucose metabolism in the developing brain. *Semin Perinatol*, 24:107-15.

Vermeulen RJ, Valk J (2005). Neonatal hypoglycemia. In MS van der Knaap, J. Valk (Eds.) *Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders*, 3rd Ed., Berlin, Springer. P.749.

Wahren J, Ekberg K, Fernqvist-Forbes E, Nair S (1999). Brain substrate utilization during acute hypoglycaemia. *Diabetologia*, 42:812-818.

Wajner M, Harkness A (1989). Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues. *Bichimica et Biophysica Acta*, 9991, 79-84.

Wamelink MM, Struys EA, Jakobs C (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. *J Inherit Metab Dis*, 31:703-717.

Wang X, Michaelis EK (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Aging Neuroscience*, 2:1-13.

Wang Y, Qin Z (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, 15:1382-1402.

Warren RE, Frier BM (2005). Hypoglycaemia and cognitive function. *Diabetes Obes Metab*, 7:493-506.

Westerberg E, Wieloch TW (1989). Changes in excitatory amino acid receptor binding in the intact and decorticated rat neostriatum following insulin-induced hypoglycemia. *Journal of Neurochemistry*, 52:1340-1347.

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

Wieloch T (1986). Endogenous excitotoxins as possible mediators of ischemic and hypoglycemic brain damage, *Adv Exp Med Biol*, 203:127-38.

Won SJ, Yoo BH, Kauppinen TM, Choi BY, Kim JH, Jang BG, Lee MW, Sohn M, Liu J, Swanson RA, Suh SW (2012). Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. *J Neuroinflammation*, 9: 182

Xu C, Yogaratman J, Lua R, Naik S, Khoo C, Sasidaran S, Sim K (2011). Persistent, severe hypoglycemia-induced organic brain syndrome with neurological sequelae: a case report. *Gen Hosp Psichiatry*, 33:412e9-412e.11

Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (1999). *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, USA.

Zijlmans W, Kempen A, Serlie M, Sauerwein H (2009). Glucose metabolism in children: influence of age, fasting, and infectious diseases. *Metabolism Clinical and Experimental* 58:1356-1365.