



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*PAPEL DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL DAÑO HIPOGLUCÉMICO CEREBRAL Y  
SU POSIBLE PROTECCIÓN POR CUERPOS CETÓNICOS*

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

*PRESENTA*

*Q.F.B. ALBERTO JULIO AMILPAS*

TUTORA PRINCIPAL

DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR - UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS – UNAM  
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS – UNAM

MÉXICO D.F. MAYO 2015



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



**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.

México D.F. a 30 de Abril de 2014

**VoBo Tutor,  
Revisión de tesis de maestría**

**A los miembros del Jurado de Examen**

Por medio del presente manifiesto que he revisado el trabajo escrito del proyecto que lleva como título: "PAPEL DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL DAÑO HIPOGLUCÉMICO CEREBRAL Y SU POSIBLE PROTECCIÓN POR CUERPOS CETÓNICOS" del alumno Alberto Julio Amilpas y considero que tiene la calidad suficiente para ser presentado al jurado de examen.

Atentamente



Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Tutor Académico

PMDCB/470/2014...A

**ALBERTO JULIO AMILPAS**  
**Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de Mayo del presente, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**, con la réplica de la tesis "Papel del estrés oxidante en el daño hipoglucémico cerebral y su posible protección por cuerpos cetónicos", dirigida por la Dra. Lourdes Massieu Trigo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Julio Morán Andrade
VOCAL	Dra. Susana Castro Obregón
VOCAL	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
VOCAL	Dra. Leonor Pérez Martínez
SECRETARIO	Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, D.F., a 14 de Mayo de 2014.**  
**COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO**  
**CIUDAD DE MÉXICO**



**DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO**

C.c.p. Archivo

BGP\*Igg

# ***PAPEL DEL ESTRÉS OXIDANTE EN EL DAÑO HIPOGLUCÉMICO CEREBRAL Y SU POSIBLE PROTECCIÓN POR CUERPOS CETÓNICOS***

## **RECONOCIMIENTOS**

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

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría técnica de la Bióloga Teresa Montiel Montes en la realización de este trabajo en todos sus procedimientos experimentales.

Se reconocen las facilidades brindadas por la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para la captura de las imágenes de este trabajo.

Se reconocen las facilidades brindadas por la Unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en la obtención de parte del material de trabajo.

Este proyecto de investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (proyecto S-112179) y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN204213) otorgado a Lourdes Massieu. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por el CONACYT (No. CVU 240152)

## **Agradecimientos:**

*Agradezco el incondicional apoyo que durante todo este tiempo recibí de parte de mi amada familia: Crescencio Julio, Lourdes Amilpas, Ricardo Julio y Guadalupe Julio.*

*Este trabajo está dedicado a mi hermana Lupita por todas las experiencias que hemos compartido y por las que seguiremos compartiendo y a mi hermano Riki simplemente porque la vida se vive mejor cuando se tiene un magnífico hermano como él.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Fisiología Celular por hacerme sentir el significado de nuestro lema: “POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”*

*Agradezco a mi tutora, la Dra. Lourdes Massieu el haberme regalado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por hacerme portador de su nombre para toda la vida: “Yo hice mi maestría con Lourdes Massieu”*

*A Tere Montiel por enseñarme que no todo en la vida son técnicas perfectas y que más allá del laboratorio existe una vida que también debe conducirse con el mismo esmero, dedicación y detalle. Por su paciencia, enseñanzas y consejos, gracias.*

*A mis compañeros y hermanos de armas que hicieron único al AL-302 de Neurociencias, a los que están y estuvieron: Selene García, Cristian Gerónimo, Carmen Torres, Marlene Rivera, Gabriela Languren, Lucy Camberos, Susana Flores, Ana Estrada, Sharlen Moore, Eva Soto y Blanca Páramo “¡no toques mi comida!” (los que estuvieron ahí, lo entenderán)*

*Al mismo tiempo, agradecimiento y dedicatoria para Citlalli Netzahualcoyotzi: empezamos esta aventura juntos y la vida nos unió para seguir compartiendo el mismo sendero. Lo mejor de esta etapa lo encontré en ti y conmigo lo llevaré. Tú y yo, como uno.*

## Índice

Índice.....	1
Índice de abreviaturas.....	3
1. Resumen.....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1 Metabolismo cerebral.....	6
2.2 Transportadores de glucosa.....	6
2.3 Metabolismo energético de la glucosa.....	9
2.4 Sustratos energéticos alternos a la glucosa.....	11
2.5 Transportadores de monocarboxilatos.....	13
2.6 Propiedades neuroprotectoras de los cuerpos cetónicos.....	14
2.7 La hipoglucemia.....	20
2.8 Relevancia clínica de la hipoglucemia.....	22
2.9 Comportamiento electroencefalográfico durante la hipoglucemia.....	24
2.10 Alteraciones del metabolismo energético de la glucosa durante la hipoglucemia	25
2.11 Mecanismos de muerte celular en la hipoglucemia.....	27
2.12 El estrés oxidante y su relación con la hipoglucemia.....	30
3. Planteamiento del problema.....	32
4. Hipótesis y objetivos.....	33
5. Materiales y métodos.....	34
5.1 Modelo de hipoglucemia severa <i>in vivo</i> .....	34
5.2 Protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.....	35
5.3 Protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.....	36
5.4 Registro electroencefalográfico.....	38
5.5 Histología.....	38
5.5.1 Tinción de Fluoro-Jade B.....	39
5.5.2 Tinción de Hoechst.....	40



5.6 Detección de la marca de etidio.....	40
5.7 Análisis estadístico.....	42
6. Resultados.....	43
6.1 Evolución de la hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.....	43
6.2 Evolución de la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.....	43
6.3 Comportamiento electroencefalográfico antes, durante y después de la hipoglucemia severa.....	45
6.4 Efecto del DBHB sobre la aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento y del periodo isoelectrico en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.....	47
6.5 Efecto del DBHB sobre la aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento y del periodo isoelectrico en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.....	47
6.6 La degeneración celular en la hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa	50
6.7 La degeneración celular en la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.....	51
6.7.1 Distribución de las células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral	53
6.7.2 Distribución de las células positivas a Fluoro-Jade B en el hipocampo.....	57
6.8 Producción de especies reactivas de oxígeno en el cerebro después de la hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.....	58
6.8.1 Distribución de la marca positiva a etidio en las diferentes regiones cerebrales.....	58
6.8.2 Distribución de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral.....	62
6.8.3 Distribución de la marca positiva a etidio en el hipocampo.....	63
6.9 Producción de especies reactivas de oxígeno en el cerebro después de la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.....	67
6.9.1 Distribución de la marca positiva en el cerebro en la corteza y el hipocampo.....	67
6.9.2 Distribución de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral.....	68
6.9.3 Distribución de la marca positiva a etidio en el hipocampo.....	70

7. Discusión.....	73
8. Conclusiones.....	80
9. Bibliografía y referencias .....	81
10. Anexo 1. Publicación original derivada de este trabajo: “Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by $\beta$ -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species”.....	90

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2-DG	2-desoxiglucosa	FJB	Fluoro-Jade B
3-NPA	Ácido 3-nitropropiónico	FJB (+)	Marca positiva a Fluoro-Jade B
6-OHDA	6-hidroxidopamina	G6P	Glucosa-6-fosfato
AcAc	Acetoacetato	GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
AcoA	Acetil coenzima A	GLUT	Transportador de glucosa
ATP	Trifosfato de adenosina	GTP	Trifosfato de guanosina
BHB	$\beta$ -hidroxibutirato	$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
BHE	Barrera hematoencefálica	HMG-CoA liasa	Hidroxi metil glutaril coenzima A liasa
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono	HMG-CoA sintasa	Hidroxi metil glutaril coenzima A sintasa
CSG	Concentración sanguínea de glucosa	HS	Grupo con hipoglucemia severa
DBHB	D- $\beta$ -hidroxibutirato	HS CON Iso	Grupo con hipoglucemia severa con presencia de periodo isoeléctrico
DHE	Dihidroetidio	HS SIN Iso	Grupo con hipoglucemia severa sin presencia de periodo isoeléctrico
D-PBS	Dubelco's Phosphate-Buffered Saline	HS+DBHB	Grupo con hipoglucemia severa y con D- $\beta$ -hidroxibutirato
EEG	Registro electroencefalográfico		
Et	Etidio		
Et (+)	Marca positiva a etidio		
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleótido reducido		

HS+DBHB CON Iso	Grupo con hipoglucemia severa, con D-β-hidroxi-butirato y con presencia de periodo isoelectrico	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
		NMDA	N-metil-D-aspartato
		O <sub>2</sub>	Oxígeno
HS+DBHB SIN Iso	Grupo con hipoglucemia severa, con D-β-hidroxi-butirato y sin presencia de periodo isoelectrico	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
		ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
		OH <sup>•-</sup>	Radical hidroxilo
i.p.	Administración por vía intraperitoneal	PLA2	Fosfolipasa A2
Iso	Periodo isoelectrico	P.R.	Pérdida del reflejo de enderezamiento
i.v.	Administración por vía intravenosa	p.o.	Administración por vía oral
MCT	Transportador de monocarboxilatos	s.c.	Administración por vía subcutánea
mg/dL	miligramos por decilitro	SLC	Acarreadores de solutos
NaBHB	β-hidroxi-butirato de sodio	SNC	Sistema nervioso central
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado	UFA/mm <sup>2</sup>	Unidades de fluorescencia arbitraria por milímetro cuadrado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido	VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
		XaO	Xantina oxidasa

## **1. Resumen**

La hipoglucemia es la disminución de la concentración sanguínea de glucosa a niveles por debajo de los 70 mg/dL. Esta es la complicación más común que se presenta en pacientes diabéticos (tipo 1) que llevan un estricto control de la concentración de glucosa en la sangre como resultado de la sobredosificación accidental de insulina o de secretagogos de esta hormona. La hipoglucemia se vuelve un problema serio cuando no es revertida rápidamente; si la concentración en sangre de glucosa se acerca o incluso cae por debajo de los 20 mg/dL existe el riesgo de que el paciente caiga en coma y que éste lo lleve a la muerte si no recibe atención médica inmediata. Un modelo experimental de hipoglucemia consiste en la administración de insulina a roedores con la finalidad de hacer disminuir la concentración de glucosa en la sangre. Usando este modelo se ha descrito que hay regiones del cerebro que son más susceptibles a la ausencia de glucosa, como la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. Evidencia reciente ha mostrado que existen marcadores de estrés oxidante en el cerebro después de un evento hipoglucémico. Sin embargo la distribución de las especies reactivas de oxígeno en regiones discretas del cerebro no se ha descrito. Por otro lado, los cuerpos cetónicos (acetoacetato y D- $\beta$ -hidroxibutirato) pueden ser utilizados como fuente de energía alterna a la glucosa durante la lactancia o en condiciones como el ayuno prolongado. Reportes recientes indican que los cuerpos cetónicos pueden prevenir el daño neuronal que se observa en algunos modelos experimentales tanto de hipoxia/isquemia como de las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. Los mecanismos responsables del efecto protector de los cuerpos cetónicos no se conocen por completo, pero se sabe que mejoran la función mitocondrial y tienen la capacidad de atrapar algunas especies reactivas de oxígeno. Así, la hipoglucemia es una condición adecuada para estudiar la acción del D- $\beta$ -hidroxibutirato como sustrato energético alternativo a la glucosa y probar sus efectos sobre la generación de especies oxidantes y la muerte neuronal. En el presente trabajo se investigó la distribución de las especies reactivas de oxígeno y de la degeneración celular en regiones discretas del cerebro de ratas con hipoglucemia severa en presencia o en ausencia del cuerpo cetónico D- $\beta$ -hidroxibutirato. Los resultados muestran que en la hipoglucemia severa el DBHB previene de manera eficiente la degeneración celular y la aparición del coma; la evidencia experimental sugiere una producción diferencial de especies pro-oxidantes en regiones discretas de cerebro que se reduce en presencia del DBHB.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Metabolismo cerebral**

El cerebro humano constituye aproximadamente el 2% del peso corporal y sin embargo consume cerca del 25% de la glucosa proveniente de la dieta y cerca del 20% del oxígeno (O<sub>2</sub>) que ingresa al organismo (Beltrán et al., 2012).

La glucosa es el principal sustrato energético que se metaboliza en el cerebro para la obtención de energía; en este órgano es enteramente oxidada hasta llegar a bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua a través de una serie de procesos bioquímicos que son análogos a los que ocurren en otros tejidos: la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

El mayor consumo de energía en el cerebro es causado por el mantenimiento de los gradientes iónicos existentes en la membrana plasmática de las neuronas que se debe principalmente a la actividad de la bomba sodio-potasio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>), que funciona con trifosfato de adenosina (ATP) y que permite mantener la excitabilidad de las membranas celulares de las neuronas (Attwell y Laughlin 2001). La actividad de estas bombas es responsable de la oxidación de aproximadamente el 50% de la glucosa en el sistema nervioso central (SNC). Adicionalmente, otros procesos que consumen energía son la síntesis permanente de moléculas necesarias para el tráfico y señalización intracelular y para la recaptura de neurotransmisores. Por otro lado, el transporte axonal de moléculas sintetizadas en el soma hacia su destino final es otro proceso que consume energía proveniente del metabolismo (Magistretti y Allaman, 2008; Beltrán et al., 2012)

### **2.2 Transportadores de glucosa**

La glucosa es una molécula hidrofílica que requiere de transportadores que faciliten su entrada hacia el cerebro a través de la barrera hematoencefálica (BHE) localizada en la frontera entre el SNC y la sangre en los vasos capilares. Esta barrera está conformada por una capa de células endoteliales alineadas y estrechamente empaquetadas que se encarga de regular el transporte de nutrientes y bloquear la entrada de compuestos potencialmente dañinos para el sistema nervioso. Las uniones estrechas entre las células de la BHE no permiten el paso de solutos y por lo tanto, los nutrientes necesarios para el funcionamiento del

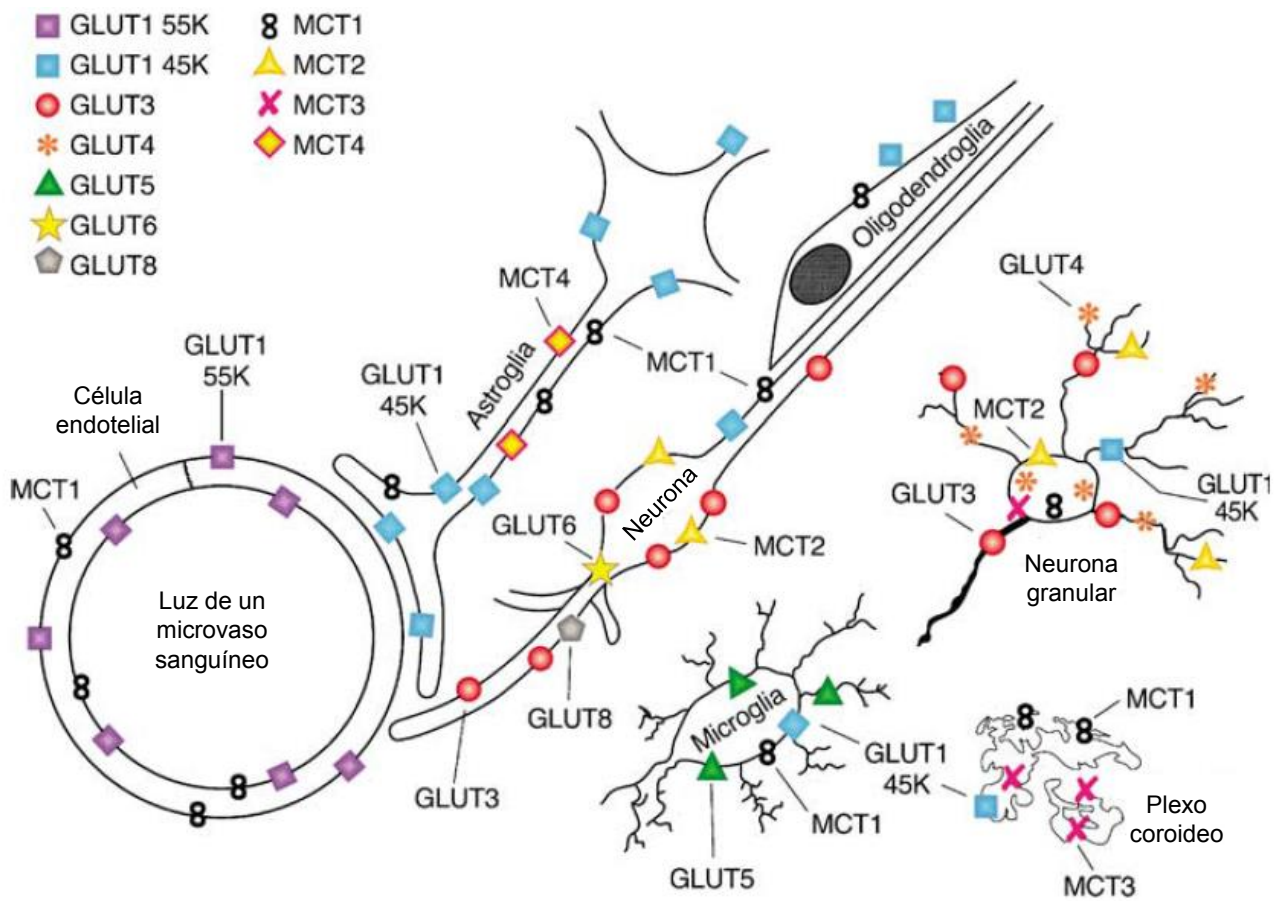
cerebro tienen que pasar a través de estas células mediante transporte facilitado (Qutub y Hunt 2005).

El transporte de glucosa y otras hexosas hacia el interior de las células de la BHE está mediado por la familia de acarreadores de solutos SLC2, que está compuesta por una serie de transportadores de glucosa conocidos como GLUT. Catorce transportadores de glucosa se expresan en el humano y entre ellos se incluyen transportadores para sustratos distintos a la glucosa, como la fructosa, el mioinositol o el urato (Thorens y Mueckler, 2010). Con la excepción de GLUT1 que se expresa de manera ubicua en el organismo, los miembros de la familia de los transportadores de glucosa se expresan de una manera tejido-específica. Dada la heterogeneidad celular en el SNC, se han reportado casi todos los tipos de transportadores en el cerebro de mamíferos en preparaciones *in vitro* e *in vivo* (Simpson et al., 2007) aunque el papel que desempeña cada uno de ellos aún no ha sido descrito a detalle (Figura 1).

El transporte de glucosa en el cerebro de mamíferos se da predominantemente por los transportadores GLUT1 y GLUT3 que se expresan en todo este órgano y cuya localización y características cinéticas se encuentran bien establecidas. Se han reportado dos isoformas del transportador GLUT1 que difieren entre sí por el grado de glucosilación (55 y 45 KDa). La diferencia en sus pesos moleculares no parece implicar cambios en la estructura de la proteína o en las características cinéticas del transportador. La isoforma de 55 KDa se encuentra exclusivamente en las células endoteliales de la microvasculatura que conforma la BHE, donde se encuentra presente tanto en la capa luminal como en la abluminal y en un reservorio al interior de estas células. La distribución de este transportador en las células endoteliales puede variar en función de la disponibilidad de glucosa; se ha demostrado que en ratas expuestas crónicamente a la hipoglucemia se incrementa la captura de glucosa debido a un aumento en la expresión de transportadores GLUT1 en la capa luminal de los vasos sanguíneos (Simpson et al., 2007). El transportador GLUT1 también se ha localizado en las neuronas encontrándose predominante en los cuerpos celulares y en menor medida en los axones (Qutub y Hunt, 2005; Magistretti y Allaman, 2008) (Figura 1). La isoforma de 45KDa de GLUT1 se encuentra en las células gliales así como en las membranas basolateral y apical del plexo coroideo y en las células ependimales. En condiciones normales la expresión de GLUT1 en neuronas es muy limitada; sin embargo la expresión de este transportador se incrementa en respuesta a estímulos estresantes externos o cuando las neuronas crecen en cultivo.

El transportador GLUT3 en el cerebro se localiza casi exclusivamente en neuronas; también se ha detectado la expresión de GLUT3 en espermatozoides, plaquetas, células de la placenta y ciertos tipos de gliomas humanos: todos estos tipos celulares se caracterizan por su alto consumo de energía.

El transportador GLUT5 se encuentra localizado en las células microgliales, que son los macrófagos residentes del cerebro y que se encargan de la respuesta inmune e inflamatoria en el SNC. La localización de otros transportadores de glucosa se esquematiza en la figura 1 (Simpson et al., 2007).



**Figura 1.** Representación esquemática de la localización de los transportadores de glucosa (GLUT) y de los transportadores de monocarboxilatos (MCT) en el cerebro de mamíferos (adaptado de Simpson et al., 2007).

### 2.3 Metabolismo energético de la glucosa

Una vez en el interior de la célula la glucosa es principalmente catabolizada por la vía de la glucólisis. El primer paso en esta vía es la fosforilación de la glucosa en el carbono seis por la enzima hexocinasa para formar glucosa-6-fosfato (G6P). Gran parte de la G6P se degrada hacia piruvato a través de una serie de reacciones que resultan en la producción neta de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa; sin embargo parte de la G6P puede ser utilizada para formar glucosa-1-fosfato que se utiliza en la síntesis de glucógeno para generar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) y ribosa-5-fosfato a través de la vía de las pentosas fosfato. La glucólisis es una vía metabólica que ocurre en todas las células del cerebro.

Bajo condiciones aeróbicas el piruvato es descarboxilado oxidativamente para generar acetil coenzima A (AcoA) en una reacción catalizada por el complejo piruvato descarboxilasa en la mitocondria. La AcoA entra en el ciclo de Krebs en donde se une con una molécula de oxaloacetato para producir citrato iniciando así una serie de reacciones químicas enzimáticamente catalizadas que son de vital importancia en todas las células. Durante este ciclo ocurre la completa oxidación de los carbonos de la AcoA con la subsecuente formación de trifosfato de guanosina (GTP), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavina adenina dinucleótido (FADH<sub>2</sub>) ambas en su forma reducida; estos últimos transfieren sus electrones durante la fosforilación oxidativa hacia distintos aceptores de electrones en forma consecutiva, donde el aceptor final es el oxígeno (O<sub>2</sub>). La energía liberada por el flujo de electrones a través de esta cadena de transporte es utilizada para acarrear protones hacia el espacio intermembranal de la mitocondria para generar un gradiente electroquímico. Esta energía almacenada es utilizada en la última etapa para sintetizar ATP en una reacción enzimática catalizada por un complejo denominado ATP sintasa. De esta manera bajo condiciones aeróbicas cada molécula de glucosa produce un total de 36 a 38 moléculas de ATP siendo completamente oxidada hacia CO<sub>2</sub> y agua a través de estas vías metabólicas (Beltrán et al., 2012; Peña et al., 2004). Una representación esquemática de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa se presenta en la figura 2.

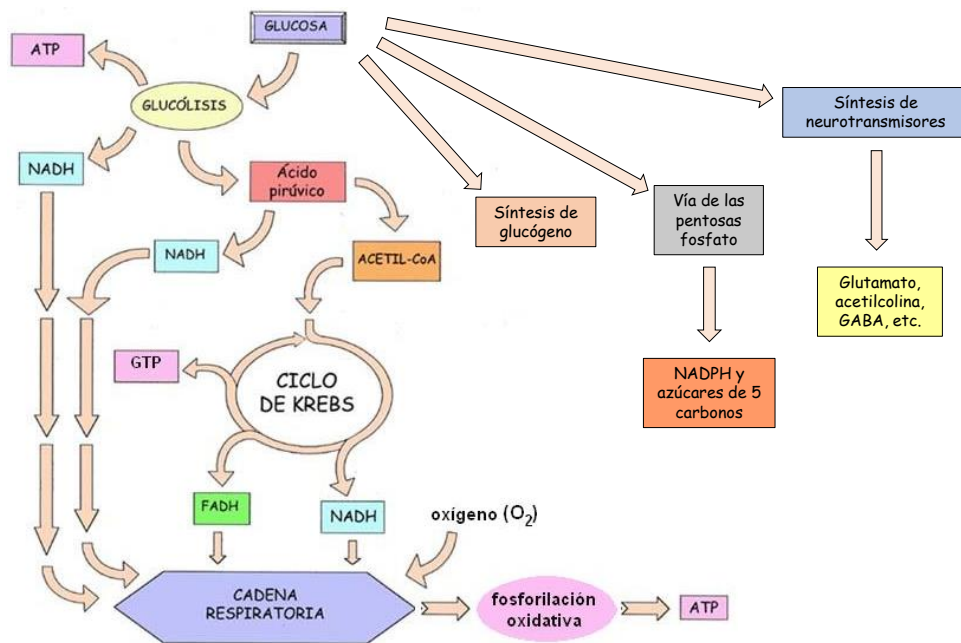
Por otro lado, la glucosa puede ser oxidada a través de una vía alterna conocida como la vía de las pentosas fosfato. Esta vía tiene dos fases: la primera es la oxidativa y se genera NADPH. En las células del cerebro así como en las células de otros tejidos el poder reductor



es proporcionado por esta molécula. Muchas reacciones biosintéticas en las cuales los precursores se encuentran en un estado más oxidado que los productos finales requieren de energía en la forma de poder reductor que es donada directamente por el NADPH. La segunda fase de la vía es conocida como no oxidativa y es aquí donde se sintetizan los carbohidratos de cinco carbonos que se acoplan con las bases de los ácidos nucleicos. Si bien esta vía implica la oxidación de glucosa, su función principal es más anabólica que catabólica.

La glucosa también forma parte de la estructura del glucógeno, un polímero de glucosa que directamente puede proveer de energía al organismo cuando existe una alta demanda de este carbohidrato y la glucosa libre no se encuentra disponible en cantidad suficiente por alguna razón. El glucógeno se sintetiza a partir de G6P y su síntesis está regulada por dos enzimas: la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa. En relación a otros tejidos como el hígado, el contenido de glucógeno en el cerebro es bajo, siendo los astrocitos en donde se encuentra este polímero de glucosa (Brown y Ransom 2007; Beltrán et al., 2008).

Una de las funciones más relevantes de la glucosa fuera del metabolismo energético es servir como precursor en la síntesis de algunas moléculas como la acetilcolina, lactato, glutamato, glutamina, aspartato, GABA y alanina (Figura 2). El esqueleto de carbono de la glucosa también puede ser incorporado hacia la síntesis de lípidos (McKenna et al., 2006).



**Figura 2.** Representación esquemática de las rutas metabólicas que sigue la glucosa para la generación de energía y en la síntesis de diversas moléculas.

## 2.4 Sustratos energéticos alternos a la glucosa

Bajo ciertas condiciones el cerebro es capaz de oxidar otros sustratos diferentes a la glucosa para obtener energía; una de ellas es el ayuno prolongado y la otra se presenta durante el periodo de lactancia. Las principales moléculas que se utilizan en estas condiciones son los cuerpos cetónicos, acetoacetato (AcAc) y D-β-hidroxiacetato (DBHB) (Hawkins et al., 1971; Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1993) (Figura 3).

La biosíntesis de cuerpos cetónicos predominantemente tiene lugar en el hígado en donde los ácidos grasos son degradados mediante la β-oxidación para generar AcoA, NADH y FADH<sub>2</sub>. Normalmente la AcoA es completamente oxidada mediante el ciclo de Krebs; sin embargo, si existe una deficiencia energética proveniente de la ausencia de glucosa, la AcoA se utiliza para sintetizar cuerpos cetónicos como se muestra en la figura 3.

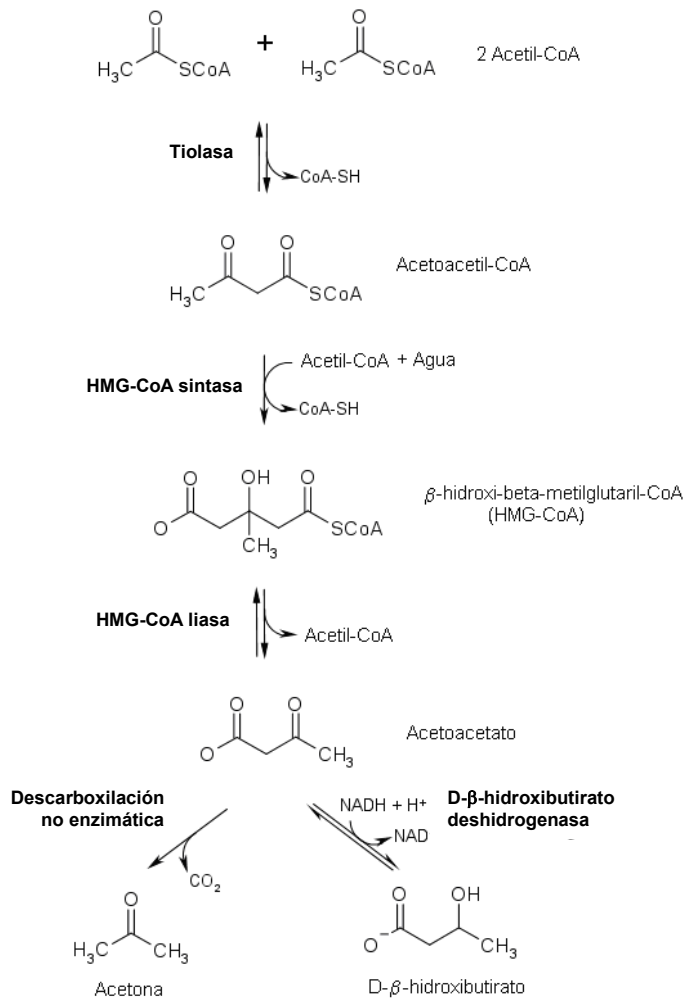
La biosíntesis inicia con dos moléculas de AcoA unidas por la enzima tiolasa para formar acetoacetil coenzima A; ésta molécula pierde una molécula de coenzima A por la acción de la hidroximetilglutaril coenzima A sintasa (HMG-CoA sintasa) para generar el intermediario β-hidroxi-β-metil glutaril coenzima A que al perder su última molécula de coenzima A gracias a la enzima hidroximetilglutaril coenzima A liasa (HMG-CoA liasa) produce AcAc el cual a su vez puede reducirse en uno de los carbonilos por la acción de la enzima D-β-hidroxiacetato deshidrogenasa para generar DBHB o acetona en menor cantidad por descarboxilación no enzimática. La acetona es un compuesto de bajo peso molecular que se produce en cantidades menores que los otros dos cuerpos cetónicos y que se elimina fácilmente durante la exhalación (Peña et al., 2004).

Luego de ser sintetizados en el hígado, los cuerpos cetónicos son transportados por la sangre desde este órgano hacia los tejidos periféricos y al cerebro en donde son metabolizados para originar de nuevo AcoA en una serie de pasos inversa a la que se siguió para su síntesis de la siguiente manera: la oxidación del grupo carbonilo en la molécula de DBHB requiere de nicotina adenina dinucleótido en su estado oxidado (NAD<sup>+</sup>) y de la enzima D-β-hidroxiacetato deshidrogenasa para formar AcAc y una molécula de NADH. La generación de acetoacetil coenzima A requiere de la transferencia de una molécula de coenzima A proveniente de la succinil coenzima A y de la enzima β-cetoacil coenzima A transferasa. Finalmente, la unión de una segunda molécula de coenzima A sobre la acetoacetil coenzima A impulsa la formación

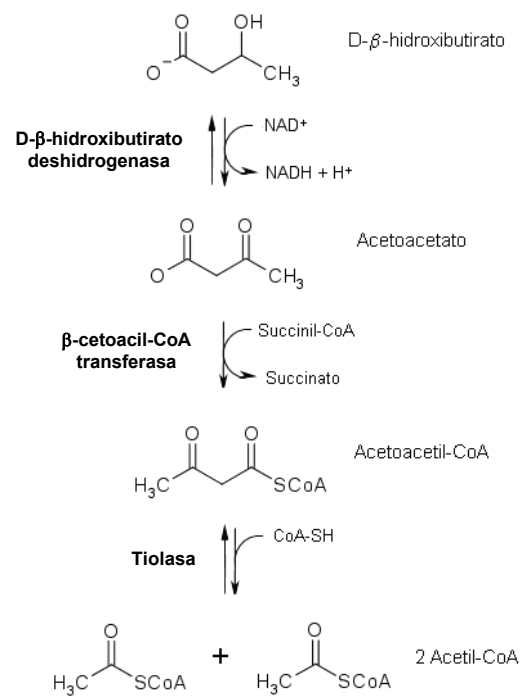
de dos moléculas con coenzima A en un proceso catalizado por la enzima tiolasa produciendo finalmente dos moléculas de AcoA.

Las células hepáticas no son capaces de consumir los cuerpos cetónicos que producen debido a que carecen de la enzima  $\beta$ -cetoacil-CoA-transferasa (Peña et al., 2004; Beltrán et al., 2008). La figura 3 muestra los pasos de la síntesis y el metabolismo de los cuerpos cetónicos.

**A.**



**B.**



**Figura 3.** Metabolismo de los cuerpos cetónicos. **A.** Síntesis de acetoacetato, acetona y D- $\beta$ -hidroxibutirato en el hígado a partir de acetil-CoA. **B.** Producción de acetil-CoA a partir de cuerpos cetónicos en sitios como el cerebro, corazón y músculo esquelético.

## *2.5 Transportadores de monocarboxilatos*

Los cuerpos cetónicos tienen un carácter predominantemente polar y no son capaces de atravesar a la BHE por difusión simple; por lo tanto, necesitan de transportadores que se encarguen de llevarlos desde el torrente sanguíneo a través de la BHE, hacia el interior de la célula o de un tipo de célula a otro (Pierre y Pellerin, 2005).

Los transportadores que se encargan de hacer pasar a los cuerpos cetónicos a través de la BHE son los transportadores de monocarboxilatos (MCT) que pertenecen a la familia de transportadores SLC16 compuesta de 14 miembros, de los cuales solo los transportadores de monocarboxilatos 1 al 4 acarrean moléculas metabólicamente relevantes cotransportando lactato, piruvato o cuerpos cetónicos junto con protones hacia el interior de la célula mediante un mecanismo de simporte con una estequiometría equimolar 1:1.

Los transportadores MCT 1-4 se encuentran en el cerebro y pueden distinguirse no solo por sus características cinéticas sino también por su distribución. El transportador MCT1 en el cerebro se encuentra localizado en las células endoteliales que componen la BHE, en las células ependimales alrededor de los cuatro ventrículos, en los astrocitos y en menor medida en otros tipos celulares. La expresión de MCT1 está estrechamente relacionada con el desarrollo: en el periodo postnatal está ampliamente distribuido en todos los tipos celulares. Se ha observado que esta distribución coincide con el periodo de lactancia y con una activa cetogénesis en roedores. El incremento de este transportador favorece la producción y el uso de cuerpos cetónicos como sustrato energético durante esta etapa del desarrollo (Vanucci y Simpson, 2003).

La expresión del transportador MCT2 es especie-específica, encontrándose en niveles altos en roedores y de manera más restringida en humanos (Halestrap y Wilson, 2012). Se encuentra preferentemente localizado en las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo y del cerebelo, localizándose en menor medida en los astrocitos. (Simpson et al., 2007).

La expresión del transportador MCT3 se encuentra limitada al plexo coroideo y al epitelio retinal pigmentado mientras que el transportador MCT4 ha sido extensamente estudiado en el músculo esquelético, en donde se sabe que es responsable de la exportación de lactato desde las fibras musculares. En el cerebro, este transportador se localiza exclusivamente en los astrocitos. (Pierre y Pellerin, 2005; Simpson et al., 2007; Halestrap y Wilson, 2012).

La figura 1 esquematiza la distribución de los transportadores de monocarboxilatos en el cerebro.

## *2.6 Propiedades neuroprotectoras de los cuerpos cetónicos*

Los cuerpos cetónicos tienen la principal función de actuar como moléculas de reserva energética en el organismo. Sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que poseen propiedades neuroprotectoras evaluadas en varios modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas e incluso en la práctica clínica.

En los años veinte existían pocas opciones para el tratamiento de la epilepsia. En 1921 Russel Wilder creó la dieta cetogénica en la clínica Mayo para el tratamiento de la epilepsia refractaria infantil. Con el desarrollo de anticonvulsivantes como la fenitoína el uso de la dieta cetogénica cayó rápidamente en desuso hasta que a mediados de los noventa se recuperó el interés en el uso y aplicación de esta dieta en pacientes epilépticos que no respondían a los tratamientos farmacológicos disponibles. La dieta cetogénica clásica tiene una composición aproximada de cuatro partes de grasas y una parte de carbohidratos y proteínas. La disminución drástica en la cantidad de carbohidratos en la dieta reduce la disponibilidad de glucosa y en su lugar, los ácidos grasos se usan en el hígado para producir AcAc y DBHB que se metabolizan para producir energía, que en gran medida va hacia las neuronas (Kossof y Hartman, 2012; Lutas y Yellen 2013).

El uso de la dieta cetogénica a nivel clínico se ha enfocado principalmente a pacientes pediátricos. Recientemente Kayyali y sus colaboradores (2014) reportaron la efectividad de una dieta cetogénica en veinte pacientes pediátricos con una edad promedio de 4.5 meses. Quince de los pacientes no respondieron al tratamiento para la epilepsia recomendado por la Academia Americana de Neurología que consiste en administrar bajas dosis de la hormona adrenocorticotropina o la administración de vigabatrina, un agente antiepiléptico que inhibe el catabolismo de GABA uniéndose irreversiblemente a la enzima GABA transaminasa (Leach, et al., 1996). En los cinco pacientes restantes el tratamiento con estas dos opciones no se consideró viable debido a los potenciales efectos adversos de su uso, ya que el tratamiento con vigabatrina se ha asociado con la pérdida permanente de la visión y el tratamiento con la hormona adrenocorticotropina, con el desarrollo de hipertensión, debilitamiento del sistema inmune y el desarrollo de úlceras intestinales y estomacales (American Academy of Neurology,

2012; Greenfield Jr., 2013). Luego de tres meses en tratamiento con una dieta cetogénica se observó una reducción del 50% en la frecuencia e intensidad de las convulsiones en el 70% de los pacientes.

Algunos de los mecanismos que se han propuesto para explicar la efectividad de la dieta cetogénica en el tratamiento de la epilepsia refractaria fueron revisados recientemente por Lutas y Yellen (2013). El transporte del glutamato hacia las vesículas sinápticas está mediado por transportadores vesiculares (VGLUT); el AcAc, un cuerpo cetónico cuya concentración se eleva en pacientes que consumen una dieta cetogénica, es capaz de inhibir a los VGLUT al competir con el ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) por el sitio de regulación alostérica en estos transportadores. Cuando el AcAc fue aplicado en rebanadas hipocampales de cerebro, la transmisión glutamatérgica hacia las células piramidales de la región CA1 se redujo de manera significativa. Esta reducción en la señalización mediada por glutamato puede potencialmente contribuir a la efectividad de la dieta cetogénica (Juge et al., 2010). Por otro lado, se sabe que el metabolismo de la glucosa disminuye durante el consumo de una dieta cetogénica y que los cuerpos cetónicos se vuelven la principal fuente de energía para el cerebro. Se cree que las bombas de iones que se localizan en la membrana celular utilizan el ATP que proviene de la glucólisis. El consumo submembranar del ATP por estas bombas iónicas está en estrecha relación con un canal de potasio que no permite el paso de este ion en presencia de ATP (canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). La disminución del ATP proveniente de la glucólisis en las cercanías de la membrana celular como resultado de la dieta cetogénica, causa una disminución del ATP a este nivel y la activación del canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  que permite el paso del  $\text{K}^+$ , hiperpolarizando a la célula y en consecuencia disminuyendo su excitabilidad (Ashcroft y Gribble, 1998).

Por otro lado, muchas de las propiedades neuroprotectoras de los cuerpos cetónicos se han evaluado en modelos experimentales. En la tabla 1 que se muestra a continuación, se resumen algunos de los estudios y los hallazgos que se han hecho en este campo:

**Tabla 1.** Propiedades neuroprotectoras de los cuerpos cetónicos en diversos modelos experimentales.

Tipo de daño	Referencia	Vía de administración de los cuerpos cetónicos	Estrategia	Resultado
<i>Daño inducido por glutamato</i>	Massieu et al., 2003	s.c.	Infusión de AcAc por 14 días previos a la administración i.c.v. de glutamato.	Disminución del daño neuronal, del volumen de lesión e incremento del ATP celular.
<i>Daño inducido por glutamato</i>	Noh et al., 2006b	p.o.	Ratones alimentados durante 21 días con una dieta cetogénica previo al daño neuronal inducido con ácido kaínico	Preservación de las neuronas hipocámpales por la inhibición de la apoptosis mediada por caspasa 3
	Mejía-Toiber et al., 2006	i.v.	NaBHB aplicado antes de la neurotoxicidad inducida por glutamato	El NaBHB reduce el daño en el estriado y la lipoperoxidación
	Maalouf et al., 2007	<i>In vitro</i>	DBHB aplicado en un modelo de la neurotoxicidad del glutamato en rebanadas de cerebro	Reducción de la formación de radicales libres y aumento de la respiración mitocondrial
<i>Hipoxia</i>	Puchowicz et al., 2005	p.o.	Ratas alimentadas con una dieta cetogénica durante 3 semanas previas al daño hipóxico	Disminución del lactato cerebral e incremento en la tolerancia a la hipoxia
	Masuda et al., 2005	<i>In vitro</i>	Cultivos neuronales expuestos a hipoxia en presencia de NaBHB en el medio de cultivo	Disminución de la muerte celular y del número de células apoptóticas; la integridad de la membrana mitocondrial se mantuvo
<i>Isquemia cerebral</i>	Suzuki et al., 2001	i.v.	Ratas infundidas con BHB ( $30 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) de 3 a 6 horas después de la oclusión bilateral de la arteria carótida	Disminución del edema cerebral, del contenido de sodio e incremento de los niveles de ATP

Tipo de daño	Referencia	Fuente de administración de los cuerpos cetónicos	Estrategia	Resultado
<i>Isquemia cerebral</i>	Suzuki et al., 2002	i.v.	Infusión de BHB (30 mg·Kg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ) durante 22 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media	Disminución del 50% del volumen de infarto, del edema cerebral, de la peroxidación de lípidos y de los déficits neurológicos
	Puchowicz et al. 2008	p.o. o i.c.v.	Ratas implantadas con una bomba de liberación de NaBHB i.c.v. 4 días antes de la oclusión de la arteria cerebral media o alimentadas con una dieta cetogénica 3 semanas antes de la oclusión de la misma arteria	Disminución del volumen de infarto en un 55% y 70% con la infusión de BHB y por la dieta cetogénica respectivamente
	Tai et al., 2008	p.o.	Ratas alimentadas durante 25 días antes del paro cardíaco de 8.5 minutos para mimetizar un evento isquémico en el cerebro	9 días después del paro no se encontraron células positivas a Fluoro-Jade B en la región CA1 ni en el cerebelo en el grupo alimentado con la dieta cetogénica
<i>Lesión cerebral por trauma</i>	Prins et al., 2005	p.o.	Ratas alimentadas con una dieta cetogénica y posteriormente expuestas a la lesión cerebral traumática	Reducción en un 50% del volumen de contusión cerebral
	Hu et al., 2009	p.o.	Ratas alimentadas con una dieta cetogénica previo a la lesión cerebral traumática	Reducción del edema y de la apoptosis celular



Tipo de daño	Referencia	Fuente de administración de los cuerpos cetónicos	Estrategia	Resultado
Hipoglucemia	Haces et al., 2008	<i>In vitro</i> e i.p.	Presencia de AcAc y DBHB en el medio de cultivo durante la inhibición glucolítica en cultivos de neuronas hipocampales; administración de DBHB o AcAc durante la hipoglucemia severa en ratas	En los cultivos con los cuerpos cetónicos hubo una reducción de la muerte neuronal luego de la inhibición glucolítica. <i>In vivo</i> se redujo la peroxidación de lípidos en el grupo tratado con DBHB
	Cheng et al., 2009	p.o.	Ratas alimentadas con una dieta cetogénica 2 semanas antes de la administración de 6-OHDA en el estriado	Preservación de las células dopaminérgicas y del glutatión reducido
Enfermedad de Parkinson	Imamura et al., 2006	<i>In vitro</i>	NaBHB incubado por 1 hora en células de neuroblastoma y luego expuesto por 48 horas a rotenona y 3-NPA	Aumento en la sobrevivencia celular, conservación de la actividad mitocondrial, disminución de la liberación de citocromo c y de la actividad de las caspasas 9 y 3
	Zhang et al., 2013	p.o.	Un derivado de 3-hidroxiisovalerato, HBME, administrado a diario por 2.5 meses en un modelo de Alzheimer con ratones transgénicos	Se encontró una reducción en la deposición del péptido $\beta$ -amiloide en el hipocampo
Enfermedad de Alzheimer	Yao et al., 2011	Cetosis inducida por 2-DG	Ratones hembra transgénicos 3XTgAD recibieron una dieta con 2-DG por 7 semanas	La cetosis incrementó la bioenergética mitocondrial, redujo la generación de péptido $\beta$ -amiloide y estimuló su degradación.
	Van der Auwera et al., 2005	p.o.	Ratones hembra transgénicos APP/7171 alimentados 43 días con una dieta cetogénica	Reducción de la cantidad de péptido $\beta$ -amiloide 1-42 y 1-40 en el cerebro.

Tipo de daño	Referencia	Fuente de administración de los cuerpos cetónicos	Estrategia	Resultado
<i>Enfermedad de Huntington</i>	Lim et al., 2011	s.c.	Ratones tratados con 3-NPA y ratones R6/2 implantados con una bomba subcutánea de liberación de DBHB	En los ratones R6/2 el DBHB extendió la supervivencia y atenuó las deficiencias motoras

s.c., vía subcutánea; i.c.v., intracerebroventricular; p.o., por vía oral; HBME, 3-hidroxibutirato metil éster; BHB,  $\beta$ -hidroxibutirato; NaBHB,  $\beta$ -hidroxibutirato de sodio; i.v., vía intravenosa; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; 3-NPA, ácido 3-nitropropiónico; 2-DG, 2-deoxiglucosa. Adaptado y modificado de White y Vankatesh, 2011.

Adicionalmente, se ha demostrado que los cuerpos cetónicos también tienen efecto contra el estrés oxidante: en un estudio de nuestro grupo se evaluó la capacidad antioxidante del DBHB en ensayos *in vitro* y se encontró que actúa como atrapador de especies pro oxidantes, en particular, el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) (Haces et al., 2008).

En un trabajo reciente, se reportó que el DBHB actúa como un inhibidor endógeno de las deacetilasas de histonas clase I. La inhibición de estas enzimas correlacionó con un aumento en la transcripción de genes relacionados con la resistencia al estrés oxidante como FOXO3A (un factor de transcripción que induce el arresto del ciclo celular y aumenta la resistencia al estrés oxidante a través del aumento en la expresión de la catalasa y de la superóxido dismutasa mitocondrial) y MT2 (metalotioneína 2, una enzima antioxidante con la capacidad de unirse a metales) (Shimazu et al., 2013). Esta capacidad antioxidante también se encuentra en el AcAc: Noh y sus colaboradores en 2006 demostraron que este cuerpo cetónico disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno en una línea celular de neuronas hipocámpales que se expuso a los efectos del glutamato (Noh et al., 2006a).

Todos estos hallazgos sugieren una participación activa de los cuerpos cetónicos en la neuroprotección más allá de servir como una fuente de energía.

## 2.7 La hipoglucemia

La glucosa desempeña un importante papel en el SNC, ya que la mayor parte de la energía proviene de la oxidación de este carbohidrato. Sin embargo, el cerebro no posee la capacidad de sintetizar glucosa y tampoco es capaz de almacenarla en grandes cantidades. Debido a estas limitaciones, el cerebro es totalmente dependiente del aporte continuo de glucosa desde el torrente sanguíneo (Cryer et al., 2003). La concentración de glucosa en el cerebro normalmente tiene una relación lineal con la concentración de glucosa en sangre. Cuando la concentración sanguínea de glucosa (CSG) se encuentra en el intervalo 70.2 – 127.8 mg/dL, en el cerebro está entre los 14.4 – 41.4 mg/dL (Suh et al., 2007b). Una disminución en la CSG impacta de manera directa sobre la glucosa disponible en el cerebro.

La concentración de glucosa en la sangre se encuentra regulada por una serie de mecanismos que la mantienen en un intervalo de 70 a 110 mg/dL conocido como *euglucemia* (Cryer, 2007). La severidad de los eventos que se originan por la disminución de la concentración de glucosa así como la concentración mínima para definir a la hipoglucemia se han abordado desde distintos puntos de vista. En la literatura existe poco consenso acerca de las concentraciones que deben considerarse para definir a la hipoglucemia y sin embargo, una CSG por debajo de los 70 mg/dL es el umbral más comúnmente reportado (Lacherade et al., 2009). En cuanto a la severidad de la hipoglucemia, se ha descrito que esta se considera moderada cuando se tienen concentraciones entre los 60 y 40 mg/dL y una hipoglucemia severa se presenta en CSG menores a 40 mg/dL (Languren et al., 2013).

Para evitar las discrepancias entre los valores reportados y establecer un criterio unificado para definir a la hipoglucemia, la Sociedad Americana de Diabetes y la Sociedad Endócrina enunciaron cinco categorías para la clasificación de la hipoglucemia a nivel clínico como se muestra en la tabla 2:

**Tabla 2.** Clasificación de los tipos de hipoglucemia de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes y la Sociedad Endócrina. Adaptado de Alsahli y Gerich, 2013.

<b>Tipo de hipoglucemia</b>	<b>Definición</b>
<i>Documentada sintomática</i>	Un evento durante el cual los síntomas típicos de la hipoglucemia (mareo, hambre, palpitaciones, etc.) se asocian con una concentración sanguínea de glucosa $\leq 70$ mg/dL
<i>Severa</i>	Un evento que requiere la asistencia de otra persona para administrar carbohidratos, glucagón u otras acciones resucitativas
<i>Asintomática</i>	Un evento que no se acompaña de los síntomas típicos de la hipoglucemia pero que tiene una concentración sanguínea de glucosa $\leq 70$ mg/dL
<i>Probablemente sintomática</i>	Un evento durante el cual los síntomas de la hipoglucemia no se acompañan de una medición de la concentración de glucosa pero que fue presumiblemente causada por una concentración sanguínea de glucosa $\leq 70$ mg/dL
<i>Pseudo hipoglucemia</i>	Un evento durante el cual la persona con diabetes reporta cualquiera de los síntomas típicos de la hipoglucemia con una concentración sanguínea de glucosa $> 70$ mg/dL o que se aproxima a esta concentración.

Para prevenir o revertir la hipoglucemia existen una serie de mecanismos que actúan de manera jerárquica para restaurar la euglucemia. La reducción de la secreción de insulina es la primera línea de defensa contra la hipoglucemia y ocurre todavía dentro de la euglucemia a una CSG de 81 mg/dL; de esta forma se reduce el consumo de glucosa en tejidos que dependen de la señalización de insulina.

Cuando la concentración de glucosa disminuye a aproximadamente 68 - 70 mg/dL hay un incremento en la secreción de hormonas contra reguladoras como el glucagon secretado por las células  $\alpha$  del páncreas y la adrenalina proveniente de la médula adrenal que tienen efectos casi inmediatos. El glucagon se encarga de estimular la liberación de glucosa en el hígado por la activación de la degradación de glucógeno (glucogenolisis) y la síntesis de glucosa a partir de piruvato (gluconeogénesis); la adrenalina estimula las mismas vías en el hígado, pero además estimula la lipólisis en el tejido adiposo y disminuye la secreción de insulina. La hormona de crecimiento y el cortisol también son secretadas cerca de estas concentraciones de glucosa y ambas se encargan de estimular la cetogénesis y la

gluconeogénesis en el hígado, pero los efectos de su acción se evidencian luego de varias horas. La secreción de adrenalina es la principal responsable de causar los llamados *síntomas neurogénicos o autonómicos* que son el resultado de la percepción de cambios fisiológicos derivados de la activación del sistema nervioso autónomo; algunos de estos síntomas incluyen mareos, palpitaciones, ansiedad, hambre, sudoración, parestesias, entre otros.

Si la concentración de glucosa sigue disminuyendo hasta los por debajo de los 54 mg/dL se presentan los llamados *síntomas neuroglucopénicos* que derivan directamente de la falta de glucosa en el cerebro; algunos de ellos son: visión borrosa, confusión, debilidad y fatiga, ojos vidriosos, dificultad en la concentración, conducta aberrante, entre otros. La percepción tanto de los síntomas autonómicos como de los neuroglucopénicos tiene la finalidad de estimular la ingestión de alimentos.

Si todas estas defensas fallan y la hipoglucemia sigue progresando hasta CSG cercanas o menores a los 30 mg/dL pueden ocurrir convulsiones y deficiencias neurológicas permanentes; si la severidad de la hipoglucemia se mantiene o la CSG sigue disminuyendo puede presentarse un episodio de coma, el cual si no es rápidamente atendido puede ocasionar daños neurológicos permanentes dependiendo de su duración o incluso a la muerte del paciente (Cryer, 2003; Cryer, 2007; Alzahli y Gerich, 2013).

## *2.8 Relevancia clínica de la hipoglucemia*

En los años treinta del siglo pasado Manfred Sakel introdujo la hipoglucemia causada por la administración de insulina como una terapia para el tratamiento de la esquizofrenia. La hipoglucemia se producía con la finalidad de alcanzar un periodo de coma de máximo 30 minutos. A finales de la segunda guerra mundial esta estrategia fue abandonada debido a la aparición de tratamientos más efectivos y seguros. Hoy en día la hipoglucemia es vista principalmente en el contexto de padecimientos como la diabetes (Auer, 2004).

Existen múltiples causas de hipoglucemia pero en más del 90% de los casos son los pacientes con diabetes tipo I, que dependen de la administración exógena de insulina, los que la padecen como resultado de la administración de dosis inadecuadas de esta hormona o de la incorrecta administración de secretagogos de insulina (Díaz Portillo et al., 1997).

Estos pacientes sufren de múltiples episodios de hipoglucemia asintomática; pueden tener CSG de entre 50 – 60 mg/dL el 10% del tiempo, sufren un promedio de dos episodios de hipoglucemia sintomática por semana y un episodio de hipoglucemia severa por año. Se estima que del 2 al 4% de las muertes en pacientes con este tipo de diabetes son atribuidas directamente a la hipoglucemia (Cryer, 2007).

Adicionalmente, en los pacientes con diabetes tipo I el mecanismo contra regulador de la hipoglucemia está seriamente dañado: la secreción endógena de insulina se vuelve totalmente deficiente en los primeros años de la diabetes; de esta forma, la insulina administrada de manera exógena que llega a la circulación no tiene ninguna regulación y en consecuencia mientras la concentración de glucosa disminuye, los niveles de insulina no lo hacen. La respuesta del glucagon frente a la hipoglucemia también se pierde en las etapas tempranas de la diabetes. Este defecto coincide con la pérdida de la secreción endógena de insulina y es típicamente la regla en la diabetes tipo I. En algunos pacientes la respuesta contra reguladora a la hipoglucemia se mantiene gracias a la acción de la adrenalina. Sin embargo, después de algunos años esta respuesta también se pierde. Por otro lado, los pacientes con diabetes tipo I frecuentemente sufren de hipoglucemia asintomática o inadvertida, ya que no presentan la respuesta autonómica que los lleva a reaccionar ante la disminución de la glucosa en sangre (ingesta de alimentos antes de que la neuroglucopenia ocurra). Se ha reportado que la hipoglucemia asintomática se presenta en alrededor del 50% de los pacientes que ya tienen varios años viviendo con diabetes e incrementa hasta en seis veces el riesgo de aparición de un evento de hipoglucemia severa.

Otra de las serias consecuencias de la hipoglucemia en los pacientes con diabetes tipo 1 es el deterioro importante en la calidad de vida del paciente y de sus familiares, ya que una vez que sufrieron un episodio de hipoglucemia severa se desarrolla un miedo a padecer un segundo episodio, ya sea durante el periodo de vigilia o peor aún en episodios nocturnos, llevándolos a sufrir de ansiedad constantemente (Cryer et al., 2003).

En los pacientes con diabetes tipo 2 la frecuencia de aparición de hipoglucemia es sustancialmente menor que en la diabetes tipo I. Se estima que el total de casos de hipoglucemia en pacientes con diabetes tipo II equivale solo al 10% del total de casos de hipoglucemia que se presenta en pacientes con diabetes tipo I.

Otras causas menos frecuentes de hipoglucemia son la presencia de insulinomas, el ayuno excesivamente prolongado, el ejercicio extenuante, la desnutrición, sepsis, quemaduras y la administración de sustancias (aparte de los hipoglucemiantes) que reducen la CSG como el alcohol y los salicilatos (Cryer, 2003; Cryer 2007; Alsahli y Gerich, 2013).

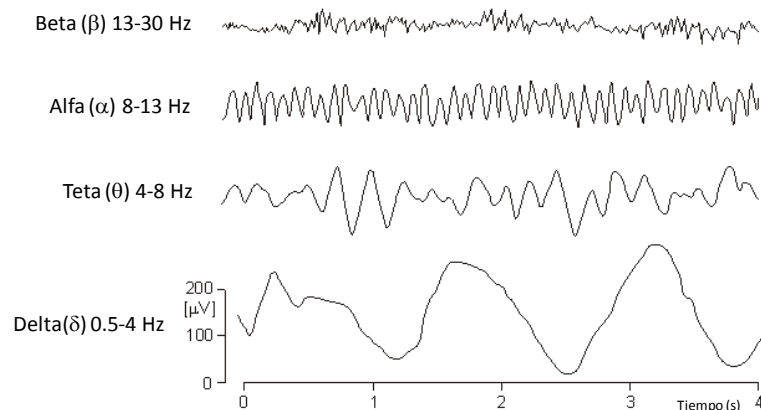
## 2.9 Comportamiento electroencefalográfico durante la hipoglucemia

El electroencefalograma (EEG) ha sido una herramienta que se ha utilizado en la evaluación de la actividad eléctrica del cerebro en una amplia variedad de condiciones como la hipoxia y la isquemia. El EEG consiste en una serie de ondas en el intervalo alfa de 8 - 13 Hz (ondas  $\alpha$ ) y en el intervalo beta de 13 – 30 Hz (ondas  $\beta$ ). Normalmente el intervalo teta de 4 – 8 Hz (ondas  $\theta$ ) constituye un componente menor del EEG. La actividad en el intervalo delta de 0.5 – 4 Hz (ondas  $\delta$ ) está ausente durante la vigilia (Auer, 2004).

En la hipoglucemia, la actividad eléctrica del cerebro se modifica de manera importante, y estos cambios pueden ser observados a través del EEG, donde se presentan patrones estereotípicos que son comunes a humanos, primates y otros mamíferos (Rabinovici et al., 2000). Conforme la hipoglucemia se vuelve paulatinamente más severa, el EEG muestra una disminución en las ondas desincronizadas, de baja amplitud y alta frecuencia (ondas  $\beta$ ) y se incrementan las ondas de alta amplitud y baja frecuencia (ondas  $\theta$ ) a CSG de entre 18 – 36 mg/dL. Gradualmente se observa que las ondas decrecen en frecuencia hasta la aparición de las ondas  $\delta$  que coinciden con el estupor y la somnolencia a nivel clínico y que son el evento que antecede a la presencia del coma. Metabólicamente esta etapa corresponde con el agotamiento de los carbohidratos en el cerebro hasta que ocurre una falla energética por la ausencia casi total de glucosa. Con el incremento en la duración de la hipoglucemia las ondas  $\delta$  se vuelven menos frecuentes hasta que paulatinamente se llega a un trazo plano en el EEG conocido como *periodo isoelectrico* en donde la actividad eléctrica cerebral prácticamente cesa y que se mantiene mientras se tengan concentraciones de glucosa en sangre inferiores a 18 mg/dL. La presencia del periodo isoelectrico se ha asociado fuertemente con la necrosis neuronal (Auer 2004).

Si durante el periodo isoelectrico se administra glucosa para revertir el efecto de la hipoglucemia, en el EEG se observa un patrón de aparición de ondas recíproco al observado

previo a la llegada al periodo isoelectrico; primero aparecen las ondas  $\delta$  de gran amplitud y baja frecuencia hasta que gradualmente se recupera el patrón de ondas predominantemente  $\beta$  observado antes de la administración de insulina como se muestra en la Figura 4 (Martin del Campo et al., 2009).



**Figura 4.** Ondas que componen el electroencefalograma. La actividad eléctrica normal del cerebro se ve dominada por la presencia de ondas  $\beta$ . Mientras la hipoglucemia progresa, aparecen las ondas  $\alpha$  y conforme la hipoglucemia se hace más severa, aparecen las ondas  $\theta$  y  $\delta$ . La reversión de la hipoglucemia severa sigue un camino recíproco respecto a la aparición de las ondas (adaptado de <http://www.bem.fi/book/13/13.htm>)

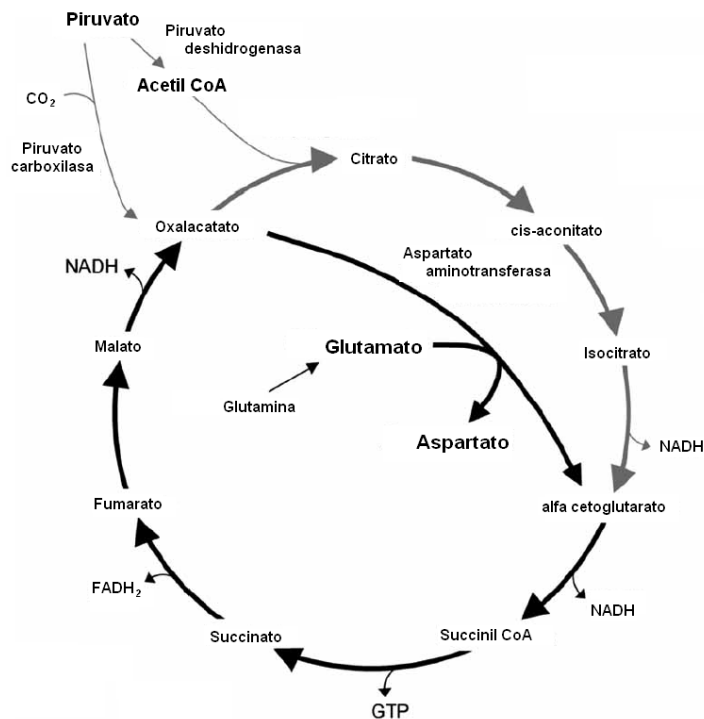
### 2.10 Alteraciones del metabolismo energético de la glucosa durante la hipoglucemia

El cerebro tiene la capacidad de sobreponerse a cortos periodos de hipoglucemia a través del consumo de las reservas de glucógeno y mediante el uso de sustratos energéticos alternos a la glucosa. Se ha demostrado que la cantidad de los transportadores GLUT1 en el lumen de los micro vasos sanguíneos del cerebro de ratas expuestas a hipoglucemia crónica se incrementa para favorecer la entrada de glucosa proveniente de las reservas de glucógeno en el hígado y en otros tejidos (Simpson et al., 2007).

Sin embargo durante la hipoglucemia severa que ocurre de manera súbita el flujo a través de la glucólisis disminuye considerablemente y en consecuencia, el piruvato que se genera en esta vía deja de proveer AcoA hacia el ciclo de Krebs y ocurren una serie de eventos que obligan a que este ciclo se adapte para mantener el flujo metabólico y la producción energética.



Esta adaptación se da de la siguiente manera: la acumulación de oxaloacetato que no puede ser convertido en citrato por la ausencia de AcoA hace que esta molécula salga del ciclo a través de una reacción de transaminación con el glutamato para generar  $\alpha$ -cetoglutarato y aspartato. El  $\alpha$ -cetoglutarato puede entrar de nuevo al ciclo de Krebs para generar succinil coenzima A expensas de una acumulación gradual de aspartato en la célula que posteriormente sale hacia el espacio extracelular. En la figura 5 se muestra una representación esquemática de la adaptación del ciclo de Krebs durante la hipoglucemia (Sutherland et al., 2008).



**Figura 5.** Adaptación del ciclo de Krebs durante la hipoglucemia. Las flechas en color gris indican las etapas del ciclo de Krebs que no ocurren durante la hipoglucemia. Las flechas negras indican la adaptación del ciclo ante este evento (Adaptado de Sutherland et al., 2008)

Otra alteración bioquímica que se produce durante la hipoglucemia es el desarrollo de la alcalosis que se debe al incremento en la producción del amonio que viene del catabolismo de proteínas y de la desaminación de aminoácidos para la producción de energía. El amonio es una base y su presencia eleva el pH intracelular. Otra razón que explica la alcalosis en la hipoglucemia es la deficiencia de lactato al interior de la célula ya que su producción se reduce debido a la sensible disminución del flujo a través de la glucólisis.

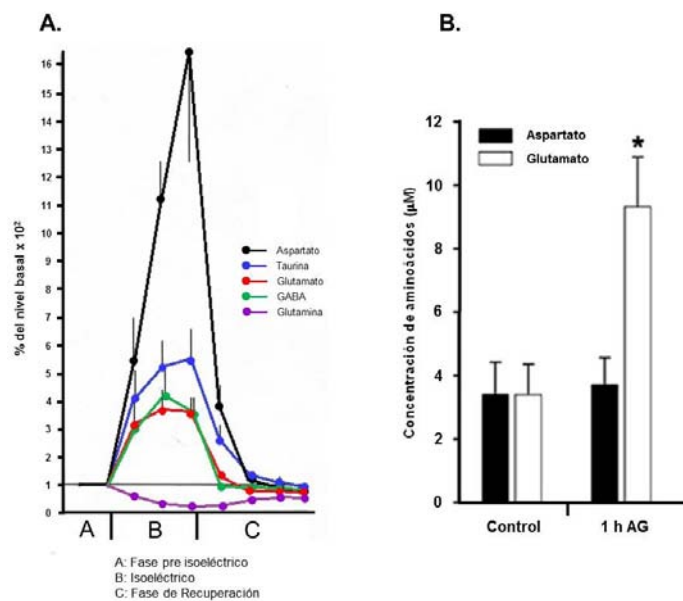
La falla energética es otra consecuencia evidente de la hipoglucemia: la fosforilación oxidativa gradualmente disminuye su actividad y el fosfato inorgánico se incrementa junto con el AMP. Una disminución abrupta del ATP ocurre de manera simultánea con la aparición del periodo isoelectrico y la disipación del gradiente de potasio en la membrana celular. Por otro lado, el equilibrio redox durante la hipoglucemia favorece el predominio de un ambiente oxidante. Así, en los pares redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{GSH}/\text{GSSG}$  (glutación reducido/glutación oxidado) y  $\text{NADP}/\text{NADPH}$  predominan las especies del par en su forma oxidada (Auer 2004; Suh et al., 2007b).

### *2.11 Mecanismos de muerte celular en la hipoglucemia*

Estudios pioneros en modelos experimentales de la hipoglucemia reportaron que para que ocurra muerte neuronal se requieren de CSG menores a 18 mg/dL acompañadas de la aparición del periodo isoelectrico y que adicionalmente, este debe tener una duración de treinta minutos o más. Bajo estas condiciones se demostró que el cerebro no es igualmente sensible a la hipoglucemia severa con presencia de periodo isoelectrico, encontrándose que las regiones más vulnerables son el subículo, las neuronas pequeñas y medianas del caudado, la región CA1, el giro dentado del hipocampo, las capas superficiales de la corteza y en menor medida el cuerpo estriado, particularmente en la región dorsolateral (Auer et al., 1984; Auer et al., 1985a; Auer et al., 1985b; Kalimo et al., 1985).

Estudios hechos en cerebros humanos de pacientes que murieron luego de un episodio de hipoglucemia severa muestran una distribución del daño neuronal semejante a la que se observa en los modelos experimentales: las neuronas en la corteza cerebral y en el hipocampo se afectan preferencialmente, seguidas de las neuronas localizadas en los ganglios basales y en el tálamo. Las neuronas del tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal son generalmente más resistentes a la hipoglucemia, al igual que las células gliales (Auer et al 1989). En otro estudio se analizó el cerebro de cuatro pacientes en estado vegetativo que quedaron en esas condiciones luego de experimentar hipoglucemia severa con presencia de coma mediante tomografía computarizada y resonancia magnética. Las imágenes obtenidas de estos pacientes mostraron que de manera análoga a los modelos experimentales existen áreas más vulnerables a la hipoglucemia como los ganglios basales, la corteza cerebral (en las regiones parietal y occipital), la *substantia nigra* y el hipocampo (Fujioka et al., 1997).

La muerte celular que se produce en la hipoglucemia ha sido objeto de múltiples estudios. En un principio se pensaba que este tipo de muerte era el resultado de la ausencia de glucosa, y en consecuencia de la ausencia de energía. Posteriormente se describieron una serie de eventos que ocurren como consecuencia de la ausencia de glucosa. Los primeros estudios en este campo revelaron que durante la hipoglucemia severa con presencia del periodo isoeléctrico existe una liberación masiva de aspartato hacia el espacio extracelular. Este incremento se debe en gran medida a la adaptación del ciclo de Krebs ante la ausencia de AcoA como se describió anteriormente. En la figura 6 se muestra el incremento del aspartato durante el periodo isoeléctrico como fue originalmente reportado por Sandberg y sus colaboradores en 1986. Estudios *in vitro* posteriores reportaron que en cultivos de neuronas hipocampales expuestas a una hora de ausencia de glucosa, el glutamato también se libera en cantidades importantes (Páramo et al., 2010).



**Figura 6.** Incremento del aspartato en un modelo de la hipoglucemia con presencia de coma (A.) e incremento del glutamato en un modelo de hipoglucemia *in vitro* (B.). Adaptado de Sandberg et al., 1986 y de Páramo et al., 2010.

La liberación de aminoácidos excitadores hacia el espacio extracelular llevó a proponer la existencia de un mecanismo excitotóxico para explicar la muerte neuronal durante la hipoglucemia. El proceso de recaptura de neurotransmisores es dependiente de energía y ya que la deficiencia energética impera durante la hipoglucemia severa, se impide entonces la recaptura de estos aminoácidos. En este sentido, se reportó que el pre tratamiento con antagonistas a los receptores tipo NMDA (receptores para *N*-metil-D-aspartato) y no NMDA

redujo de manera significativa la muerte neuronal hipoglucémica (Wieloch, 1985). Además, Butcher y sus colaboradores demostraron en 1987 que la eliminación de las aferentes glutamatérgicas corticales hacia el estriado, reduce la muerte neuronal en el estriado de ratas hipoglucémicas.

Recientemente se han hecho una serie de aportes acerca de los eventos que ocurren luego de la liberación de aminoácidos excitadores y de los mecanismos que subyacen a la muerte celular en la hipoglucemia. La activación de los receptores a NMDA por el exceso de aminoácidos excitadores en el espacio extracelular acarrea la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula, la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, la activación de proteasas dependientes de calcio como las calpains y puede causar el mal funcionamiento de la mitocondria (Lau y Tymianski, 2010).

Algunos estudios que han utilizado el modelo de hipoglucemia severa con presencia del periodo isoeléctrico han identificado que la muerte neuronal es causada por múltiples componentes desatados principalmente luego del periodo de reintroducción de glucosa para revertir la hipoglucemia severa. Suh y sus colaboradores (2003) demostraron que la enzima PARP-1 [poli (ADP-ribosa) polimerasa 1, una enzima encargada de la reparación del DNA], juega un papel importante en este tipo de muerte. Ratas con hipoglucemia severa que recibieron inhibidores de esta enzima administrados en el momento de la reintroducción de glucosa para revertir la hipoglucemia, mostraron una importante reducción de la muerte neuronal. De acuerdo con este grupo, la actividad de la PARP-1 consume el  $\text{NAD}^+$  citosólico que es necesario para la glucólisis, de manera que la activación de esta enzima por la hipoglucemia severa hace a las células incapaces de metabolizar la glucosa aun cuando la disponibilidad de este carbohidrato se restaura (Suh et al., 2007b) contribuyendo posiblemente a la muerte de estas células.

Este mismo grupo recientemente sugirió la participación de un componente inflamatorio involucrado en la muerte neuronal usando el mismo modelo de hipoglucemia: reportaron que la muerte celular y la activación de la microglía se redujo de manera significativa en la región CA1 del hipocampo luego de la administración de minociclina (una tetraciclina con propiedades antiinflamatorias) siete días después de la hipoglucemia severa con presencia del periodo isoeléctrico (Won et al., 2012).

Otros estudios han revelado la importancia de factores relacionados con la apoptosis y con la mitocondria en la hipoglucemia. Luego de un periodo isoeléctrico de treinta minutos causado por la hipoglucemia severa y de la reintroducción de glucosa por 3, horas se observó que en la cresta del giro dentado de ratas expuestas a esta condición hubo fragmentación del DNA y un aumento de la permeabilidad en la mitocondria (Ferrand-Drake et al., 1999). Este mismo grupo en 2003 demostró que luego de un periodo isoeléctrico de 30 minutos causado por hipoglucemia severa se liberan moléculas de la mitocondria como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis además de que se estimula la actividad de calpains y de caspasa 3 (Ferrand-Drake et al., 2003).

Otro estudio reciente evidenció la participación del estrés del retículo endoplásmico en la muerte hipoglucémica en un modelo *in vitro*. Cuando cultivos de neuronas hipocampales se expusieron a un medio sin glucosa se encontró que en este modelo, la ausencia de glucosa por diferentes periodos de tiempo incrementa la cantidad de núcleos apoptóticos, la actividad de las caspasas 3 y 7, y la presencia de marcadores de estrés reticular (García de la Cadena et al., 2014).

## 2.12 El estrés oxidante y su relación con la hipoglucemia

El estrés oxidante es el desequilibrio que se presenta cuando la producción de especies oxidantes supera la capacidad antioxidante de un sistema biológico para neutralizarlas. En la hipoglucemia el estrés oxidante es otro componente importante en la serie de eventos causados por la ausencia de glucosa. La participación del estrés oxidante se reportó en ratones expuestos a hipoglucemia severa sin presencia de coma. En este modelo se encontró un incremento en la peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro de ratones con una CSG <18 mg/dL (Patočová et al., 2003). En coincidencia con estos hallazgos, Haces y colaboradores (2010), en el modelo de hipoglucemia severa en ratas, reportaron un incremento en la peroxidación de lípidos antes del inicio del periodo isoeléctrico en regiones como el hipocampo, la corteza cerebral y en menor medida en el cuerpo estriado, así como un incremento en las proteínas nitrosiladas luego de la reintroducción de glucosa en las mismas regiones.

El papel del estrés oxidante durante la reintroducción de glucosa para revertir la hipoglucemia severa ha sido objeto de múltiples estudios. En este sentido se ha reportado que

la activación de la NADPH oxidasa (NOX) participa en la generación de especies reactivas de oxígeno (principalmente del anión superóxido) durante la reintroducción de glucosa. La administración de inhibidores farmacológicos de esta enzima, la expresión en cultivos neuronales de formas inactivas de la NOX y el bloqueo de su actividad a través de la ausencia de NADPH (necesario para la actividad de la NOX) mejoran la sobrevivencia celular luego de la reintroducción de glucosa. En este mismo estudio se reportó que la ausencia de zinc bloquea el ensamble del complejo NOX y la producción de superóxido (Suh et al., 2007a).

El zinc desempeña un papel importante en la generación de estrés oxidante: se ha reportado que la reintroducción de glucosa inicia la producción de óxido nítrico, que es dependiente de la estimulación de la óxido nítrico sintasa, activada a su vez por el incremento en el calcio intracelular (Szydłowska y Tymianski, 2010). El óxido nítrico lleva a la liberación del zinc, que estimula a su vez la actividad de la NOX. Las especies reactivas producidas por la enzima NOX llevan a la activación de la enzima PARP-1, a la desaparición del NAD<sup>+</sup> y finalmente a la muerte neuronal (Suh et al., 2004; Suh et al., 2007a; Suh et al., 2007b; Suh et al., 2008; Languren et al., 2013).

Estudios *in vitro* en el modelo de ausencia de glucosa han mostrado la participación de otros sistemas en la generación de especies oxidantes. En cultivos hipocámpales se reportó que la ausencia de glucosa favorece la liberación de glutamato, que estimula a los receptores tipo NMDA y no NMDA causando un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio; este incremento estimula la actividad de enzimas generadoras de especies oxidantes que son dependientes de calcio como la fosfolipasa A2 (PLA2) y la xantina oxidasa (XaO) (Páramo et al., 2010). En otro estudio con el mismo modelo se demostró que la estimulación de la actividad de las enzimas PLA2 y NOX (particularmente la enzima NOX2) favorecen la activación temprana de la calpaina después de la ausencia de glucosa y que esta enzima participa activamente en la muerte neuronal, ya que el uso de inhibidores farmacológicos de la calpaina previene la aparición de muerte neuronal (Páramo et al., 2013).

En conjunto, todos estos datos evidencian una importante participación del estrés oxidante en la hipoglucemia, tanto en etapas tempranas como durante el periodo de reintroducción de glucosa para revertir la hipoglucemia.

### **3. Planteamiento del problema**

Existe evidencia que apoya la contribución de la generación de especies oxidantes al daño inducido por la hipoglucemia severa. Sin embargo, la distribución de especies reactivas de oxígeno en regiones discretas del cerebro no se conoce ni tampoco su relación con la vulnerabilidad selectiva al daño hipoglucémico. En este trabajo se planteó investigar la generación de especies oxidantes y la degeneración celular en regiones discretas del cerebro causada por la hipoglucemia severa así como el efecto que tiene la reversión de la hipoglucemia mediante la administración de glucosa sobre estos mismos parámetros, ya que a nivel clínico, la única manera de revertir un episodio de este tipo es precisamente la administración de glucosa. Mediante esta estrategia, se busca establecer la contribución de ambos eventos por separado al daño hipoglucémico cerebral.

Por otro lado, evidencia reciente indica que los cuerpos cetónicos son capaces de neutralizar diversas especies generadoras de estrés oxidante. Adicionalmente, hay estudios que señalan que los cuerpos cetónicos pueden disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno y prevenir la muerte neuronal inducida en condiciones de falla energética causada por diversos agentes químicos. Con estos antecedentes, un modelo adecuado para probar la acción protectora de los cuerpos cetónicos en condiciones de estrés oxidante *in vivo* es el modelo de hipoglucemia severa.

En el presente estudio se investigó el efecto del cuerpo cetónico D-β-hidroxibutirato sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte neuronal en un modelo *in vivo* de hipoglucemia severa inducida por la administración de insulina.

#### **4. Hipótesis y objetivos**

Hipótesis:

*Si la administración de D-β-hidroxiacetilacetato tiene un efecto antioxidante durante la hipoglucemia severa, entonces esta reducción prevendrá la degeneración celular causada por la hipoglucemia severa.*

Objetivo principal:

Determinar el efecto del cuerpo cetónico D-β-hidroxiacetilacetato sobre la generación de estrés oxidante y la degeneración celular en regiones discretas del cerebro en un modelo *in vivo* de hipoglucemia severa.

Objetivos secundarios:

- Determinar la distribución de un marcador de la producción de especies pro oxidantes en regiones del cerebro reportadas como vulnerables al daño hipoglucémico en un modelo *in vivo* de la hipoglucemia severa.
- Establecer la posible relación entre la localización del marcador de especies reactivas de oxígeno y las células en proceso de degeneración.
- Determinar si el D-β-hidroxiacetilacetato puede reducir la generación de especies reactivas de oxígeno y la degeneración celular en distintas regiones del cerebro de ratas hipoglucémicas.



## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Modelo de hipoglucemia severa in vivo

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, de aproximadamente 3 meses de edad con un peso de entre 280 y 320 gramos; durante su alojamiento las ratas tuvieron libre acceso a agua y alimento en condiciones controladas de temperatura (22°C), luz (un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad) y humedad (30%) hasta su uso.

De manera general, las ratas se dividieron en tres grupos: un grupo *Control*, un grupo que tuvo una única administración de insulina i.p. (24 UI/Kg) para inducir una hipoglucemia severa (grupo *HS*, hipoglucemia severa) y otro grupo que recibió la administración de insulina i.p. a la misma dosis y que también recibió la administración i.p. de 500 mg/Kg de DBHB (grupo *HS+DBHB*). La dosis total del cuerpo cetónico se dividió en dos partes (figuras 7 y 8): se administraron 250 mg/Kg una hora después de la administración de insulina y los 250 mg/Kg restantes se administraron justo en el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento (P.R.). Cabe señalar que muchos animales (entre ellos las ratas) al ser forzados a permanecer con las extremidades hacia arriba, espontáneamente recuperan su postura habitual y se posan sobre la superficie apoyando sus cuatro extremidades sobre el suelo; este reflejo se conoce como *reflejo de enderezamiento*. Sin embargo, bajo condiciones como la sedación profunda y algunas otras, las ratas se encuentran imposibilitadas para ejecutar este reflejo, un hecho que se conoce como *pérdida del reflejo de enderezamiento (P.R.)*.

En los dos grupos que recibieron la administración de insulina (*HS* y *HS+DBHB*) y en el grupo *Control* se administró dihidroetidio (DHE), una molécula que al oxidarse genera etidio siendo éste último un indicador de la presencia de especies pro oxidantes. La dosis total de 6 mg/Kg de DHE que se administró fue dividida en dos partes (figuras 7 y 8): la primera de ellas una hora después de la administración de la insulina y la segunda en el momento de la P.R. Las ratas del grupo *Control* recibieron la administración de DHE a tiempos análogos a los de aquellas ratas que recibieron la administración de insulina.

Previo a la administración de insulina tanto los grupos tratados con esta hormona como el grupo control se sometieron a un ayuno de 18 horas. Estos tres grupos se manejaron bajo

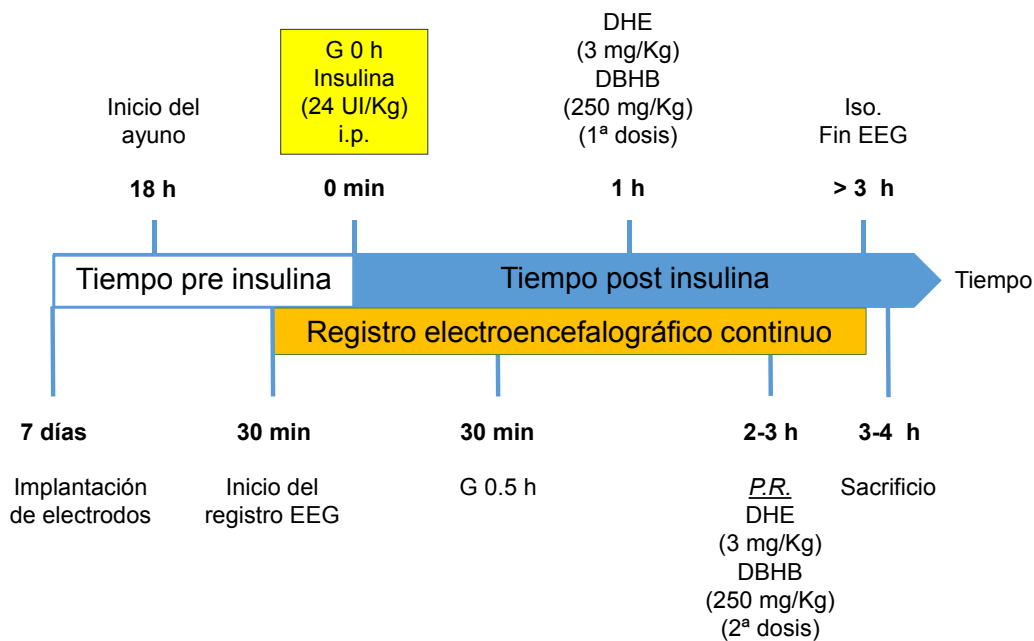
los protocolos de trabajo que se muestran en la figuras 7 y 8 (hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa e hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa respectivamente).

Durante el progreso de la hipoglucemia se monitoreó el comportamiento electroencefalográfico. Siete días antes del ensayo experimental, se hizo una pequeña cirugía de implantación de electrodos epidurales como se describe más adelante.

### *5.2 Protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa*

En este protocolo de trabajo la hipoglucemia causada por la administración de insulina se dejó progresar libremente hasta la aparición del coma o de complicaciones respiratorias en la rata. Para evaluar la progresión de la hipoglucemia se obtuvo sangre de la punta de la cola de la rata a través de una pequeña incisión midiendo la concentración de glucosa en sangre mediante un glucómetro convencional (Abbott MediSense Precision QID, Bedford MA, USA) momentos antes de la administración de insulina (glucosa al tiempo cero, *G 0*) y 30 minutos posteriores a la administración de esta (glucosa 30 min post insulina, *G 0.5*). Una hora después de la administración de insulina se procedió con la administración de DHE (en los grupos *Control*, *HS* y *HS+DBHB*) y con la de DBHB (solo en el grupo *HS+DBHB*). Esta misma secuencia de administraciones de DHE y de DBHB se repitió en el momento de la P.R. en los grupos respectivos (figura 7).

Después de la aparición del periodo isoelectrico y/o de complicaciones respiratorias (entre 3 y 4 horas posteriores de la administración de la insulina), las ratas fueron sacrificadas por punción cardiaca previa anestesia con pentobarbital. Inmediatamente después, se hizo pasar solución salina al 0.9% y luego el fijador paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos a pH de 7.4. El cerebro fue extraído y se conservó en el mismo fijador hasta su análisis posterior.



**Figura 7.** Representación esquemática del protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa. EEG: Registro electroencefalográfico; DHE: dihidroetidio; DBHB: D-β-hidroxibutirato; P.R.: pérdida del reflejo de enderezamiento; Iso.: periodo isoelectrico.

### 5.3 Protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa

El manejo de los tres grupos bajo este protocolo fue exactamente el mismo que en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa hasta antes de tres horas posteriores a la administración de insulina. Los tiempos en los que se administró tanto el DHE como el DBHB fueron los mismos que los descritos en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa, al igual que los tiempos de medición de glucosa.

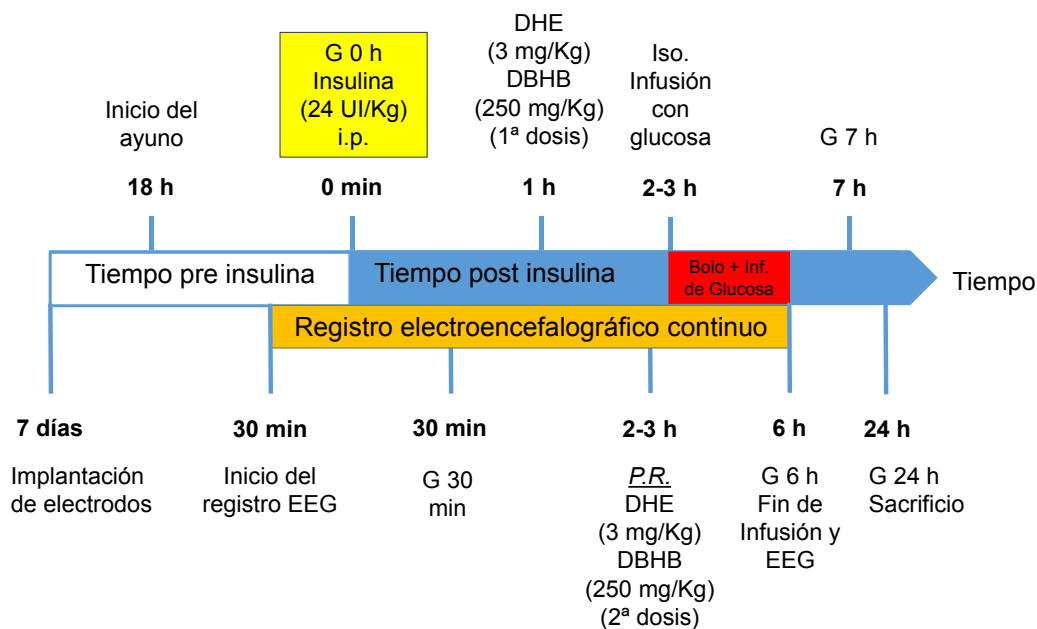
A diferencia del protocolo previo, la hipoglucemia severa (con o sin presencia del periodo isoelectrico), se revirtió mediante la infusión intravenosa de glucosa. La aparición del periodo isoelectrico generalmente ocurrió entre dos y tres horas posteriores a la administración de insulina.

Una vez alcanzado el periodo isoelectrico o bien, las tres horas post insulina, se procedió de la siguiente manera: la hipoglucemia severa se revirtió mediante la administración i.p. de 200 µL de glucosa al 50% seguida de la infusión intravenosa de glucosa al 25% en medio Krebs-Henseleit por tres horas (1.5 mL/h) mediante un catéter insertado en la vena femoral controlada por una bomba de reperfusion (Harvard Apparatus 22, South Natick MA,

USA) de acuerdo con protocolos anteriormente descritos (Suh et al., 2004; Haces et al., 2010). Al final de la infusión (aprox. 6 h post insulina) se midió la concentración de glucosa (G 6 h) y si esta aún se encontraba por debajo de 20 mg/dL se administró 1 mL de glucosa al 25% i.p. Una hora después (aprox. 7 h post insulina) se midió de nuevo la concentración de glucosa (G 7 h) y si esta estaba por debajo de los 20 mg/dL se administró 1 mL más de glucosa al 25% i.p. para luego colocar a la rata en su caja con libre acceso a comida y agua. Si en alguna de estas mediciones la glucosa se encontraba por encima de los 50 mg/dL, la rata ya no recibía glucosa y directamente era colocada en su caja con libre acceso a comida y agua sin que ello implicara dejar de medir la glucosa a su tiempo respectivo (G 6 h o G 7 h).

Veinticuatro horas después de la administración de insulina se hizo una última medición de la concentración de glucosa en los tres grupos. Inmediatamente después de ésta medición se procedió con el sacrificio de igual forma a como fue descrito en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.

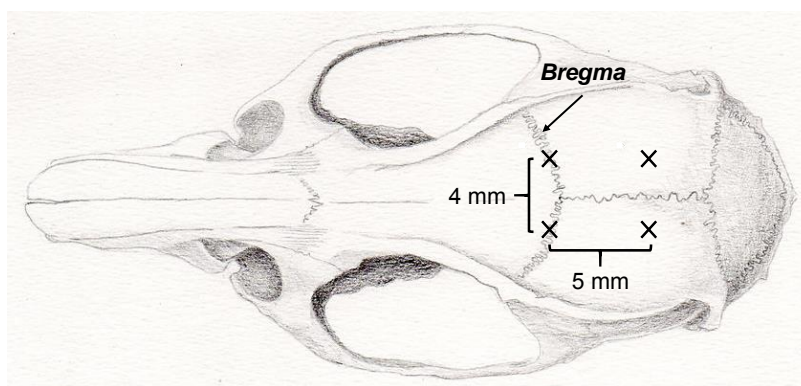
La descripción resumida de este protocolo se presenta en la figura 8:



**Figura 8.** Representación esquemática del protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. EEG: Registro electroencefalográfico; DHE: dihidroetidio; DBHB: D-β-hidroxiturato; P.R.: pérdida del reflejo de enderezamiento; Iso.: periodo isoelectrico.

#### 5.4 Registro electroencefalográfico (EEG)

Tanto en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa como en el de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa se hizo un registro EEG con la finalidad de evaluar la presencia del periodo isoeléctrico en las ratas (Figuras 7 y 8). Siete días antes del ensayo experimental se practicó una cirugía de implantación de electrodos epidurales que se fijaron con cemento dental sobre el cráneo de la rata. La localización de los electrodos se esquematiza en la figura 9. Un par de electrodos se implantó 2 mm a la derecha y 2 mm a la izquierda de la línea media sobre Bregma y en esos mismos puntos, 5 mm hacia la parte posterior del cráneo se implantó un segundo par de electrodos:



**Figura 9.** Esquema en donde se muestran los sitios de implantación de los electrodos epidurales (marcados con x) para el registro EEG.

El registro EEG se inició 30 minutos antes de la administración de insulina y se mantuvo hasta que se presentara el periodo isoeléctrico o que hubiera dificultades respiratorias evidenciadas conductualmente en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa. El registro se mantuvo hasta el fin de la reperusión de glucosa en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.

#### 5.5 Histología

Sin importar el protocolo de trabajo, el cerebro recién extraído se colocó en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M durante al menos 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo, el cerebro se sumergió en gradientes de sacarosa: primero en sacarosa al 20% por un día y finalmente en sacarosa al 30% por dos días más.

Secciones coronales de 25  $\mu\text{m}$  de espesor se obtuvieron en un criostato (Leica CM 1510 S, Alemania) desde + 1.70 mm hasta - 4.20 mm respecto a Bregma de acuerdo con el atlas del cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1986), procurando colectar un corte en las regiones que se describirán más adelante y montándolo sobre un portaobjetos recubierto con gelatina.

#### 5.5.1 Tinción de Fluoro-Jade B.

Esta tinción se hizo para evidenciar la presencia de células en proceso de degeneración de acuerdo con el protocolo descrito por Haces y cols. (2010). Los cortes coronales montados en portaobjetos cubiertos con gelatina fueron secados a 50°C durante 30 minutos. Después, se cubrieron con etanol al 80% durante 5 minutos desechando los sobrantes y lavando con agua. Enseguida, los cortes se cubrieron con etanol al 70% por 2 minutos, al término de los cuales se eliminó el etanol lavando de nuevo con agua. Los portaobjetos se cubrieron con  $\text{KMnO}_4$  al 0.06% por 10 minutos. Luego, el  $\text{KMnO}_4$  se eliminó totalmente con una serie de lavados de agua; inmediatamente después, la preparación se cubrió con Fluoro-Jade B al 0.0004% disuelto en ácido acético al 0.1% durante 25 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, el colorante se eliminó con varios lavados con agua para luego secarse a 50°C. Una vez secos, los cortes montados se sumergieron en xileno por dos minutos. Luego de este tiempo, sobre la preparación se depositaron de tres a cinco gotas de Permunt (Fisher Scientific, New Jersey, USA) y se cubrieron con un cubreobjetos limpio y desengrasado.

Los cortes de los tres grupos (*Control*, *HS* y *HS+DBHB*) se analizaron bajo el microscopio de epifluorescencia en busca de células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. Se revisaron en total 18 cortes para todos los grupos, abarcando desde + 3.20 hasta - 4.3 mm con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1986) en el siguiente orden: + 3.2, +1.7, +1.2, +0.48, +0.2, dos cortes aproximadamente a la altura de - 0.26 mm por ser la coordenada reportada en el Atlas de Paxinos y Watson como la más cercana a los cortes que fueron colectados, - 0.4, - 0.8, - 1.3, - 1.4, - 2.12, - 3.14, - 3.3, - 3.6, - 3.8, - 4.16 y - 4.3 mm con respecto a Bregma, cubriendo de esta manera las tres regiones cerebrales estudiadas: la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo.

### 5.5.2 Tinción de Hoechst

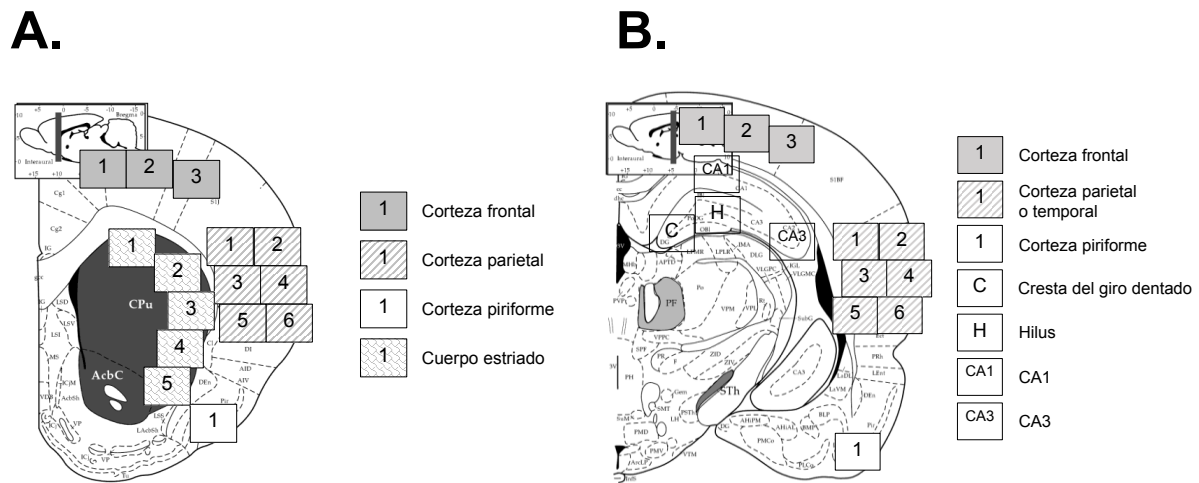
En esta tinción en todo momento se usó el buffer D-PBS (Dubelco's Phosphate-Buffered Saline, KCl 0.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L, NaCl 8 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.15 g/L) tanto como disolvente como en el lavado de los cortes coronales montados en los portaobjetos cubiertos con gelatina. Los portaobjetos con los cortes se cubrieron con D-PBS durante 5 minutos, lavando con este mismo buffer y repitiendo la operación de nuevo por 5 minutos más. Después del segundo lavado, la preparación se cubrió con el colorante Hoechst a una concentración de 0.001% disuelto en D-PBS durante 20 minutos. Al término de este tiempo el colorante se retiró con D-PBS, cubriéndolo después con este mismo buffer por espacio de 5 minutos; transcurrido este tiempo la preparación se lavó con D-PBS y la preparación se cubrió nuevamente por 5 minutos más. Finalmente se eliminaron los restos de D-PBS hasta donde fue posible y sobre la preparación se depositaron de tres a cinco gotas de Fluoromount (Electron Microscopy Sciences, Hatfield Pensilvania, USA) para finalmente cubrirla con un cubreobjetos limpio.

### 5.6 Detección de la marca positiva a etidio

La presencia de especies reactivas de oxígeno en los cortes cerebrales se determinó mediante la oxidación de la molécula de dihidroetidio (DHE). El DHE puede entrar en la célula y es el precursor reducido del etidio. En presencia del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) se transforma intracelularmente hacia etidio, el cual queda atrapado dentro de la célula debido a su naturaleza catiónica. Sin embargo, el DHE también puede ser oxidado hacia etidio por otras especies como el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El etidio emite una luz roja a 610 nm cuando se le excita con luz en una longitud de onda de 520 nm (Bindokas et al., 2003; Zhao et al., 2003; Gomes et al., 2005; Robinson et al., 2006; Kronek et al., 2012). Los cortes previamente teñidos con el colorante de Hoechst se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia. La marca positiva fue evaluada mediante el software Image J y se reportó como Unidades de Fluorescencia Arbitraria (UFA) entre el área de cada campo analizado (UFA/ $\text{mm}^2$ ). De cada individuo se analizaron seis cortes representativos: tres a la altura del cuerpo estriado (a + 1.2, + 0.2 y - 0.26 mm con respecto a Bregma) y tres cortes más a la altura del hipocampo (a - 3.14, - 3.8 y - 4.3 mm con respecto a Bregma) de acuerdo con el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1986).

Cada campo analizado tuvo una extensión superficial de 0.486 mm<sup>2</sup>. La captura de los campos en las distintas regiones analizadas se hizo de la siguiente manera:

- En cada uno de los tres cortes a la altura del cuerpo estriado se capturaron 3 campos en la corteza frontal sobre las capas medias; 6 campos en la corteza parietal cubriendo todas las capas de ésta región de la corteza; se capturó un campo en la corteza piriforme cubriendo la segunda capa de ésta región y finalmente, se capturaron 5 campos en el cuerpo estriado. Las regiones en donde se hizo la captura se muestran a detalle en la figura 10 A.
- En cada uno de los tres cortes a la altura del hipocampo se capturaron 3 campos en la corteza frontal sobre las capas medias; 6 campos en la corteza parietal o temporal, según correspondiera de acuerdo con el corte, y cubriendo todas las capas de ésta corteza; se capturó un campo en la corteza piriforme cubriendo la segunda capa de ésta región y finalmente, sobre el hipocampo se capturó un campo en la cresta del giro dentado, un campo sobre el hilus que incluye las hojas dorsal y ventral del giro dentado, un campo sobre la región CA1 y un campo más sobre la región CA3. Las regiones en donde se hizo la captura se muestran a detalle en la figura 10 B.



**Figura 10.** Representación esquemática del número de campos capturados y su la localización aproximada. **A.** Se muestran los campos capturados a la altura del cuerpo estriado. **B.** Se muestran los campos capturados a la altura del hipocampo.



## 5.7 Estadística

Todos los datos están expresados como la media grupal  $\pm$  el error estándar de la media y se analizaron con la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de significancia mínima de Fisher con la ayuda del programa StatView para Windows. Las diferencias se consideran significativas si  $p < 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1 Evolución de la hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa

En el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa sólo se tuvieron dos mediciones de glucosa como se muestra en la figura 7 y en la tabla 3. La primera medición se hizo momentos antes de la administración de insulina (G 0 h) y la segunda 30 minutos después (G 0.5 h).

**Tabla 3.** Evolución de la hipoglucemia en el esquema sin reintroducción de glucosa.

Grupo	G 0 h (mg/dL)	G 0.5 h (mg/dL)
<i>Control</i> (n = 3)	66.6 ± 3.7	-
<i>HS</i> (n = 7)	83.7 ± 6.5	26.6 ± 2.6
<i>HS+DBHB</i> (n = 8)	88.6 ± 6.9	25 ± 2

En la primera medición, las concentraciones sanguíneas de glucosa (CSG) en promedio estuvieron entre los 66.6 y los 88.6 mg/dL sin que hubiera diferencias significativas entre los grupos a este tiempo. Treinta minutos después de la primera medición hubo una clara disminución en la CSG tanto en el grupo *HS* como en el grupo *HS+DBHB* sin que se observaran diferencias significativas entre los dos grupos. La medición de glucosa en el grupo *Control* no se hizo en el tiempo de treinta minutos.

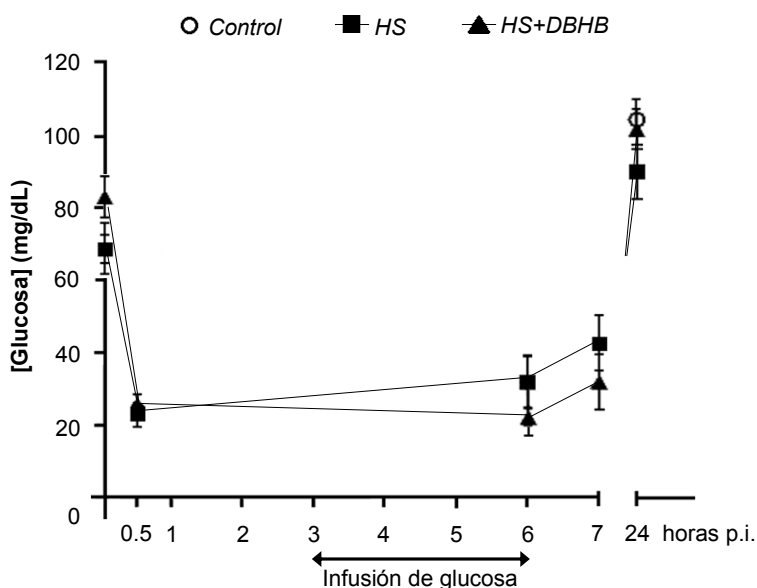
### 6.2 Evolución de la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa

En este protocolo de trabajo se hicieron cinco mediciones de glucosa en la sangre de las ratas como se muestra en la tabla 4, la figura 8 y cuyos resultados se presentan en la figura 11.

**Tabla 4.** Evolución de la hipoglucemia en el protocolo con reintroducción de glucosa.

<b>Grupo</b>	<b>G 0 h (mg/dL)</b>	<b>G 0.5 h (mg/dL)</b>	<b>G 6 h (mg/dL)</b>	<b>G 7 h (mg/dL)</b>	<b>G 24 h (mg/dL)</b>
<i>Control (n = 3)</i>	68.7 ± 3.8	-	-	-	104.7 ± 5.2
<i>HS (n = 8)</i>	68.5 ± 7	22.9 ± 3.3	32.1 ± 7.1	42.7 ± 7.7	90.1 ± 7.3
<i>HS+DBHB (n = 7)</i>	83.1 ± 5.3	25.7 ± 2.9	22.4 ± 2.3	32 ± 7.6	101.8 ± 5.4

La primera medición se hizo momentos antes de la administración de insulina (G 0 h), y se encontraron CSG promedio que estuvieron entre los 68.5 y los 83.1 mg/dL. La segunda medición se hizo treinta minutos después de la administración de insulina (G 0.5 h) y se encontró que en los dos grupos que recibieron la administración de ésta hormona hubo una clara disminución de la CSG. Después de la aparición del periodo isoelectrico o de que se cumpliera el tiempo de tres horas post insulina sin llegar al periodo isoelectrico, se administró glucosa para revertir la hipoglucemia severa. Luego de la administración i.p. de 200  $\mu$ L de glucosa al 50%, se dio inicio a la infusión intravenosa de glucosa al 25%; esta infusión tuvo una duración de 3 horas. Al término de la infusión se hizo la siguiente medición de glucosa (aproximadamente 6 horas después de la administración de insulina, G 6 h) encontrándose que la CSG en los dos grupos que recibieron la administración de insulina se mantuvo cercana a los 30 mg/dL. A este tiempo, las ratas ya habían recuperado el reflejo de enderezamiento y en algunos casos mostraron un comportamiento ambulatorio. La siguiente medición se hizo una hora después del término de la infusión de glucosa (G 7 h). En la tabla 4 y en la figura 11 puede observarse la lenta reversión de la hipoglucemia a través del ligero incremento en la CSG en los grupos *HS* y *HS+DBHB*. La última medición de glucosa se hizo 24 horas después de la administración de insulina (G 24 h). A este tiempo, en todos los grupos se recuperó la euglucemia. Cabe señalar que en ninguna de las mediciones de glucosa pertenecientes a este protocolo hubo diferencias significativas entre los grupos. La CSG del grupo *Control* se midió solo a los tiempos G 0 h y G 24 h.



**Figura 11.** Concentración sanguínea de glucosa en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. El tiempo que se muestra es el tiempo transcurrido después de la administración de insulina (horas post insulina, p.i.). Aproximadamente tres horas después de la administración de insulina se inició la infusión intravenosa de glucosa y se mantuvo durante tres horas de manera continua. En la gráfica se muestra la media grupal  $\pm$  el error estándar de la media. *Control* (n = 3); *HS* (n = 8); *HS+DBHB* (n = 7).

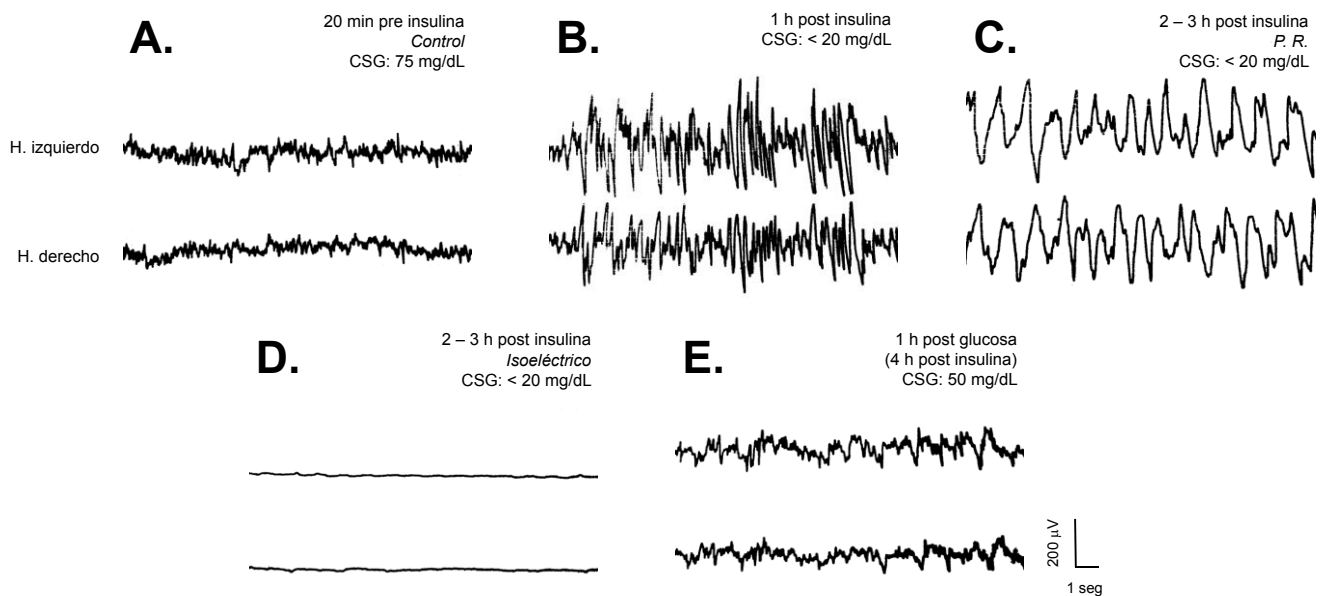
### 6.3 Comportamiento electroencefalográfico antes, durante y después de la hipoglucemia severa.

En la figura 12 se muestra el registro electroencefalográfico representativo de una rata que recibió la administración de insulina alcanzando una hipoglucemia severa (CSG < 20 mg/dL) acompañada de la aparición del periodo isoeléctrico y de la posterior reversión del isoeléctrico y de la hipoglucemia mediante la infusión intravenosa de glucosa. En la figura 12 A se observan ondas de poca amplitud y alta frecuencia 20 minutos antes de la administración de insulina (registro control, con una CSG de 75 mg/dL). Una hora después de la administración de insulina se alcanzó la hipoglucemia severa y esta se evidenció en el registro EEG con la aparición de ondas de mayor amplitud y de menor frecuencia con respecto a las observadas en el registro control y que permanecieron así durante cerca de una hora (Figura 12 B).

La aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento (P.R.) (aproximadamente entre 2 - 3 post insulina) se reflejó en el registro EEG (Figura 12 C) con la aparición de ondas aún

menos frecuentes que en la figura 12 B de la misma amplitud. Estas ondas gradualmente fueron desapareciendo hasta que el trazo en el registro EEG se aplanó en su totalidad (Figura 12 D) evidenciando la presencia del periodo isoeléctrico que es el cese de la actividad eléctrica en el cerebro causado por la ausencia de glucosa (entre 2 - 3 h post insulina). La reversión del periodo isoeléctrico y de la hipoglucemia por la infusión i.v. de glucosa se hizo evidente en el registro EEG en la figura 12 E, en donde se muestra el comportamiento que se observa una hora después del inicio de la infusión (aproximadamente 4 horas post insulina), con la aparición de ondas de una amplitud y frecuencia semejantes a las que se observan en el registro control (figura 12 A).

Cabe señalar que en la figura 12 A la CSG fue de 75 mg/dL y en la figura 12 E, estuvo en 50 mg/dL. Durante los registros mostrados en las figuras 12 B, 12 C y 12 D la CSG fue menor a 20 mg/dL.



**Figura 12.** Registro electroencefalográfico que muestra los cambios que ocurren durante la evolución de la hipoglucemia y su reversión mediante la infusión intravenosa de glucosa. **A.** 20 minutos antes de la administración de insulina; **B.** Una hora después de la administración de insulina; **C.** Durante la pérdida del reflejo de enderezamiento (2 – 3 h pos insulina); **D.** Durante el periodo isoeléctrico (2 – 3 h post insulina); **E.** Una hora después del inicio de la infusión de glucosa (aproximadamente 4 h post insulina). CSG: concentración sanguínea de glucosa; P. R.: pérdida del reflejo de enderezamiento

#### 6.4 Efecto del DBHB sobre la aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento y del periodo isoeléctrico en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa

En la tabla 5 y en la figura 13 A se muestra el tiempo que tardaron en promedio los grupos *HS* y *HS+DBHB* en alcanzar tanto la pérdida del reflejo de enderezamiento como el periodo isoeléctrico en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa. En este protocolo se observó que el 100% del grupo *HS* presentó la P.R. en un tiempo promedio significativamente mayor al tiempo observado en el grupo *HS+DBHB*, en donde solo el 75% del grupo alcanzó la P.R.; el resto del grupo no presentó P.R. En este mismo protocolo se observó que de los siete individuos del grupo *HS* que tuvieron P.R., cuatro alcanzaron el periodo isoeléctrico (57% del grupo) en un tiempo promedio significativamente menor al observado en el grupo *HS+DBHB* en donde de los seis individuos con presencia de P.R., sólo tres alcanzaron el periodo isoeléctrico (37% del grupo).

**Tabla 5.** Latencias para la aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento (P.R.) y del periodo isoeléctrico en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.

Grupo	Número de individuos con presencia de P.R. (%)	Tiempo promedio para alcanzar la P.R. (min)	Número de individuos con presencia de isoeléctrico (%)	Tiempo promedio para alcanzar el isoeléctrico (min)
<i>HS</i> (n = 7)	7 (100%)	179.3 ± 6.5	4 (57%)	194 ± 4.8
<i>HS+DBHB</i> (n = 8)	6 (75%)	154.3 ± 7.2*	3 (37%)	239.6 ± 12.6*

\*  $p < 0.05$  con respecto al grupo *HS* (prueba t)

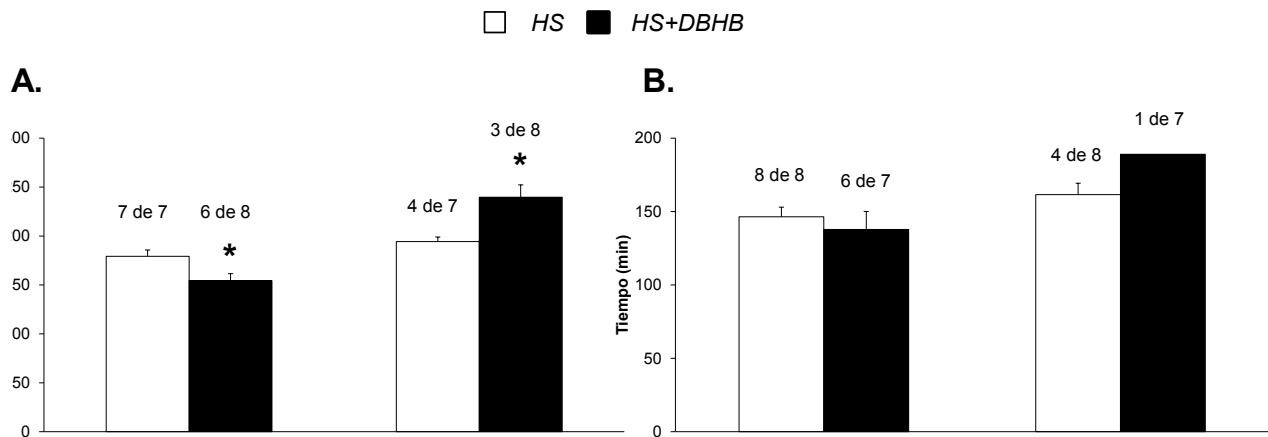
#### 6.5 Efecto del DBHB sobre la aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento y del periodo isoeléctrico en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa

En la tabla 6 y en la figura 13 B se observa que la totalidad del grupo *HS* (ocho individuos) alcanzó la P.R., mientras que en el grupo *HS+DBHB* seis de los siete individuos (86% del grupo) alcanzaron la P.R. No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de aparición de la P.R. en estos dos grupos. Por otro lado, en el grupo *HS*, cuatro de los ocho

individuos (50% del grupo) alcanzaron el periodo isoeléctrico mientras que en el grupo *HS+DBHB*, solo uno de los seis individuos con presencia de P.R. alcanzaron este periodo.

**Tabla 6.** Latencias para la aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento (P.R.) y del periodo isoeléctrico en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.

Grupo	Número de individuos con presencia de P.R. (%)	Tiempo promedio para alcanzar la P.R. (min)	Número de individuos con presencia de isoeléctrico (%)	Tiempo promedio para alcanzar el isoeléctrico (min)
<i>HS</i> (n = 8)	8 (100%)	146.4 ± 6.7	4 (50%)	161.5 ± 7.8
<i>HS+DBHB</i> (n = 7)	6 (86%)	137.8 ± 12.2	1 (14%)	189



**Figura 13.** Latencias de aparición de la pérdida del reflejo de enderezamiento (P.R.) y de la aparición del periodo isoeléctrico (Iso.) en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa (A) y en el de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa (B). En la parte superior de la barra se indica el número de individuos con presencia de P.R. o de periodo isoeléctrico, según corresponda, con respecto a la totalidad del grupo. Los datos corresponden a la media grupal ± el error estándar. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *HS* (prueba t).

La duración de los periodos isoeletricos en los individuos con presencia de este en ambos protocolos de hipoglucemia severa y el número de células positivas a Fluoro-Jade B [FJB (+)] en las tres regiones estudiadas (corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado, las regiones reportadas como las más sensibles a la hipoglucemia) se presenta en la tabla 7.

**Tabla 7.** Duración del periodo isoeletrico y su relación con el número de células Fluoro-Jade B positivas en los protocolos de hipoglucemia severa sin y con reintroducción de glucosa.

Grupo	Hipoglucemia severa SIN reintroducción de glucosa		Hipoglucemia severa CON reintroducción de glucosa	
	Duración del periodo Isoelétrico (minutos)	Número de células FJB (+) en la corteza cerebral	Duración del periodo isoeletrico (minutos)	Número de células FJB (+) en la corteza cerebral
HS	2	0	4	1057
	4	18	4.5	1289
	3	12	3	1153
	2.5	0	7	3332
HS+DBHB	2	0		
	4	115	4	2626
	11	0		

Cabe señalar que solo un individuo de siete totales en el grupo *HS+DBHB* del protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa tuvo isoeletrico y presentó células positivas a Fluoro-Jade B. Aunque desconocemos la razón por la cual este individuo tuvo presencia de isoeletrico, no podemos descartar que en esta rata el DBHB no haya tenido efecto debido a problemas relacionados con una administración deficiente o una absorción inadecuada del cuerpo cetónico.

Para el manejo posterior de los resultados, los grupos *HS* y *HS+DBHB* en los dos protocolos de trabajo (hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa e hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa) los grupos se dividieron en función de la presencia o ausencia del periodo isoeletrico (*CON Iso* o *SIN Iso*). En la tabla 8 se detalla el número de integrantes en cada grupo de acuerdo con este criterio.



**Tabla 8.** Número de ratas en los diferentes grupos experimentales de acuerdo con el protocolo de trabajo.

<b>Grupo</b>	<i>Número de ratas en el protocolo de hipoglucemia severa SIN reintroducción de glucosa</i>	<i>Número de ratas en el protocolo de hipoglucemia severa CON reintroducción de glucosa</i>
<i>Control</i>	3	3
<i>HS SIN Iso</i>	3	4
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	5	6
<i>HS CON Iso</i>	4	4
<i>HS+DBHB CON Iso</i>	3	1

En el grupo *HS+DBHB CON Iso* del protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa, hubo un solo individuo con periodo isoelectrico y este no se incluyó en los conteos de Fluoro-Jade B ni en la cuantificación de fluorescencia de etidio.

#### *6.6 La degeneración celular en la hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa*

En el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa se encontraron muy pocas células positivas a Fluoro-Jade B. El número de estas células en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado de los distintos grupos se muestra en la tabla 9. La mayoría de ellas se localizó en la corteza parietal y en menor medida en la corteza frontal, distribuidas entre las capas II a IV de esta corteza. No se encontraron diferencias significativas en el número promedio de células FJB (+) entre los grupos. Por otro lado, en el hipocampo y en el cuerpo estriado no se encontraron células FJB (+) en ninguno de los grupos.

La presencia de pocas células en degeneración en estos grupos era de esperarse, ya que se ha reportado que la muerte neuronal hipoglucémica no se presenta de manera inmediata sino que ocurre lentamente, evidenciándose principalmente después del periodo de reintroducción de glucosa (Suh et al. 2003).

**Tabla 9.** Número de células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.

Grupo	Región cerebral		
	Corteza cerebral	Hipocampo	Cuerpo estriado
Control (1 de 3)	1	0	0
HS SIN Iso (0 de 3)	0	0	0
HS+DBHB SIN Iso (2 de 5)	14 y 9	0	0
HS CON Iso (2 de 4)	18 y 12	0	0
HS+DBHB CON Iso (0 de 3)	0	0	0

Entre paréntesis al frente de cada grupo se muestra el número de individuos con presencia de células positivas a Fluoro-Jade B con respecto al número total de individuos en el grupo. En la corteza cerebral se muestra el número de células FJB (+) en cada individuo.

### 6.7 Degeneración celular en la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa

El número de células FJB (+) observado en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa se presenta en la tabla 10 y en la Figura 14.

**Tabla 10.** Número de células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa

Grupo	Región cerebral		
	Corteza cerebral	Hipocampo	Cuerpo estriado
Control	28 ± 2.1	0	0
HS SIN Iso	636 ± 249.5 *	56.3 ± 39.6	194.8 ± 78.6 *
HS+DBHB SIN Iso	25 ± 11.5 #	0	4.3 ± 2.2 #
HS CON Iso	1707.7 ± 543.5* #	116.5 ± 104	537.5 ± 474.9

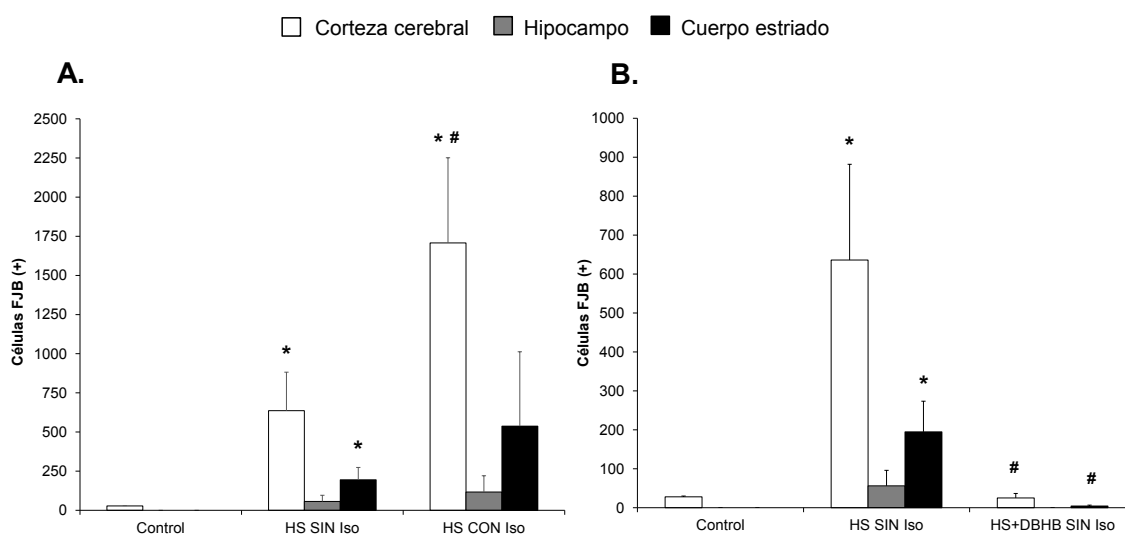
\* $p < 0.05$  con respecto al grupo Control; # $p < 0.05$  con respecto al grupo HS SIN ISO. Control: n = 3; HS SIN Iso: n = 4; HS+DBHB SIN Iso: n = 6; HS CON Iso: n = 4.

En el grupo Control hubo células FJB (+) solo en la corteza cerebral, sin que se encontraran células positivas en el hipocampo ni en el cuerpo estriado. En el grupo HS SIN Iso se observó un número de células FJB (+) en la corteza cerebral significativamente mayor al

encontrado en el grupo *Control*, mientras que en el cuerpo estriado de este mismo grupo (*HS SIN Iso*) el incremento en el número de estas células también alcanzó significancia con respecto al grupo *Control*. En el hipocampo de este grupo también se incrementó el número de células FJB (+), pero este no resultó significativo con respecto al *Control* (Figura 14 A).

La presencia del periodo isoelectrico en este protocolo elevó el número de células FJB (+) en todas las regiones estudiadas (tabla 10 y figura 14 A); sin embargo, esta elevación solo resultó significativa en la corteza cerebral con respecto al grupo *Control* y al grupo *HS SIN Iso*.

En el grupo *HS+DBHB SIN Iso*, el DHBH causó una disminución significativa en el número de células FJB (+) en la corteza cerebral y el cuerpo estriado con respecto al grupo *HS SIN Iso*. No se encontraron células FJB (+) en el hipocampo. Por otro lado, cabe mencionar que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo *Control* y el grupo *HS+DBHB SIN Iso* en ninguna de las regiones estudiadas (Figura 14 B). Imágenes de la corteza cerebral y del hipocampo pueden observarse en las figuras 18 y 19 respectivamente.



**Figura 14.** Número de células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado en los grupos pertenecientes al protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. **A.** Incremento en el número de células FJB (+) causado por el periodo isoelectrico. **B.** El DBHB previene la aparición de células FJB (+) causada por la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. Los datos corresponden a la media grupal  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*:  $n = 3$ ; *HS SIN Iso*:  $n = 4$ ; *HS+DBHB SIN Iso*:  $n = 6$ ; *HS CON Iso*:  $n = 4$ .

### 6.7.1 Distribución de las células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral

La distribución de las células FJB (+) en algunas regiones de la corteza cerebral se presenta en la tabla 11 y en la figura 15. Se observa que independientemente de la presencia de isoelectrico, las células FJB (+) se encuentran localizadas principalmente en la corteza parietal.

**Tabla 11.** Células positivas a Fluoro-Jade B en distintas regiones de la corteza cerebral.

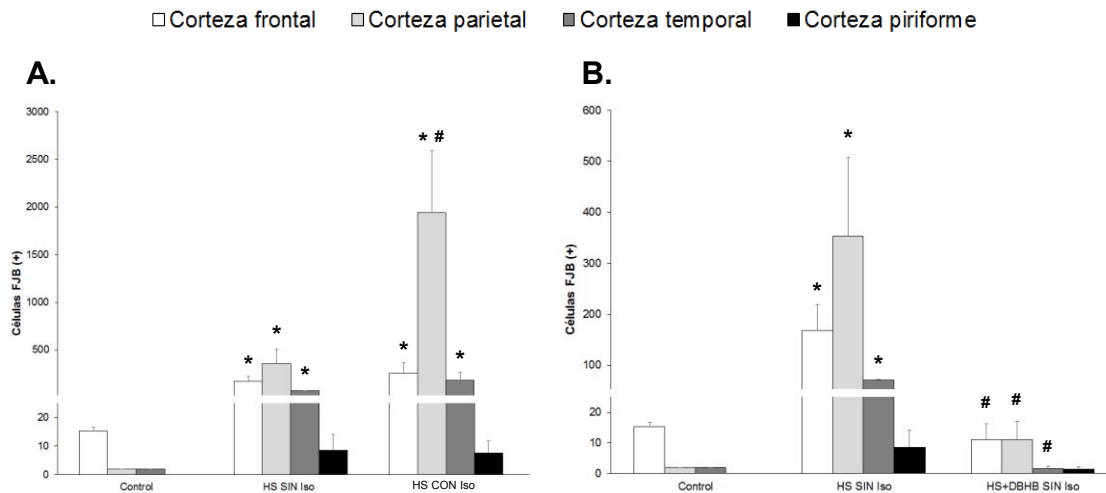
<b>Grupo</b>	<b>Corteza frontal</b>	<b>Corteza parietal</b>	<b>Corteza temporal</b>	<b>Corteza piriforme</b>
<i>Control</i>	15.3 ± 1.3	2	2	0
<i>HS SIN Iso</i>	168.3 ± 50.4*	353.7 ± 153.3*	70.5 ± 1.5*	8.5 ± 5.6
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	11 ± 5.3 <sup>#</sup>	11 ± 6 <sup>#</sup>	1.7 ± 0.6 <sup>#</sup>	1.3 ± 0.8
<i>HS CON Iso</i>	257.7 ± 107*	1942.5 ± 646.3* <sup>#</sup>	179.5 ± 81.9*	7.5 ± 4.3

\* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; <sup>#</sup> $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6; *HS CON Iso*: n = 4.

En la figura 15 A se observa que la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa causa un incremento significativo en el número de células FJB (+) con respecto al grupo *Control* en las cortezas frontal, parietal y temporal tanto en el grupo *HS SIN Iso* como en el grupo *HS CON Iso*. La presencia del periodo isoelectrico en este protocolo causó un incremento en el número de células FJB (+) en las cortezas frontal, parietal y temporal; el incremento más importante se presentó en la corteza parietal en donde el número de células FJB (+) se elevó significativamente en 5.5 veces con respecto al observado en la misma región del grupo *HS SIN Iso*, sugiriendo que esta región de la corteza cerebral es particularmente sensible a la presencia del periodo isoelectrico en comparación con las otras regiones analizadas.

Por otro lado, en la figura 15 B se observa que el incremento significativo con respecto al grupo *Control* en el número de células FJB (+) causado por la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa y sin presencia de isoelectrico en las cortezas frontal, parietal y temporal, se reduce de manera significativa por la presencia del cuerpo cetónico DBHB en estas mismas regiones hasta valores semejantes a los observados en el grupo *Control*.

En la corteza piriforme, no se observaron cambios relevantes en el número de células FJB (+) en los grupos analizados.



**Figura 15.** Número de células positivas a Fluoro-Jade B en diferentes áreas de la corteza cerebral en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. En **A** se muestra que la hipoglucemia severa incrementa el número de células FJB (+) y que la presencia de la hipoglucemia severa acompañada de isoelectrico eleva aún más el número de estas células. En **B** se muestra que el DBHB previene la aparición de células FJB (+) en las regiones más sensibles de la corteza cerebral al daño hipoglucémico. Los datos corresponden a la media grupal  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6; *HS CON Iso*: n = 4.

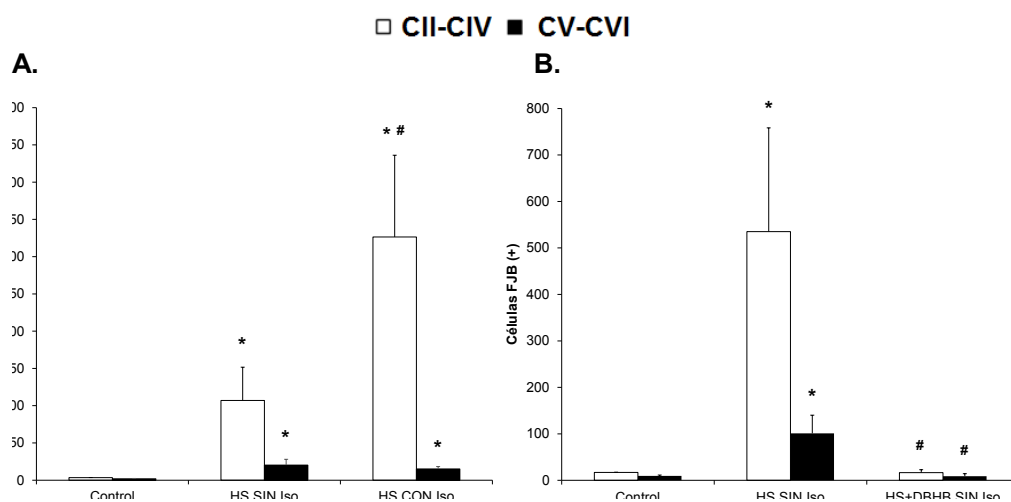
En la tabla 11 y la figura 15 se describen las regiones de la corteza cerebral más sensibles al daño hipoglucémico mientras que en la tabla 12 y en la figura 16 se muestra la distribución de estas mismas células en degeneración entre las capas de la corteza cerebral. Puede observarse que las células FJB (+) se localizan de manera preferencial entre las capas superficiales (C II a C IV) y en menor medida entre las capas profundas (C V a C VI) de estas regiones de la corteza cerebral, sugiriendo que las células de las capas superficiales son más sensibles a la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa y adicionalmente, que esta sensibilidad aumenta en presencia de isoelectrico.

Imágenes representativas de la distribución de las células FJB (+) entre las regiones y las capas de la corteza cerebral en los diferentes grupos analizados, se presentan en las figuras 17 A y 18.

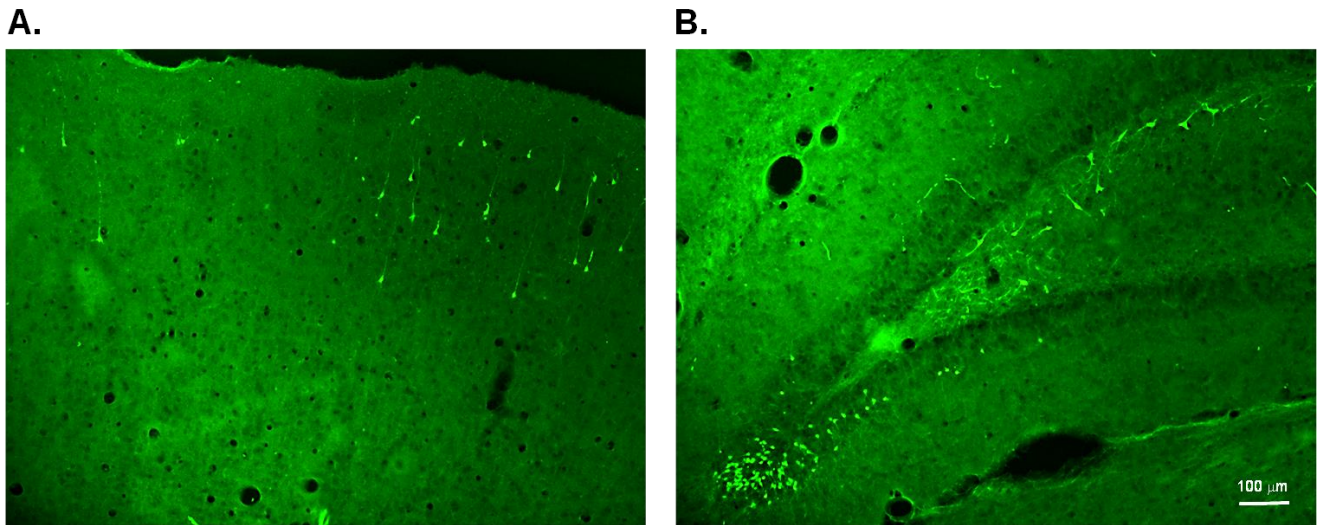
**Tabla 12.** Número de células FJB (+) en las capas de la corteza cerebral.

Grupo	Capas superficiales (C II - C IV)	Capas profundas (C V - C VI)
<i>Control</i>	17 ± 0.6	9.7 ± 0.8
<i>HS SIN Iso</i>	535 ± 223.2*	101 ± 39*
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	16.5 ± 6.3#	9 ± 5.2#
<i>HS CON Iso</i>	1632.3 ± 548* #	75.5 ± 15.7*

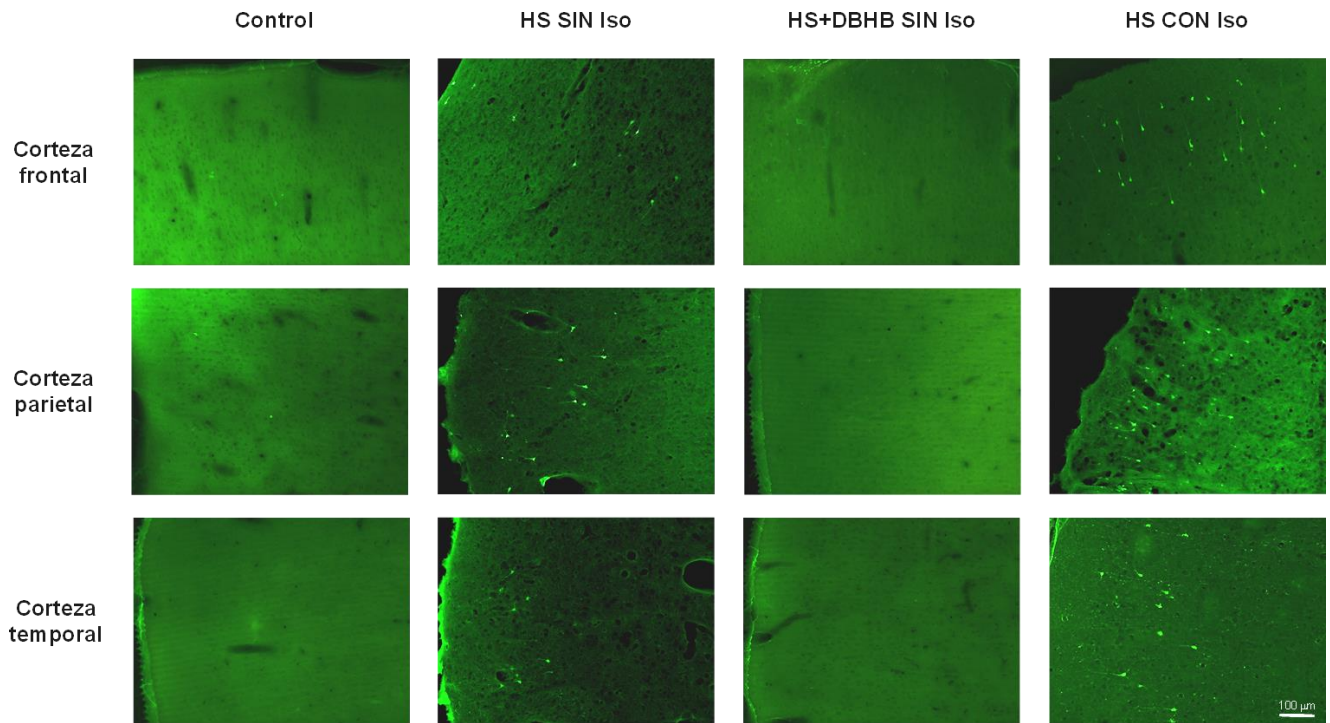
\* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6; *HS CON Iso*: n = 4.



**Figura 16.** Células positivas a Fluoro-Jade B en las capas C II a C IV y C V a C VI de la corteza cerebral. En **A** se observa que la hipoglucemia severa incrementa el número de células FJB (+) y que este número incrementa aún más en presencia de isoelectrónico en las capas superficiales y medias de la corteza cerebral; en **B** se observa que el DBHB previene la aparición de células FJB (+) en las capas de la corteza cerebral. Los datos corresponden a la media grupal ± el error estándar. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6; *HS CON Iso*: n = 4.



**Figura 17.** Distribución de las células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza cerebral y en el hipocampo en una rata con 7 minutos de periodo isoelectrico. En **A** se observa la distribución de células FJB (+) en la corteza cerebral (corteza frontal) y en **B** la distribución de las células FJB (+) en el giro dentado y el hilus del hipocampo.



**Figura 18.** Imágenes representativas que muestran la distribución de la marca positiva a Fluoro-Jade B entre las capas de las regiones de la corteza cerebral analizadas.

### 6.7.2 Distribución de las células positivas a Fluoro-Jade B en el hipocampo

Como se aprecia en la tabla 13, en el hipocampo de los grupos *HS SIN Iso* y *HS CON Iso* se encontraron células FJB (+) que se localizaron principalmente en la cresta del giro dentado y en el hilus como se muestra en las figuras 17 B y 19. Aunque en menor medida, también hubo células FJB (+) en la región CA1 del hipocampo.

En los datos de la tabla 13 se observa que la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa favorece la aparición de células FJB (+) en las regiones antes mencionadas del hipocampo; adicionalmente, este número se incrementa por la presencia del isoelectrico aunque no de la misma manera entre los individuos muy posiblemente debido a que la duración de este periodo no fue la misma en todos los casos. En este sentido es importante mencionar que la rata con el periodo isoelectrico más largo (7 minutos) fue la que presentó un mayor número de células FJB (+) en el hipocampo y es la que se presenta en la figura 17 B. De manera análoga a lo observado en la corteza cerebral, la presencia del DBHB previno la aparición de células FJB (+) en esta región cerebral.

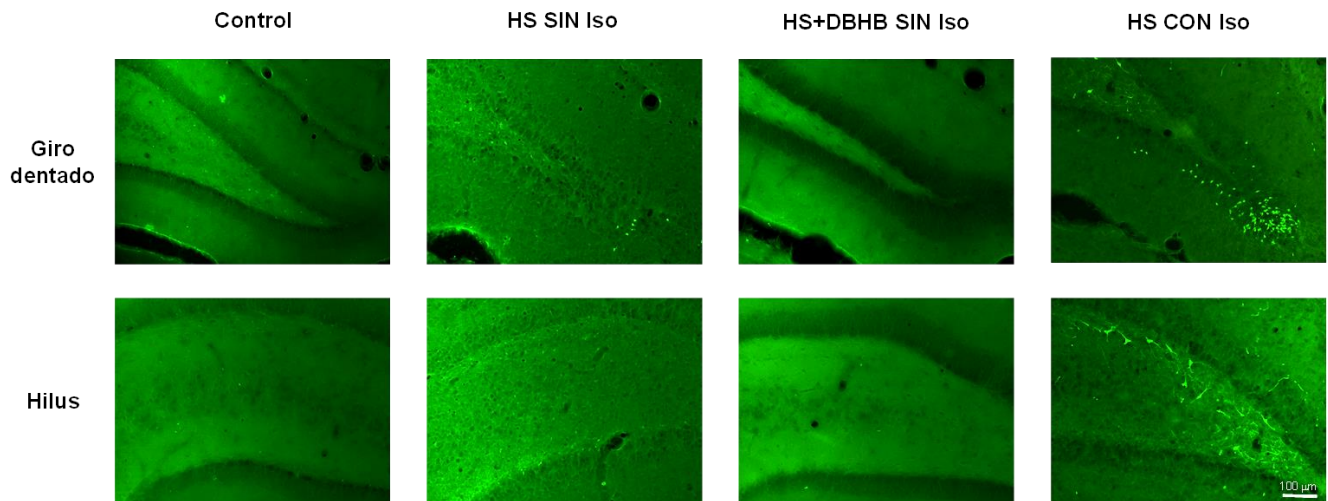
En la figura 19 se presentan imágenes representativas del giro dentado y del hilus, que son las regiones que tuvieron una mayor presencia de células FJB (+).

**Tabla 13.** Número de células positivas a Fluoro-Jade B en el hipocampo en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.

Grupo	Región del hipocampo			
	<i>Giro dentado</i>	<i>Hilus</i>	<i>CA1</i>	<i>CA3</i>
<i>Control (0 de 3)</i>	0	0	0	0
<i>HS SIN Iso (3 de 4)</i>	50, 167 y 1	2 y 1	2 y 1	1
<i>HS+DBHB SIN Iso (0 de 6)</i>	0	0	0	0
<i>HS CON Iso (4 de 4)</i>	2, 5, 10 y 377	3 y 45	2, 17 y 6	0

Entre paréntesis se muestra el número de individuos con presencia de células FJB (+) con respecto al total de individuos en el grupo. Los datos corresponden al número de células FJB (+) de manera individual.





**Figura 19.** Imágenes representativas de la marca positiva a Fluoro-Jade B en la cresta del giro dentado y en el hilus en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.

## 6.8 Producción de especies reactivas de oxígeno en el cerebro después de la hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa

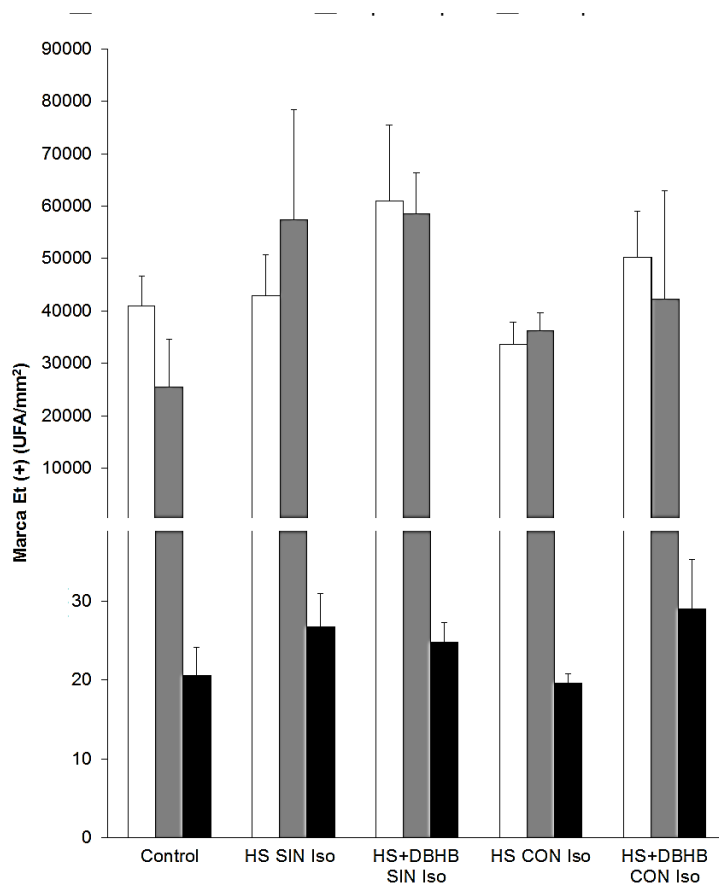
### 6.8.1 Distribución de la marca positiva a etidio en las diferentes regiones cerebrales

En la tabla 13 y en la figura 20 se muestra la cuantificación de la marca positiva a etidio [Et (+)] en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. En las primeras dos regiones se tiene una intensa marca Et (+) en todos los grupos sin que se presenten diferencias significativas entre ellos. En contraste, en el cuerpo estriado la marca Et (+) es mucho más discreta en comparación con la que se observa en la corteza cerebral y en el hipocampo.

**Tabla 14.** Intensidad de la fluorescencia de etidio en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.

Grupo	Corteza cerebral (UFA/mm <sup>2</sup> )	Hipocampo (UFA/mm <sup>2</sup> )	Cuerpo estriado (UFA/mm <sup>2</sup> )
<i>Control</i>	40888.2 ± 5723.1	25441 ± 9093.7	20.6 ± 3.6
<i>HS SIN Iso</i>	42961.5 ± 7786.4	57473.3 ± 20945.3	26.7 ± 4.3
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	61013.5 ± 14498.5	58465.8 ± 7970.5	24.8 ± 2.4
<i>HS CON Iso</i>	33624.9 ± 4191.5	36230.5 ± 3457.7	19.6 ± 1.2
<i>HS+DBHB CON Iso</i>	50232.1 ± 8786.5	42189.3 ± 20744.8	29 ± 6.4

UFA: Unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 3; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 5; *HS CON Iso*: n = 4; *HS+DBHB CON Iso*: n = 3.



**Figura 20.** No hubo diferencias en la intensidad de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado en los grupos pertenecientes al protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa. Los datos mostrados corresponden a la media grupal ± el error estándar. UFA: unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 3; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 5; *HS CON Iso*: n = 4; *HS+DBHB CON Iso*: n = 3.

Imágenes representativas de la marca Et (+) de la corteza cerebral y el hipocampo se muestran en las figuras 24 y 25 respectivamente.

Como se observa en la figura 20, la marca Et (+) presente en todos los grupos no presenta diferencias significativas, sugiriendo que las especies que fueron detectadas por la oxidación del dihidroetidio posiblemente no fueron causadas por la hipoglucemia severa sino por alguna otra causa que se encuentra presente en los tres grupos de trabajo (*Control*, *HS* y *HS+DBHB*). La única condición que comparten estos grupos es el ayuno previo a la administración de insulina.

Para tratar de establecer la posible contribución del ayuno a la generación de especies oxidantes, se compararon las intensidades de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado de los grupos *Control* de los protocolos de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa y de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa con otro grupo que no fue sometido al ayuno de 18 horas (*Control intacto*) y que de manera continua estuvo en euglucemia. En la tabla 15 y en la figura 21 se presentan los resultados de esta comparación; se muestran imágenes y datos de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado, y en la gráfica solo se muestran datos de la corteza cerebral y el hipocampo que fueron las regiones con mayor presencia de marca positiva a etidio. La marca Et (+) presente en el cuerpo estriado tuvo una intensidad despreciable frente a la intensidad que se observó en las otras dos regiones analizadas.

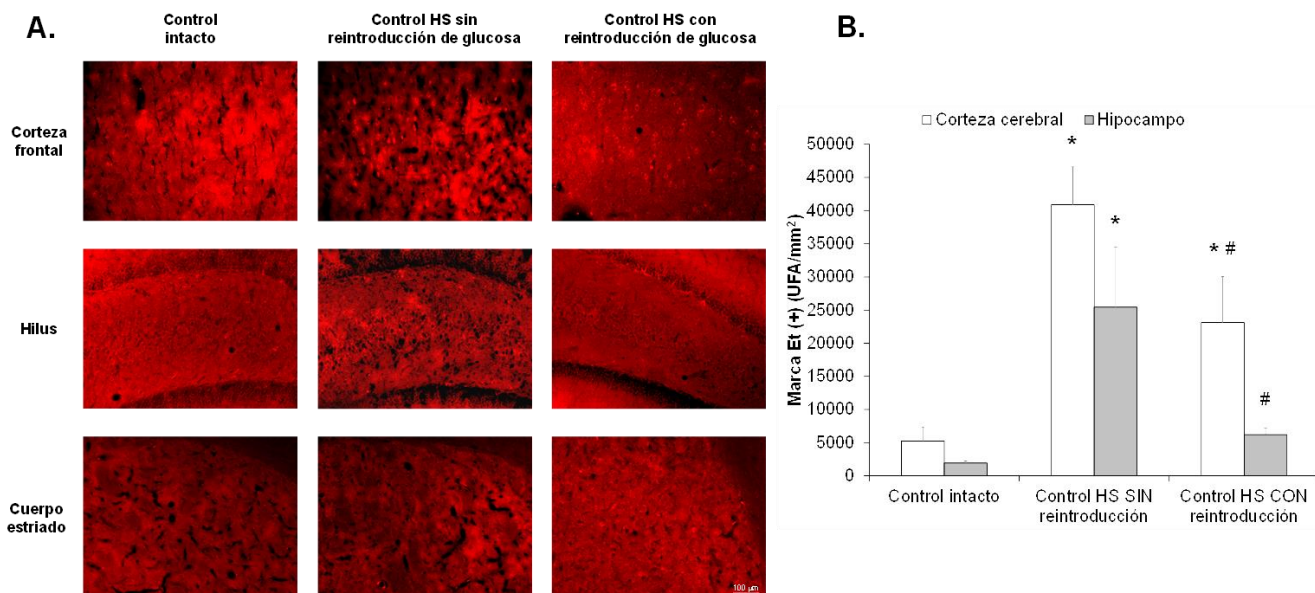
**Tabla 15.** Contribución del ayuno sobre la marca positiva a etidio

<b>Grupo</b>	<b>Corteza cerebral (UFA/mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Hipocampo (UFA/mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Cuerpo estriado (UFA/mm<sup>2</sup>)</b>
<i>Control intacto</i>	5250.5 ± 2115.7	1930.7 ± 292.6	26.5 ± 2.4
<i>Control HS SIN reintroducción</i>	40888.2 ± 5723.1*	25441 ± 9093.7*	20.6 ± 3.6
<i>Control HS CON reintroducción</i>	23126.2 ± 6927*#	6219.5 ± 998.9#	15.8 ± 1.4

\* $p < 0.05$  con respecto al grupo *Control intacto*; # $p < 0.05$  con respecto al grupo *Control HS sin reintroducción*. HS: Hipoglucemia severa. *Control intacto*: n = 4; *Control HS SIN reintroducción*: n = 3; *Control HS CON reintroducción*: n = 3.

En la figura 21 se observa claramente que en la corteza cerebral de los grupos *Control* (ayunados) de los protocolos de hipoglucemia severa sin y con reintroducción de glucosa, aumenta significativamente la intensidad de la marca Et (+) con respecto al *Control intacto* (sin ayuno). En el hipocampo del grupo *Control HS SIN reintroducción* se observó un incremento significativo en la marca Et (+) con respecto al grupo *Control intacto*.

Por otra parte, el grupo *Control HS SIN reintroducción* presentó una mayor fluorescencia que el grupo *Control HS CON reintroducción* tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo, sugiriendo que la marca Et (+) que se observa en el grupo *Control HS SIN reintroducción* puede ser consecuencia del ayuno, ya que en este grupo no se restauró la euglucemia por la administración de glucosa. Por otro lado, el aumento en la fluorescencia en el grupo *Control HS CON reintroducción* fue significativamente menor que la del grupo sin reintroducción de glucosa, sugiriendo que las especies generadas por efecto del ayuno quizá disminuyen más rápidamente en el hipocampo y más lentamente en la corteza cerebral luego la restauración de la euglucemia.



**Figura 21.** Marca positiva a etidio en el grupo *Control intacto* (n = 4), *Control HS SIN reintroducción* (n = 3) y *Control HS CON reintroducción* (n = 3). **A.** Imágenes representativas de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado de estos tres grupos **B.** Intensidad de la marca Et (+) en la corteza cerebral y el hipocampo. En la gráfica se muestra la media grupal  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al grupo *Control intacto*; # $p < 0.05$  con respecto al grupo *Control HS sin reintroducción*. HS: hipoglucemia severa; UFA: unidades de fluorescencia arbitraria.

### 6.8.2 Distribución de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral

En la tabla 16 y en la figura 22 se muestra la distribución de la marca Et (+) en las regiones de la corteza cerebral estudiadas.

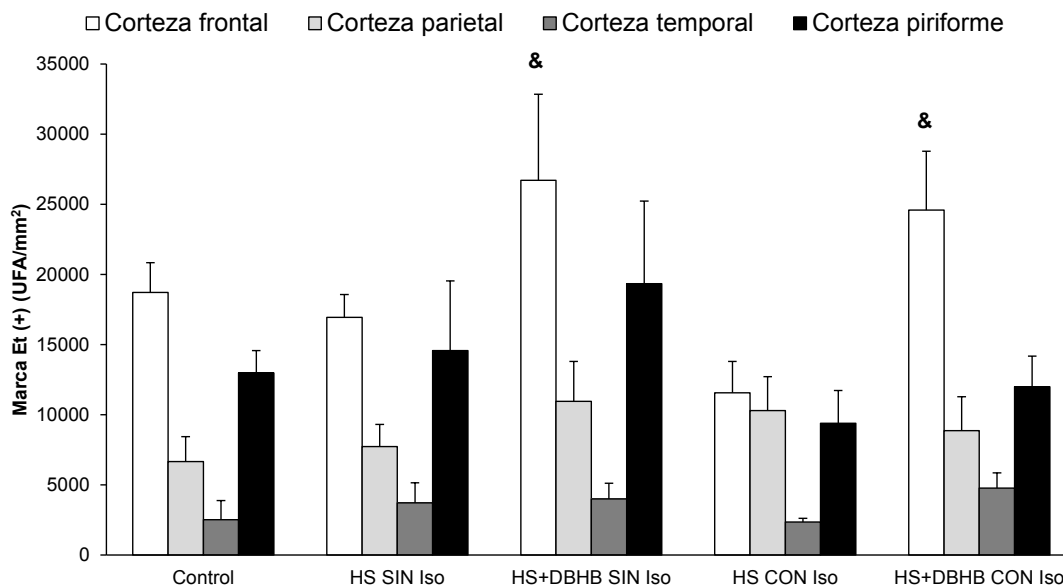
**Tabla 16.** Intensidad de la fluorescencia de etidio en distintas regiones de la corteza cerebral.

Grupo	Corteza frontal (UFA/mm <sup>2</sup> )	Corteza parietal (UFA/mm <sup>2</sup> )	Corteza temporal (UFA/mm <sup>2</sup> )	Corteza piriforme (UFA/mm <sup>2</sup> )
<i>Control</i>	18715.4 ± 2132.1	6667.4 ± 1775.2	2526 ± 1360.6	12979.4 ± 1597.2
<i>HS SIN Iso</i>	16944.4 ± 1620.4	7729.9 ± 1587.3	3715.8 ± 1443.5	14571.3 ± 4963.6
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	26709 ± 6139.5 <sup>&amp;</sup>	10957.4 ± 2844.2	3997.3 ± 1120.1	19349.8 ± 5883.3
<i>HS CON Iso</i>	11573.6 ± 2223.7	10294.5 ± 2429.6	2352.4 ± 273.7	9404.3 ± 2327.9
<i>HS+DBHB CON Iso</i>	24590.8 ± 4193.5 <sup>&amp;</sup>	8864.3 ± 2427.2	4783.2 ± 1071.4	11993.8 ± 2188.2

<sup>&</sup>p<0.05 con respecto al grupo *HS CON Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 3; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 5; *HS CON Iso*: n = 4; *HS+DBHB CON Iso*: n = 3.

La marca positiva a etidio se encontró principalmente en las cortezas frontal y piriforme y en menor medida en las cortezas parietal y temporal como se muestra en la figura 22; entre las capas de la corteza, esta marca se localiza en las capas intermedias de la corteza frontal (entre C III y C IV) y en las capas más superficiales e intermedias en la corteza parietal y temporal (entre C II y C IV); en la corteza piriforme la marca sigue una distribución muy semejante. La intensidad de la marca Et (+) en las cortezas parietal, temporal y piriforme no presentó cambios significativos entre los grupos. Sin embargo, en la corteza frontal de los grupos *HS+DBHB SIN Iso* y *HS+DBHB CON Iso* se observó un incremento significativo en la marca Et (+) con respecto al grupo *HS CON Iso*. Otros cambios en la intensidad de marca Et (+) en esta misma corteza no resultaron significativos.

Imágenes representativas de la marca Et (+) en las distintas regiones de la corteza en los grupos pertenecientes a este protocolo se muestran en la figura 24.



**Figura 22.** Marca positiva a etidio en las cortezas frontal, parietal, temporal y piriforme en los grupos pertenecientes al protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa. Los datos corresponden a la media grupal  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al grupo *HS CON Iso*. UFA: unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 3; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 5; *HS CON Iso*: n = 4; *HS+DBHB CON Iso*: n = 3.

### 6.8.3 Distribución de la marca positiva a etidio en el hipocampo

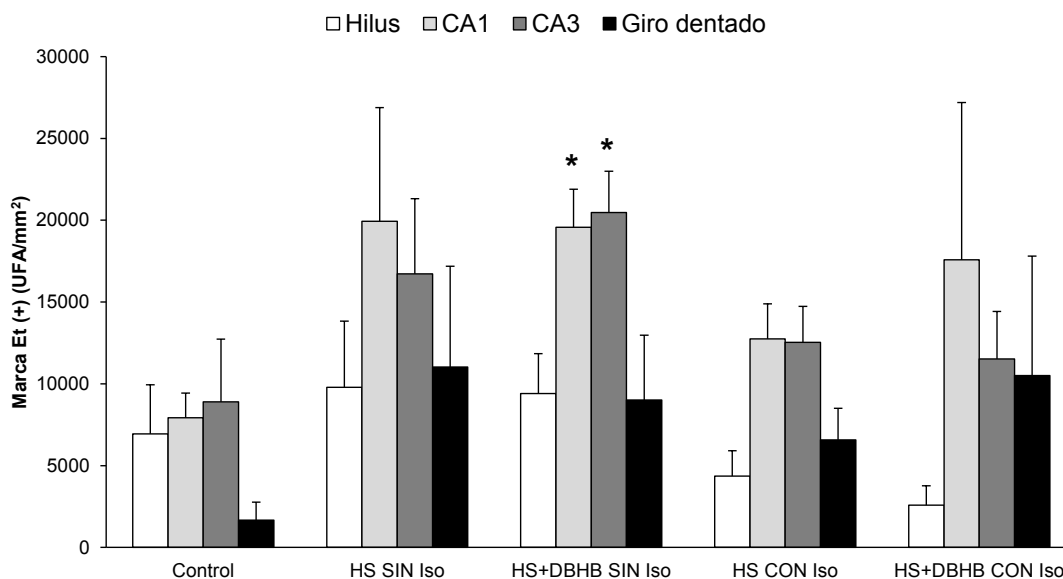
En la figura 23 y en la tabla 17 se muestra que la intensidad de la marca Et (+) se incrementa en todos los grupos que estuvieron en hipoglucemia severa en las regiones CA1 y CA3. Este incremento fue significativo en el grupo *HS+DBHB SIN Iso* con respecto al grupo *Control*. La presencia del DBHB no tuvo efecto sobre el incremento observado en las regiones CA1 y CA3 en el grupo *HS+DBHB SIN Iso* con respecto a las mismas regiones del grupo *HS SIN Iso*. Los cambios que se observan en otros grupos y regiones no resultaron significativos.

En la figura 25 se muestran imágenes representativas de la marca Et (+) en las regiones del hipocampo que fueron analizadas.

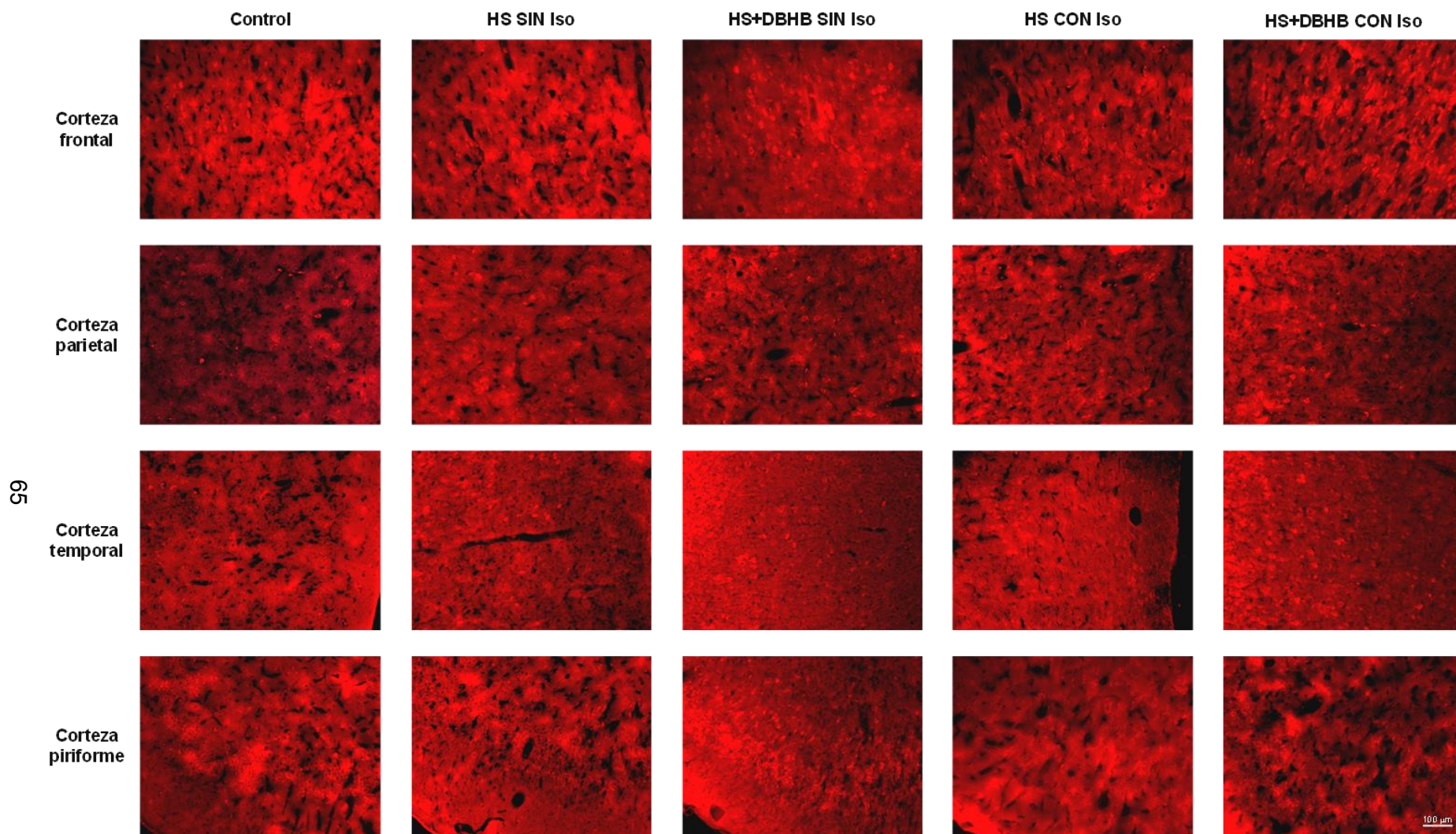
**Tabla 17.** Intensidad de la marca positiva a etidio en diversas regiones del hipocampo.

Grupo	Hilus (UFA/mm <sup>2</sup> )	CA1 (UFA/mm <sup>2</sup> )	CA3 (UFA/mm <sup>2</sup> )	Giro dentado (UFA/mm <sup>2</sup> )
<i>Control</i>	6941.7 ± 2998.8	7922.5 ± 1513.4	8903.3 ± 3834.4	1673.5 ± 1097.3
<i>HS SIN Iso</i>	9787.4 ± 4044.4	19937.6 ± 6940.8	16717.4 ± 4606	11030.9 ± 6150.8
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	9406.6 ± 2434.1	19567.1 ± 2330.2*	20474.5 ± 2516.8*	9017.7 ± 3848.7
<i>HS CON Iso</i>	4364.2 ± 1542.3	12751 ± 2145.4	12539.1 ± 2202.1	6576.1 ± 1925.7
<i>HS+DBHB CON Iso</i>	2578.9 ± 1191.4	17576.1 ± 9618.3	11527.4 ± 2899.2	10506.9 ± 7306.6

\* $p < 0.05$  con respecto al grupo *Control*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 3; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 5; *HS CON Iso*: n = 4; *HS+DBHB CON Iso*: n = 3.

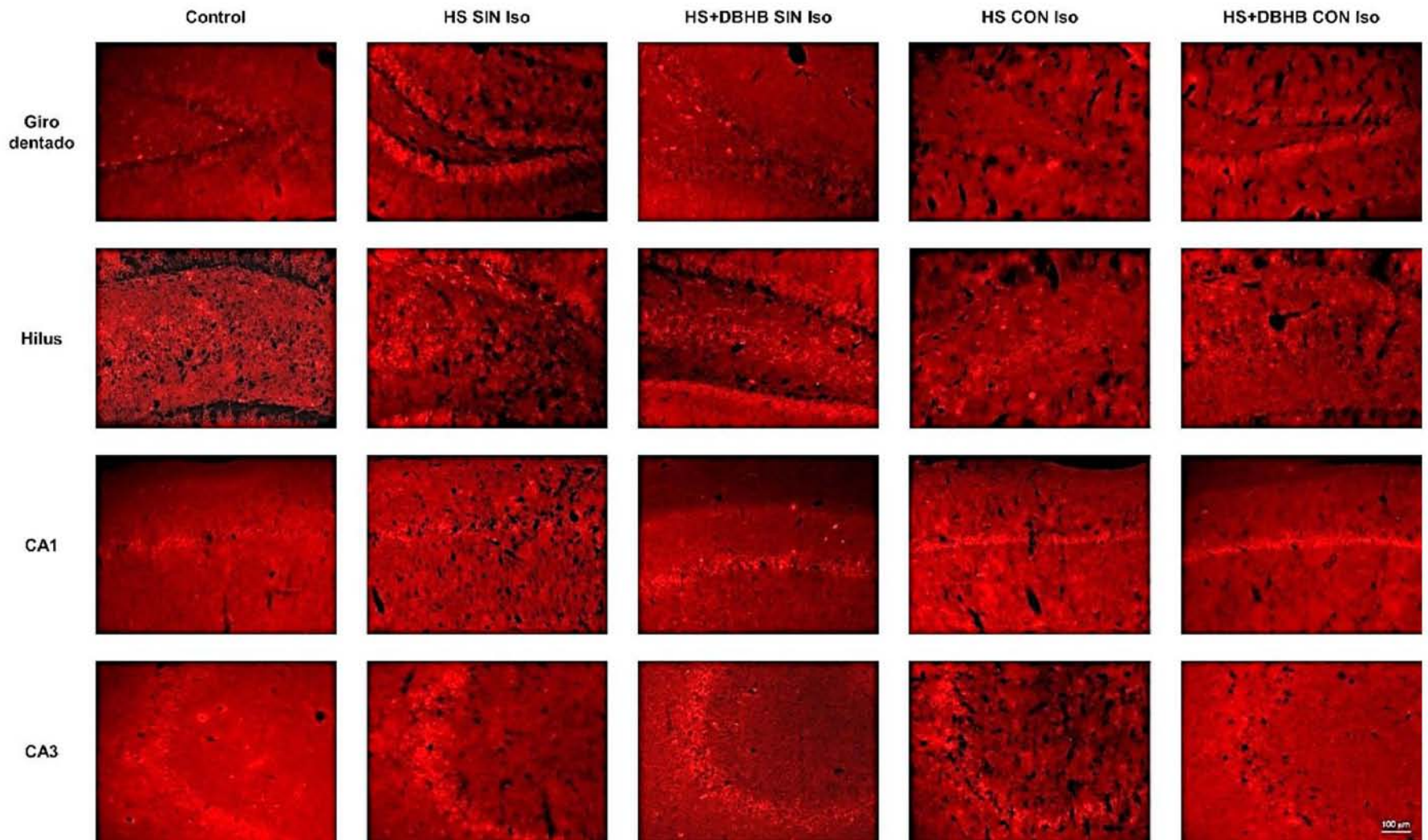


**Figura 23.** Marca positiva a etidio en el hilus, las regiones CA1 y CA3 y el giro dentado del hipocampo en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa. Los datos que se presentan corresponden a la media grupal ± el error estándar. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*. UFA: unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 3; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 5; *HS CON Iso*: n = 4; *HS+DBHB CON Iso*: n = 3.



**Figura 24.** Imágenes representativas de la marca positiva a etidio en las cortezas frontal, parietal, temporal y piriforme en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.





**Figura 25.** Imágenes representativas de la marca positiva a etidio en el giro dentado, el hilus y las regiones CA1 y CA3 del hipocampo en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa.

## 6.9 Producción de especies reactivas de oxígeno en el cerebro después de la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa

### 6.9.1 Distribución de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral y el hipocampo

En la tabla 18 y la figura 26 muestra que la marca positiva a etidio en los grupos con hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.

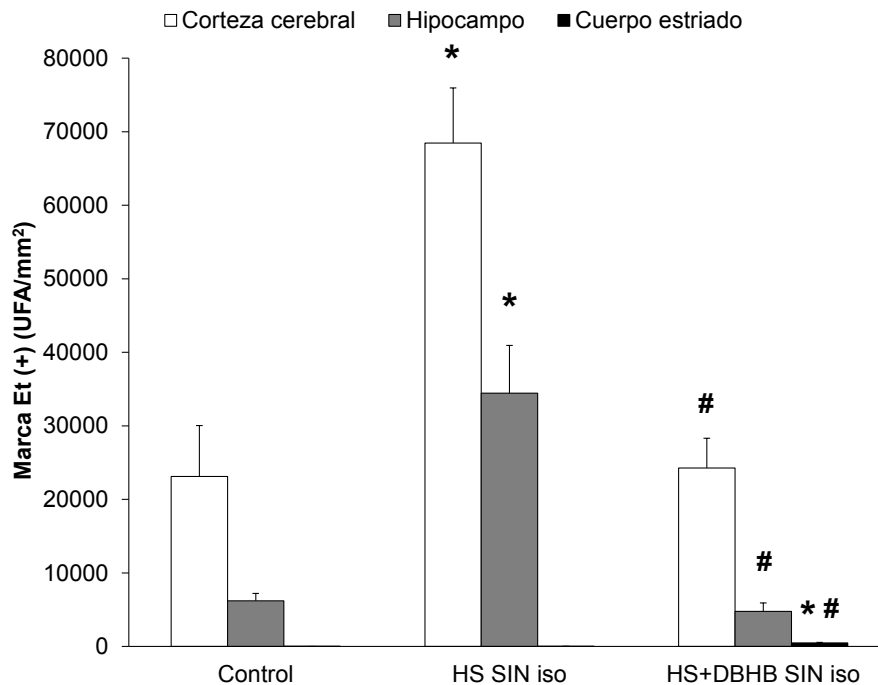
**Tabla 18.** Marca positiva a etidio en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado

Grupo	Corteza cerebral (UFA/mm <sup>2</sup> )	Hipocampo (UFA/mm <sup>2</sup> )	Cuerpo estriado (UFA/mm <sup>2</sup> )
<i>Control</i>	23126.2 ± 6927	6219.5 ± 998.9	15.8 ± 1.4
<i>HS SIN Iso</i>	68456.4 ± 7501.3*	34448 ± 6500.5*	18.3 ± 2.9
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	24270.2 ± 4052.6 <sup>#</sup>	4771.6 ± 1146.8 <sup>#</sup>	476.9 ± 87.5* <sup>#</sup>

\* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; <sup>#</sup> $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6.

Se observa que la marca Et (+) se localizó preferentemente en la corteza cerebral y en el hipocampo. En el grupo *HS SIN Iso* hubo un incremento significativo de esta marca de 2.9 veces en la corteza cerebral y de 5.5 veces en el hipocampo con respecto a las mismas regiones del grupo *Control*. En el grupo *HS+DBHB SIN Iso* se observó una disminución significativa en la marca Et (+) tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo con respecto a la intensidad que se observó en las mismas regiones del grupo *HS SIN Iso*; esta disminución no tuvo diferencias significativas contra la intensidad de la marca en la corteza cerebral y el hipocampo en el grupo *Control*. La marca Et (+) en el cuerpo estriado del grupo *HS+DBHB SIN Iso* presentó un incremento significativo con respecto a los grupos *Control* y *HS SIN Iso* que como se aprecia en la figura 26, es de una intensidad mucho menor en comparación con la intensidad de la marca Et (+) en la corteza cerebral y el hipocampo.

Imágenes representativas de la marca Et (+) en la corteza cerebral se presentan en la figura 28 y del hipocampo en la figura 30.



**Figura 26.** La marca positiva a etidio en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa se localizó más intensamente en la corteza cerebral y el hipocampo del grupo *HS SIN Iso*. En la figura se muestra que este incremento se revirtió por el cuerpo cetónico D-β-hidroxitbutirato. Las barras representan la media grupal ± el error estándar de la media. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. UFA: unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*:  $n = 3$ ; *HS SIN Iso*:  $n = 4$ ; *HS+DBHB SIN Iso*:  $n = 6$ .

### 6.9.2 Distribución de la marca positiva a etidio en la corteza cerebral

La presencia de marca positiva a etidio se observa preferentemente en la corteza frontal y en la corteza piriforme en todos los grupos como se aprecia en la tabla 19 y en la figura 27.

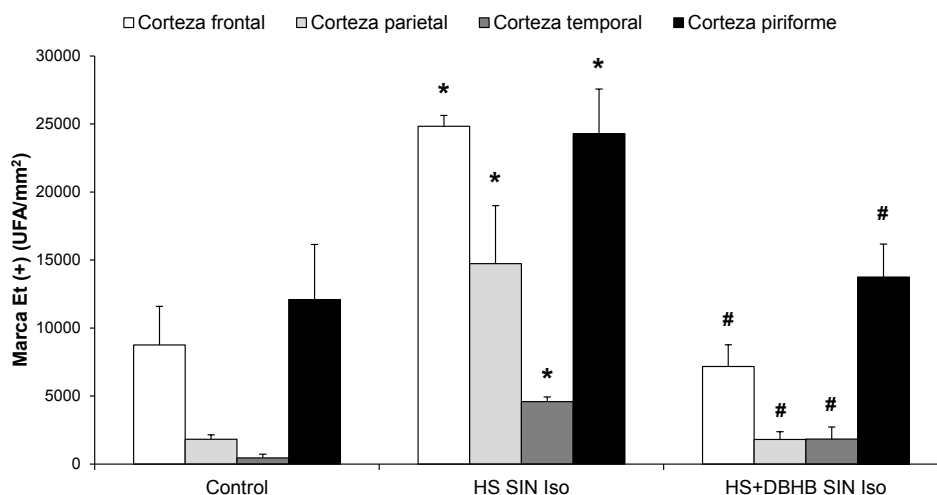
De manera análoga a como se observa en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa, la marca Et (+) se localizó en las capas medias de la corteza frontal y entre las capas superficiales y las medias de las cortezas parietal y temporal. La hipoglucemia severa sin presencia de coma incrementa de manera significativa la marca Et (+) en las cuatro regiones de la corteza que fueron analizadas.

**Tabla 19.** Marca positiva a etidio en diferentes regiones de la corteza cerebral

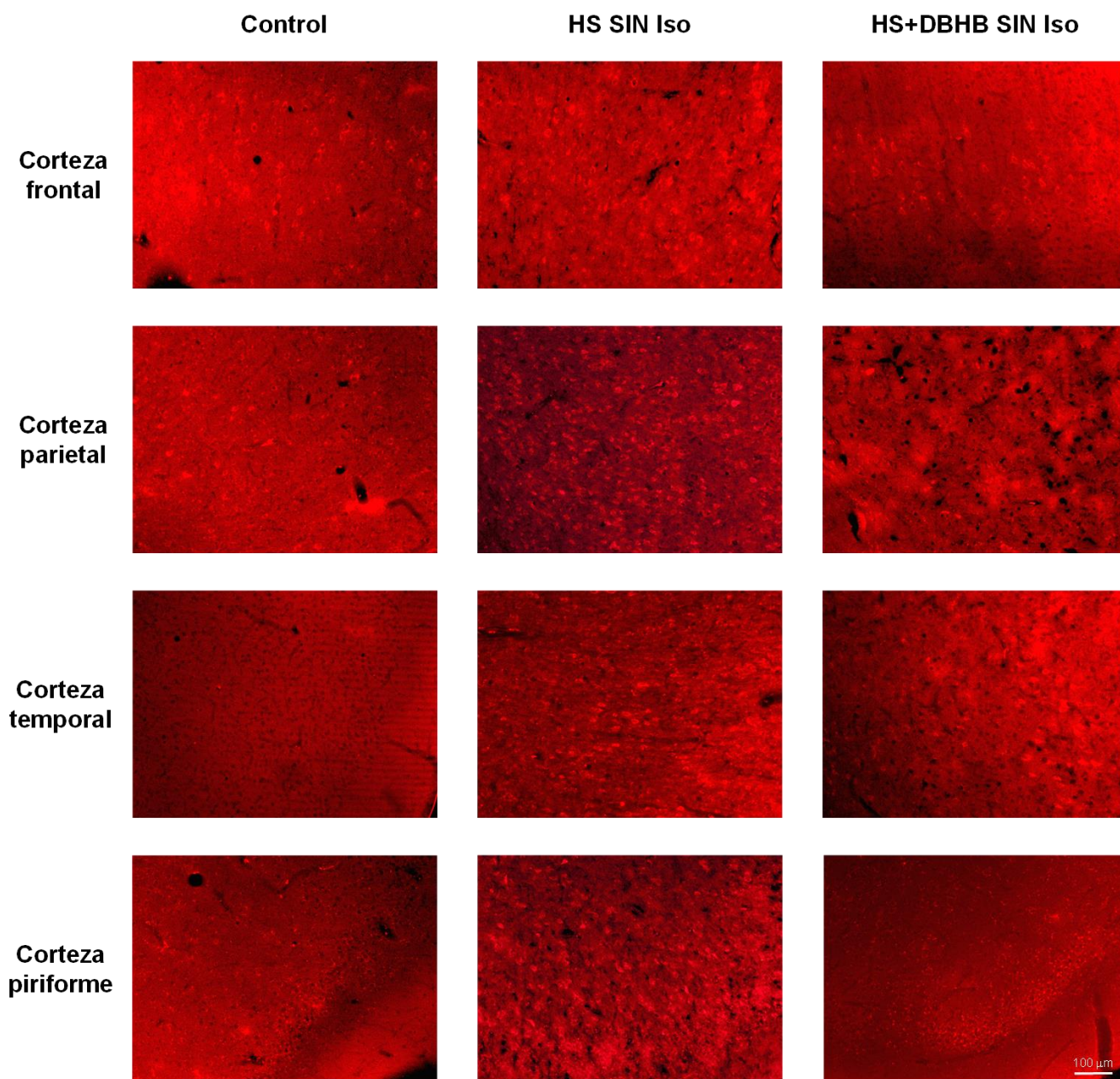
Grupo	Corteza frontal (UFA/mm <sup>2</sup> )	Corteza parietal (UFA/mm <sup>2</sup> )	Corteza temporal (UFA/mm <sup>2</sup> )	Corteza piriforme (UFA/mm <sup>2</sup> )
<i>Control</i>	8756.7 ± 2845.1	1823.3 ± 322.4	455.6 ± 269.3	12090.5 ± 4055.7
<i>HS SIN Iso</i>	24837.8 ± 800.2*	14732.8 ± 4274*	4596.7 ± 330.2*	24289.1 ± 3290.6*
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	7179.7 ± 1595.8#	1812.1 ± 559.7#	1831.8 ± 883.1#	13748.6 ± 2423.1#

\* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6.

El incremento en la marca Et (+) en el grupo *HS SIN Iso* fue de 2.8 veces para la frontal, de 8 veces en la parietal, de 10 veces en la temporal y de 2 veces en la piriforme con respecto a las mismas regiones corticales del grupo *Control*. El grupo *HS+DBHB SIN Iso* tuvo una disminución significativa en la intensidad de la marca Et (+) en todas las áreas corticales analizadas con respecto al grupo *HS SIN Iso* sin que se encontraran diferencias significativas entre el grupo *Control* y el grupo *HS+DBHB SIN Iso*. Cabe hacer notar que en el grupo *Control* las cortezas piriforme y frontal tuvieron una marca Et (+) basal más elevada en comparación a las cortezas parietal y temporal del mismo grupo. Imágenes representativas de las regiones de la corteza analizadas para este esquema se presentan en la figura 28.



**Figura 27.** El DBHB es capaz de prevenir la aparición de marca positiva a etidio en diversas regiones de la corteza cerebral en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. Las barras representan la media grupal ± el error estándar de la media. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS+DBHB SIN Iso*. UFA: unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6.



**Figura 28.** Imágenes representativas de la localización de la marca positiva a etidio en las cortezas frontal, parietal, temporal y piriforme en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa.

### 6.9.3 Distribución de la marca positiva a etidio en el hipocampo

La tabla 20 y la figura 29 muestran que en todas las regiones del hipocampo que fueron estudiadas del grupo *HS SIN Iso*, se observa un incremento significativo en la intensidad de la marca Et (+) con respecto a los grupos *Control* y *HS+DBHB SIN Iso*.

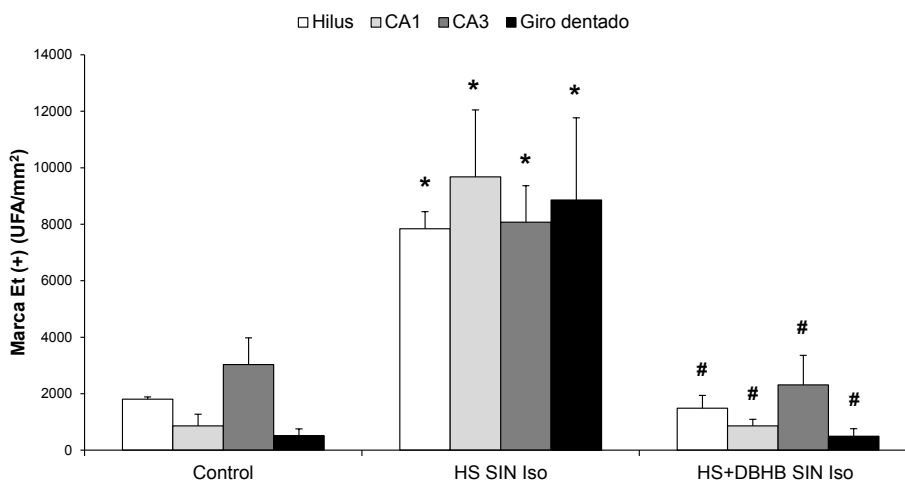
**Tabla 20.** Intensidad de la marca positiva a etidio en el hipocampo.

Grupo	Hilus (UFA/mm <sup>2</sup> )	CA1 (UFA/mm <sup>2</sup> )	CA3 (UFA/mm <sup>2</sup> )	Giro dentado (UFA/mm <sup>2</sup> )
<i>Control</i>	1810.7 ± 78.4	861.4 ± 411.5	3032.2 ± 949	515.1 ± 237.8
<i>HS SIN Iso</i>	7838 ± 609.7*	9680.6 ± 2368*	8072 ± 1294.8*	8857.5 ± 2912.5*
<i>HS+DBHB SIN Iso</i>	1485.6 ± 451.8#	863.8 ± 229.3#	2312.8 ± 1049.1#	494.9 ± 269.2#

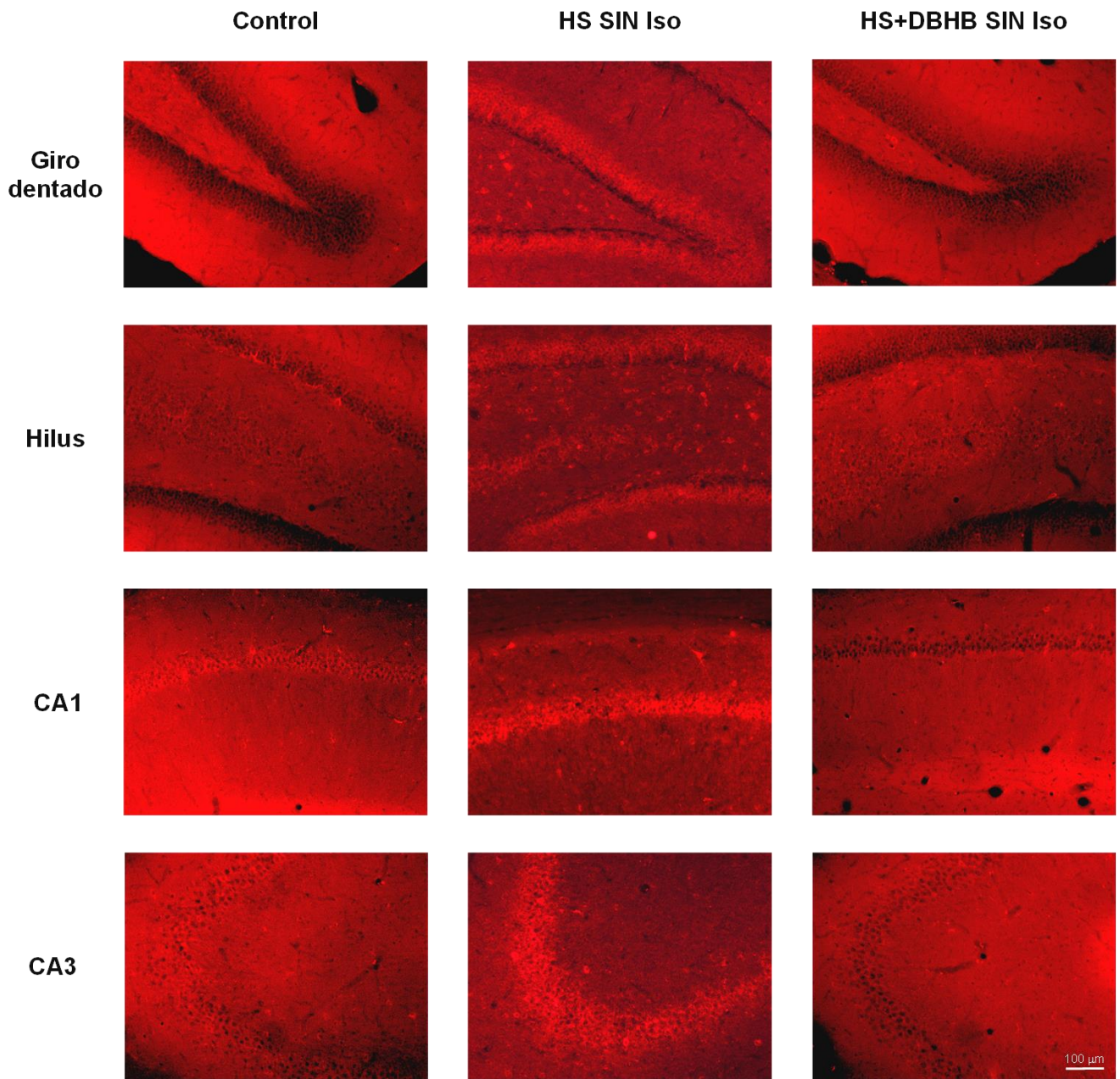
\* $p < 0.05$  con respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6.

El incremento en la marca Et (+) en el grupo *HS SIN Iso* fue de 4.3 veces en el hilus, en CA1 de 11.2 veces, en CA3 de 2.7 veces y en el giro dentado de 17.2 veces con respecto a la intensidad de la marca observada en el grupo *Control*. De manera análoga a lo que se observó en las regiones de la corteza cerebral, el grupo *HS+DBHB SIN Iso* tuvo una disminución significativa en la intensidad de la marca positiva a etidio en las cuatro regiones del hipocampo estudiadas con respecto al grupo *HS SIN Iso*. La intensidad de la marca Et (+) en los grupos *Control* y *HS+DBHB SIN Iso* no presentó diferencias significativas.

Imágenes representativas de las regiones del hipocampo en este protocolo se presentan en la figura 30.



**Figura 29.** La hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa incrementó la marca positiva a etidio en todas las regiones del hipocampo estudiadas. La presencia del DBHB previno esta elevación bajo las mismas condiciones. Las barras corresponden a la media grupal en cada región ± el error estándar de la media. \* $p < 0.05$  respecto al grupo *Control*; # $p < 0.05$  respecto al grupo *HS SIN Iso*. UFA: unidades de fluorescencia arbitraria. *Control*: n = 3; *HS SIN Iso*: n = 4; *HS+DBHB SIN Iso*: n = 6.



**Figura 30.** Imágenes representativas que muestran la localización de la marca positiva a etidio causada por la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa. Puede observarse que el DBHB previno el incremento en la intensidad de la marca Et (+) en todas las regiones estudiadas.

## **7. Discusión**

La hipoglucemia severa es la complicación de mayor relevancia en los pacientes con diabetes tipo I que siguen un tratamiento basado en un estricto control de la concentración de glucosa en sangre y que dependen de la administración exógena de insulina (Cryer, 2007). Estos pacientes pueden presentar uno o dos eventos de hipoglucemia moderada a la semana y uno de hipoglucemia severa al año, que de no ser revertido rápidamente, puede causar daños irreversibles en el cerebro.

Para el estudio de la hipoglucemia a nivel experimental se utilizan principalmente dos modelos: el primero involucra exponer cultivos celulares a medios sin glucosa y el segundo consiste en administrar insulina a roedores. En este último modelo se reportó por primera vez que la hipoglucemia severa con presencia de un periodo isoeléctrico mayor a 30 minutos causa la muerte neuronal en ciertas regiones del cerebro (como la corteza cerebral y el hipocampo), mientras que otras regiones (como el cerebelo y el tallo cerebral) son más resistentes a la ausencia de glucosa (Auer et al., 1984).

Los mecanismos que dan origen a esta muerte neuronal selectiva no han sido totalmente descritos. Sin embargo, estudios pioneros en este campo reportaron que durante el periodo isoeléctrico existe una liberación masiva de aminoácidos excitadores y que esta liberación causa una muerte dependiente de un mecanismo excitotóxico, ya que el uso de antagonistas de receptores glutamatérgicos previno la muerte neuronal (Wieloch, 1985). Trabajos más recientes en el modelo de hipoglucemia en roedores han reportado que el estrés oxidante se encuentra presente tanto antes de que ocurra el periodo isoeléctrico como se muestra en los trabajos de Patočová et al. (2003) y de Haces et al. (2010), como después del periodo de reintroducción de glucosa (Suh, et al., 2003; Suh, et al., 2007b; Haces, et al., 2010).

El presente trabajo tuvo la finalidad de establecer si el cuerpo cetónico DBHB es capaz de prevenir la aparición del estrés oxidante que se asocia con la hipoglucemia severa y que se genera tanto en el periodo de hipoglucemia como en el de reintroducción de glucosa. También se determinó la capacidad del DBHB para prevenir la muerte celular que se observa luego del periodo de reintroducción de glucosa. Con este propósito, utilizamos el modelo de hipoglucemia severa inducida mediante la administración de insulina en ratas y evaluamos tanto la presencia de estrés oxidante como de células en proceso de degeneración detectadas por el colorante Fluoro-Jade B en las regiones cerebrales reportadas como vulnerables, ya sea



inmediatamente después de que la hipoglucemia severa alcanzara un estado crítico (periodo isoelectrico) y varias horas después de que la hipoglucemia severa fuera revertida mediante la administración de glucosa. Esta aproximación nos permitió observar los eventos que son causados por la hipoglucemia severa por sí sola y cuales son causados por la hipoglucemia severa seguida de la reintroducción de glucosa, evaluando al mismo tiempo el efecto del DBHB sobre estos eventos.

En ambos protocolos de trabajo, la hipoglucemia severa se alcanzó 30 minutos después de la administración de insulina. En el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa se mantuvo una CSG < 20 mg/dL por aproximadamente 4 horas hasta el momento de terminar el ensayo, mientras que en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa la CSG se mantuvo a menos de 33 mg/dL por aproximadamente 6 horas hasta el final de la infusión de glucosa.

El progreso libre de la hipoglucemia en las ratas del protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa permitió que un mayor número de individuos en los grupos *HS* y *HS+DBHB* alcanzara el periodo isoelectrico con respecto a los individuos pertenecientes al protocolo de hipoglucemia con reintroducción de glucosa, en donde la hipoglucemia se interrumpió tres horas después de la administración de insulina mediante la infusión intravenosa de glucosa. Experiencias previas de nuestro laboratorio adquiridas durante los primeros ensayos de este protocolo indican que el periodo isoelectrico se presenta entre dos y tres horas posteriores a la administración de insulina, y por esta razón se decidió interrumpir la hipoglucemia a un tiempo máximo de tres horas después de la administración de insulina.

Como muestra la figura 12, los cambios de las ondas en el registro electroencefalográfico fueron prácticamente idénticos a los que se han reportado con anterioridad en la literatura (Auer, 2004; Haces et al., 2010), describiendo el progreso de la hipoglucemia hasta el periodo isoelectrico y la recuperación del patrón electroencefalográfico normal por la administración de glucosa.

En el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa se observaron periodos isoelectricos de duración relativamente corta (entre 2 y 11 minutos) cuya presencia no ocasionó un aumento en el número de células FJB (+) con respecto a los individuos con hipoglucemia severa sin presencia de coma. Estos hallazgos están en concordancia con reportes previos que sugieren que la hipoglucemia severa, aún con presencia del periodo

isoeléctrico, no causa degeneración celular inmediatamente sino que esta ocurre tiempo después y que la reintroducción de glucosa es un factor crucial para que aparezcan células positivas a Fluoro-Jade B (Suh et al. 2003). En concordancia con estos resultados, en un estudio previo de nuestro grupo se reportó que ratas con hipoglucemia severa sacrificadas en el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento mostraron muy pocas células positivas a Fluoro-Jade B en el cerebro (Haces et al., 2010).

Para descartar una rápida desaparición del DBHB de la sangre debido a su consumo como consecuencia de la deficiencia energética, en un trabajo previo nuestro grupo midió la concentración de DBHB en ratas ayunadas y luego sometidas a hipoglucemia severa. La concentración de DBHB antes de la administración de insulina fue de  $0.06 \pm 0.009$  mM. Un grupo de ratas recibió una dosis de 500 mg/Kg una hora después de la administración de insulina y se reportó que en el momento de la P.R. la concentración de DBHB en sangre era  $0.186 \pm 0.035$  mM. Otro grupo de ratas recibió una primera dosis de 500 mg/Kg de DBHB i.p. una hora después de la administración de insulina y treinta minutos después se administró una segunda dosis de 500 mg/Kg i.p. del mismo cuerpo cetónico. En el momento de la P.R., se reportó que la concentración de DBHB en estas ratas fue de  $0.326 \pm 0.079$  mM. Estos datos sugirieron que una segunda dosis de DBHB ayuda a mantener niveles elevados de este cuerpo cetónico antes de que las ratas presenten la P.R. (Haces et al., 2008).

En nuestro protocolo de trabajo se administró una dosis de 250 mg/Kg de DBHB una hora después de la administración de insulina seguida de una segunda dosis de 250 mg/Kg en el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento. De acuerdo con este protocolo de administración, es probable que antes de que se presentara la P.R. se tuviera una concentración de DBHB por encima de la concentración que se alcanza debido al ayuno (0.06 mM) de acuerdo con los reportes previos de nuestro grupo (Haces et al., 2008); por otro lado, la segunda administración de DBHB justo después de la aparición de la P.R. garantiza que este cuerpo cetónico se encuentre presente durante el periodo crítico de ausencia de energía causado por la hipoglucemia severa, ya que se sabe que la P.R. antecede a la aparición del periodo isoeeléctrico.

En el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa se observó que el DBHB no tuvo ningún efecto sobre el número de células FJB (+). En este sentido, cabe destacar que las células FJB (+) aparecen en gran número en el protocolo que si tuvo

reintroducción de glucosa; en este protocolo se observó que todas las ratas presentan una cantidad importante de células FJB (+) y que este número se incrementa en presencia del periodo isoelectrico como ya había sido reportado con anterioridad en la literatura (Auer, 2004; Haces et al., 2010). En este caso el DBHB redujo significativamente el número de células FJB (+) como se discutirá más adelante.

Por otro lado, la generación de especies pro oxidantes en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa fue prácticamente la misma en todos los grupos y en las tres regiones analizadas. La marca Et (+) es casi de la misma intensidad en todas las regiones y en todos los grupos, incluso en el grupo *Control* de este protocolo que no recibió la administración de insulina y que solo se sometió a ayuno. Este hallazgo contrasta de manera importante con el reportes de Patočová et al. (2003) y con los hallazgos reportados por nuestro grupo (Haces et al., 2010), en los que se encontró un incremento en la lipoperoxidación en animales hipoglucémicos que no fueron rescatados con la administración de glucosa.

Para tratar de establecer el posible origen de la marca Et (+) en el protocolo de hipoglucemia severa sin reintroducción de glucosa, un grupo de ratas que no fue sometido a ayuno ni a la administración de insulina recibió únicamente la administración de dihidroetidido. La figura 21 muestra que el ayuno tiene el efecto de inducir la generación de especies pro oxidantes detectadas por la oxidación del dihidroetidido. La presencia de la hipoglucemia severa en los grupos sin reintroducción de glucosa no indujo un incremento mayor en la fluorescencia del etidio al que se observa en su respectivo grupo *Control* (figura 20). Por otro lado, el efecto del ayuno ya no se observa en el grupo *Control* del protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa, posiblemente debido a que estas ratas al momento de su sacrificio ya se habían alimentado y prácticamente se encontraban en las mismas condiciones que las ratas del grupo *Control intacto*. Estos resultados indican que el ayuno induce un incremento en la marca fluorescente del etidio y que la intensidad de la marca Et (+) que se observa en los animales hipoglucémicos sin reintroducción de glucosa es posiblemente debida al ayuno y no a la hipoglucemia severa. En contraste, los animales hipoglucémicos analizados después de la reintroducción de glucosa si presentaron un incremento significativo con respecto a los controles ayunados analizados al mismo tiempo (24 horas después de la administración de insulina), indicando que el efecto del ayuno parece perderse y no interfiere con el efecto de la hipoglucemia severa ni con el de la reintroducción de glucosa sobre la generación de especies reactivas. En este sentido, se observó que los grupos con hipoglucemia severa sin

reintroducción de glucosa y tratados con DBHB tuvieron una intensidad de marca Et (+) semejante a la que se observa en los otros grupos. Estos hechos sugieren que el ayuno generó un ambiente pro oxidante que fue detectado por el etidio y que estas especies se pudieron haber generado antes de la administración del DBHB. Por otro lado, la presencia del DBHB en el protocolo de hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa si tuvo una clara disminución de la marca positiva a etidio como se discutirá más adelante.

En los animales con reintroducción de glucosa, la hipoglucemia severa se interrumpió en un tiempo máximo de 3 horas posteriores a la administración de insulina. En este protocolo de trabajo, en el grupo *HS* cuatro individuos de ocho totales alcanzaron el periodo isoelectrico con duraciones de entre 3 y 7 minutos. En contraste, en el grupo *HS+DBHB* sólo un individuo de siete totales alcanzó el periodo isoelectrico y este tuvo una duración de 4 minutos. Los resultados del grupo de *HS* sin reintroducción de glucosa sugieren que la presencia del DBHB retrasó la aparición del coma posiblemente aportando energía dentro de ciertos límites. Es probable que en el grupo *HS* con reintroducción de glucosa la aparición del coma también se retrasara por efecto del DBHB y que no se pudo detectar debido a que la hipoglucemia se interrumpió tres horas después de la administración de insulina y no se prolongó hasta que los animales alcanzaran el periodo isoelectrico. Esta interrupción en el grupo que recibió DBHB se hizo con el fin de que los grupos tratados y no tratados con DBHB tuvieran una duración similar del periodo de hipoglucemia.

Estudios pioneros que analizaron el daño hipoglucémico en el cerebro señalaron que la intensidad del daño está en proporción con la duración del periodo isoelectrico (Auer et al., 1985b). En concordancia con estos reportes, en la tabla 7 puede observarse que el periodo de coma de mayor duración (7 minutos) también es el que presenta más células FJB (+) con respecto a los periodos de coma de menor duración.

Adicionalmente, se había reportado en la literatura que una condición para que ocurra daño cerebral es que la hipoglucemia severa debe acompañarse de un periodo isoelectrico de al menos 30 minutos de duración (Auer, 2004). Los hallazgos de este trabajo muestran que la hipoglucemia severa aún sin presencia del periodo isoelectrico y con reintroducción de glucosa (Figuras 14 y 18) es capaz de promover la aparición de células FJB (+) principalmente en la corteza cerebral, y que la presencia del periodo isoelectrico aumenta de manera significativa el número de células FJB (+) en las regiones reportadas como vulnerables (Auer et al., 1984);

La presencia del DBHB disminuyó de manera significativa el número de células FJB (+) en las ratas con *HS* y reintroducción de glucosa sin presencia de isoelectrico, indicando que este cuerpo cetónico de alguna manera impidió que las células se deterioraran como resultado de la hipoglucemia severa y del periodo de reintroducción de glucosa. Una posible explicación reside en que ante la ausencia de glucosa el DBHB esté siendo oxidado para la obtención de energía. Para estudiar la contribución de los cuerpos cetónicos en condiciones de falla energética, Haces y colaboradores en 2008 expusieron cultivos de células hipocampales a iodoacetato durante 30 minutos para inhibir la glucólisis en presencia de los cuerpos cetónicos AcAc y DBHB, evaluando la cantidad de ATP cuatro horas después de la exposición al iodoacetato, y la viabilidad celular veinticuatro horas después de esta. Se encontró que tanto la viabilidad celular como los niveles de ATP aumentan por la presencia de los cuerpos cetónicos, sugiriendo que su metabolismo por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos aporta energía en estas condiciones. Muy recientemente, nuestro grupo reportó que en cultivos neuronales expuestos a 1.5 horas de ausencia de glucosa, el DBHB ayuda a mantener activa la producción de ATP durante la ausencia de glucosa y durante el periodo de reintroducción de glucosa (Julio-Amilpas, et al., 2015). La hipoglucemia constituye un evento de falla energética que es causado directamente por la ausencia de glucosa, así que es posible que en nuestro modelo el DBHB esté contribuyendo con la producción de energía y con ello a la sobrevivencia celular.

Otra posible explicación para la disminución de las células FJB (+) en el grupo *HS+DBHB SIN Iso* con respecto al grupo *HS SIN Iso* es la atenuación del estrés oxidante. En este trabajo se demostró que la hipoglucemia sin isoelectrico seguida de la reintroducción de glucosa incrementa la cantidad de marca Et (+) y que esta marca es significativamente mayor en la corteza cerebral y el hipocampo con respecto a las regiones análogas del grupo *Control*. La presencia del DBHB en estas condiciones disminuyó la intensidad de la marca Et (+) en estas regiones hasta valores semejantes a los observados en el grupo *Control*. Esta disminución de la marca positiva a etidio puede ser explicada por la capacidad antioxidante de los cuerpos cetónicos, ya que se ha demostrado que estas moléculas tienen la capacidad de disminuir el estrés oxidante como se describió en los antecedentes de este trabajo posiblemente al actuar como atrapadores de especies pro oxidantes (Haces et al., 2008).

Múltiples estudios han demostrado que el periodo de reintroducción de glucosa estimula la generación de estrés oxidante a través de diversos mecanismos que en conjunto son

capaces de conducir a la muerte celular (Suh et al., 2007). La neutralización de estas especies por la capacidad antioxidante del DBHB podría explicar la poca presencia de marca Et (+) y de células FJB (+) en el grupo *HS+DBHB SIN Iso*, que fue expuesto tanto a la hipoglucemia severa como al efecto de la reintroducción de glucosa. Por otra parte, también se ha propuesto que el DBHB mejora la función mitocondrial y disminuye la generación de especies reactivas que se originan en este organelo (Massieu et al., 2003; Bough et al., 2006; Maalouf et al., 2007; Zhang et al., 2013). La fuente de las especies pro oxidantes en nuestro modelo escapa a los alcances de este trabajo; sin embargo, trabajos recientes de nuestro grupo señalan a enzimas como la xantina oxidasa, la NOX y la fosfolipasa A2 como potenciales productoras de especies reactivas durante la ausencia de glucosa (Páramo et al., 2010; Páramo et al., 2013).

El protocolo de hipogluemia severa con reintroducción de glucosa nos permitió establecer una posible relación entre la localización de la marca Et (+) y la presencia de células FJB (+). La marca FJB (+) en la corteza cerebral se localizó principalmente entre las capas medias y superficiales de las cortezas parietal y frontal, mientras que la marca Et (+) se localizó casi de manera exclusiva entre las capas medias de estas cortezas, indicando que la degeneración celular no puede ser explicada únicamente por la presencia de estrés oxidante, sino que es posible que existan otros factores involucrados, como lo demuestra la presencia de células FJB (+) en las capas superficiales de la corteza cerebral que no mostraron marca Et (+). Adicionalmente, la intensa marca Et (+) presente en las regiones del hipocampo analizadas se relacionó con la presencia de muy pocas células FJB (+) localizadas en el giro dentado y en el hilus principalmente, sugiriendo que en esta región el estrés oxidante no se traduce necesariamente en degeneración celular, o bien, que en el hipocampo la aparición de células FJB (+) requiere de un estímulo más severo, como la presencia de un periodo isoeléctrico de una duración cercana o mayor a 30 minutos.

Finalmente, este trabajo demuestra que el DBHB es capaz de reducir la muerte celular asociada a la hipoglucemia severa y de disminuir las especies pro oxidantes que se generan durante el periodo de reintroducción de glucosa. Estos hallazgos respaldan el potencial del DBHB para prevenir el daño neuronal asociado con la deficiencia energética con presencia de estrés oxidante, como el que se observa en la hipoxia, en la isquemia y en el trauma cerebral, así como el que se presenta en algunas enfermedades neurodegenerativas en donde se ha reportado el mal funcionamiento de la mitocondria, como ocurre en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

## **8. Conclusiones**

- El D-β-hidroxiacetato previene de manera eficiente la muerte celular causada por la hipoglucemia severa con reintroducción de glucosa así como la aparición del estrés oxidante posiblemente gracias a su capacidad de actuar como sustrato energético y a su acción antioxidante.
- La localización de las células con presencia de especies reactivas de oxígeno y de células en proceso de degeneración coincide parcialmente en la corteza cerebral y en el hipocampo, indicando que la muerte celular inducida por la hipoglucemia severa no puede explicarse sólo en términos de la producción de estrés oxidante.
- La efectividad del D-β-hidroxiacetato para disminuir las especies pro oxidantes producidas durante el periodo de reintroducción de glucosa, sugiere su utilidad como agente terapéutico, que podría administrarse después del periodo isquémico o post-traumático.

## 9. Referencias

- Alsahli, M. and Gerich, J.E. (2013) Hypoglycemia. *Endocrinology and Metabolic Clinics of North America* 42: 657-676.
- American Academy of Neurology (2012) AAN Summary of evidence-based guideline for families and caregivers treating infantile spasms. Available online on: <https://www.aan.com/Guidelines/home/GetGuidelineContent/553> (consultado el 09 de abril de 2015)
- Attwell, D. and Laughlin S.B. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21: 1133-1145.
- Ashcroft F. and Gribble, F. (1998) Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends in Neuroscience* 21: 288-294.
- Auer, R.N. (2004) Hypoglycemic brain damage. *Forensic Science International* 146: 105-110.
- Auer, R.N., Hugh, J., Cosgrove, E. and Curry, B. (1989) Neuropathologic findings in three cases of profound hypoglycemia. *Clinical Neuropathology* 8: 63-68.
- Auer, R., Kalimo, H., Olsson, Y. and Wieloch, T. (1985a) The dentate gyrus in hypoglycemia: pathology implicating excitotoxin-mediated neuronal necrosis. *Acta Neuropathologica* 67: 279-288.
- Auer, R.N., Kalimo, H., Olsson, Y. and Siesjö, B.K. (1985b) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathologica* 67: 13-24.
- Auer, R.N., Wieloch, T., Olsson, Y., Siesjö, B.K. (1984) The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathologica* 64: 177-191.
- Beltrán, F.A., Acuña, A.I., Miró, M.P., Castro, M.A. Brain Energy Metabolism in Health and Disease. pp 331-340 in: Contreras, C.M. Neuroscience. Dealing with frontiers. Intech (2012) Available from: <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/32399> (consultado en Febrero de 2014).
- Bindokas, V.P., Kuznetsov, A., Sreenan, S., Polonsky, K.S., Roe, M.W. and Philipson, L.H. (2003) Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 9796-9801.



- Bough, K.J., Wetherington, J., Hassel, B., Gawryluk, J.W., Greene, J.G., Shaw, R., Smith, Y., Geiger, J.D., Dingledine, R.J. (2006) Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Annals of Neurology* 60 (2): 223-235.
- Brown, A.M. and Ransom, B.R. (2007) Astrocyte Glycogen and Brain Energy Metabolism. *Glia* 55: 1263-1271.
- Butcher, S.P., Jacobson, I., Sandberg, M., Hagberg, H. and Hamberger, A. (1987) 2-amino-5-phosphonovalerate attenuates the severe hypoglycemia-induced loss of perforant path-evoked field potentials in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 76: 297-300.
- Cheng, B., Yang, X., An, L., Gao, B., Liu, X. and Liu, S. (2009) Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research* 1286: 25-31.
- Cryer, P.E. (2007) Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 868-870.
- Cryer, P.E., Davis, S.N., Shamon, H. (2003) Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26: 1902-1912.
- Díaz Portillo, J., Fernández del Barrio, M.T., Paredes Salido, F. *Aspectos básicos de Bioquímica Clínica*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1997. pp. 41-42.
- Ferrand-Drake, M., Friber, H. and Wieloch, T. (1999) Mitochondrial permeability transition induced DNA-fragmentation in the rat hippocampus following hypoglycemia. *Neuroscience* 90 (4): 1325-1338.
- Ferrand-Drake, M., Zhu, C., Gidö, G., Hansen, A.J., Karlsson, J.O., Bahr, B.A., Zamzami, N., Kroemer, G., Chan, P.H., Wieloch, T. and 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. *Journal of Neurochemistry* 85: 1431-1442.
- Fujioka, M., Okuchi, K., Hiramatsu, K., Sakaki, T., Sakaguchi, S. and Ishii, Y. (1997) Specific changes in human brain after hypoglycemic injury. *Stroke* 28: 547-587.
- García de la Cadena, S., Hernández-Fonseca, K., Camacho-Arroyo, I. and Massieu, L. (2014) Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* 19: 414-427.

- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65: 45–80.
- Greenfield Jr. L.J. (2013) Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABA<sub>A</sub> receptors. *Seizure* 22: 589-600.
- <http://www.bem.fi/book/13/13.htm> (consultado en febrero de 2014)
- [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F0-387-26206-7\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F0-387-26206-7_8) (Consultado en Febrero de 2014)
- Haces, M.L., Hernandez-Fonseca, K., Medina-Campos, O.N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., Massieu, L. (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Experimental Neurology* 211: 85-96.
- Haces, M.L., 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.
- Halestrap, A.P. and Wilson, M.C. (2012) The monocarboxylate transporter family – role and regulation. *Life* 64 (2): 109-119.
- Hawkins, R.A., Williamson, D.H. and Krebs, H.A. (1971) Ketone-body utilization by adult and suckling rat *in vivo*. *Biochemical Journal* 122: 13-18.
- Hu, Z.G., Wang, H.D., Jin, W. and Yin, H.X. (2009) Ketogenic diet reduces cytochrome c release apoptosis following traumatic brain injury in juvenile rats. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 39 (1): 76-83.
- Imamura, K., Takeshima, T., Kashisawa, Y., Nakaso, K., and Nakashima K. (2006) D-β-hydroxybutyrate protects dopaminergic SH-SY5Y cells in a rotenone model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research* 84: 1376-1384.
- Jang, B.G., Choi, B.Y., Kim, J.H., Kim, M.J., Sohn, M. and Suh, S.W. (2013) Impairment of autophagic flux promotes glucose reperfusion-induced Neuro2A cell death after glucose deprivation. *PLOS one* 8 (10): e76466.
- Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyagi, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R.H., Nicoll, R.A. and Moriyama, Y. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68: 99-112.

- Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, A., Gerónimo-Olvera, C. and Massieu, L. (2015) Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by  $\beta$ -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 35: 851-860.
- Kalimo H., Auer, R.N. and Siesjö, B.K. (1985) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. III. Light and electron microscopic findings in the rat caudoputamen. *Acta Neuropathologica* 67: 37-50.
- Kayyali, H.R., Gustafson, M., Myers, T., Thompson, L., Williams, M. and Abdelmoity A. (2014) Ketogenic diet efficacy in the treatment of intractable epileptic spasms. *Pediatric Neurology* 50 (3): 227-227.
- Kossoff E.H. and Hartman, A.L. (2012) Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. *Current Opinions in Neurology* 25 (2): 173-178.
- Kronek, J., Paulovičová, E., Paulovičová, L., Kroneková, Z. and Lustoň, J. Chapter 11. Biocompatibility and Immunocompatibility assessment of Poly(2-oxazolines) pp 268-269. In: Andrade A.O., Alves Pereira, A., Naves, E.L.M. and Soares, A.B. (Editors) Practical Applications in Biomedical Engineering Intech 2013, open access Online book available in <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/41784> (Consultado en febrero de 2014)
- Lacherade, J.C., Jacqueminet, S. and Preiser, J.C. (2009) An overview of hypoglycemia in the critical ill. *Journal of Diabetes Science and Technology* 3 (6): 1242-1249.
- Languren, G., Montiel, T., Julio-Amilpas, A. and Massieu, L. (2013) Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: an integrated view. *Neurochemistry International* 63: 331-343.
- Lau, A. and Tymianski, M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 460: 525-542.
- Leach, J.P., Sills, G.J., Majid, A., Butler, E., Carswell, A., Thompon, G.G. and Brodie, M.J. (1996) Effects of tianabine and vigabatrin on GABA uptake into primary cultures of rat cortical astrocytes. *Seizure* 5: 229-234.
- Lim S., Chesser, A.S., Grima, J.C., Rappold, P.M., Blum, D., Przedborski and Tieu, K. (2011) D- $\beta$ -hydroxybutyrate is protective in mouse models of Huntington's disease. *PLOS One* 6 (9): e24620

- Lutas A. and Yellen, G. (2013) The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy. *Trends in Neuroscience* 36 (1): 32-40.
- Maalouf, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y., Rho, J.M. (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145: 256-264.
- McKenna, M.C., Gruetter, R., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S. and Schousboe, A. Chapter 31. Energy Metabolism of the brain. In Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T. and Price, D.L. (editors) *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects* (7<sup>th</sup> edition). Elsevier Academic Press, 2006. pp. 537.
- Magistretti, P.J. and Allaman I. Brain Energy Metabolism. In Squire, L.R., Berg, D., Bloom, F.E. du Lac, S., Ghosh, A. and Spitzer, N.C. (editors) *Fundamental Neuroscience* (3<sup>rd</sup> edition) San Diego, Academic Press, 2008. pp. 271-293.
- Martin del Campo, Abdelmalik, P.A., Wu, C.P. Carlen, P.L., Zhang, L. (2009) Seizure-like activity in the hypoglycemic rat: lack of correlation with the electroencephalogram of free-moving animals. *Epilepsy Research* 83: 243-248.
- Massieu, L., Haces, M.L., Montiel, T., Hernández-Fonseca, K. (2003) Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120: 365-378.
- Masuda, R., Monahan, J.W., Kashiwaya, Y. (2005) D- $\beta$ -hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *Journal of Neuroscience Research* 80: 501–509.
- Mejía-Toiber J., Montiel, T., Massieu, L. (2006) D- $\beta$ -Hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochemical Research* 31: 1399-1408.
- Nehlig, A. and Pereira de Vasconcelos, A. (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Progress in Neurobiology* 40: 163-221.
- Noh, H.S., Hah, Y.S., Nilufar, R., Bong, J.H., Kang, S.S., Cho, G.J. and Choi, W.S. (2006a) Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *Journal of Neuroscience Research* 83 (4): 702-709.
- Noh, H.S. Kim, Y.S., Kim, Y.H., Han, J.Y., Park, C.H., Kang, A.K., Shin, H.S., Kang, S.S., Cho, G.J. and Choi W.S. (2006b) Ketogenic diet protects the hippocampus from kainic acid

toxicity by inhibiting the dissociation of Bad from 14-3-3. *Journal of Neuroscience Research* 84: 1829-1836.

- Páramo, B., Hernández-Fonseca, K., Estrada-Sánchez, A.M., Jiménez, N., Hernández-Cruz, A. and 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.
- Páramo, B., Montiel, T., Hernández-Espinosa, D.R., Rivera-Martínez, M., Morán, J. and Massieu, L. (2013) Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 2596-2604.
- Patočová, J., Marhol, P., Tůmová, E., Kršiak, M., Rokyta, R., Štípek, S., Crkovská, J., Anděl, M. (2003) Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiological Research* 52: 131-135.
- Paxinos G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (2<sup>nd</sup> edition)*. USA: Academic Press, 1986.
- Peña Díaz, A., Arroyo Begovich, A., Gómez Puyou, A., Tapia Ibarquengoytia, R., Gómez Eichelman, C. *Bioquímica (2<sup>a</sup> edición)*. México: Editorial Limusa, 2004. pp.291-292.
- Pierre, K. y Pellerin, L. (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry* 94: 1-14.
- Prins, M.L., Fujima, L.S. and Hovda, D.A. (2005) Age dependent reduction of cortical contusion volume by ketones after traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research* 82: 413-420.
- Puchowicz, M.A., Emancipator, D.S., Xu, K., Magness, O., Ndubuizu, O.I., Lust, W.D. and LaManna, J.C. (2005) Chapter 8 Adaptation to chronic hypoxia during diet-induced ketosis. In: Okunieff, P., Williams, J. and Chen, Y. (Editors) *Oxygen Transport to tissue XXVI*. New York, USA 2005. pp. 311-316.
- Puchowicz, M.A., Zechel, J.L., Valerio, J., Emancipator, D.S., Xu, K., Pundik, S., LaManna, J.C. and Lust, W.D. (2008) Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28: 1907-1916.
- Qutub, A.A. and Hunt, A. (2005) Glucose transport to the brain: A systems model. *Brain Research Review* 49: 595-617.

- Rabinovici G.D., Lukatch, M., MacIver, B. (2000) Hypoglycemic and hypoxic modulation of cortical micro-EEG activity in rat brain slices. *Clinical Neurophysiology* 111: 112-121.
- Robinson, K.M., Janes, M.S., Pehar, M.P., Monette, J.S., Ross, M.F., Hagen, T.M., Murphy, M.P., Beckman, J.S. (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 15038–15043.
- Sandberg, M., Butcher, S.P., Hagberg, H. (1986) Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 47 (1):178-184.
- Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., Newgard, C.B., Farase Jr., R.V., de Cavo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K. and Verdin, E. (2013) Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339 (6116): 211-214.
- Simpson I.A., Carruthers, A., Vanucci, S. (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27: 1766-1791.
- Suh, S.W., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., Liu, J. and Swanson, R.A. (2003) Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *The Journal of Neuroscience* 23 (33): 10681-10690.
- Suh, S.W., Garnier, P., Aoyama, K., Chen, Y. and Swanson, R.A. (2004) Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiology of Disease* 16: 538-545.
- Suh, S.W., Gum, E., Hamby, A.M., Chan, P.H., Swanson, R.A. (2007a) Hypoglycemic neuronal damage is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 910-918.
- Suh, S.W., Hamby, A.M., Gum, E.T., Shin, B.S. Won, S.J., Sheline, C.T., Chan, P.H. and Swanson, R.A. (2008) Sequential release of nitric oxide, zinc and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28: 1697-1706.
- Suh, S.W., Hamby, A.M. and Swanson, R.A. (2007b) Hypoglycemia, brain energetics, and hypoglycemic neuronal death. *Glia* 55: 1280-1286.

- Sutherland, G.R., Tyson, R.L. and Auer, R.N. (2008) Truncation of the Krebs cycle during hypoglycemic coma. *Medicinal Chemistry* 4: 379-385.
- Suzuki, M., Suzuki M., Kitamura, Y., Mori, S., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A. and Hiriade, A. (2002)  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brains against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Japanese Journal of Pharmacology* 89: 36-43.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A. and Hiriade, A. (2001) effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 87: 143-150.
- Szydlowska, K., and Tyminski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47: 122-129.
- Tai, K.K., Nguyen, N., Pham. L. and Truong, D.D. (2008) Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission* 115: 1011-1017.
- Thorens, B. and Mueckler, M. (2010) Glucose transporters in the 21<sup>st</sup> century. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 298: E141-E145.
- Van der Auwera, I., Wera, S., Van Leuven, F. and Henderson, S.T. (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutrition and Metabolism* 2: 28.
- Vanucci, S.J. and Simpson, I.A. (2003) Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 285: E1127-E1134.
- White, H. and Vankatesh, B. (2011) Clinical review: ketones and brain injury. *Critical Care* 15: 219-228.
- Wieloch, T. (1985) Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230 (4726): 681-683.
- Won, S.J., Kin. J.H., Yoo, B.H., Sohn, M., Kauppinen, T.T., Park, M.S., Kwon, H.J., Liu, J. and Suh, S.W. (2012) Prevention of hypoglycemia-induced neuronal death by minocycline. *Journal of Neuroinflammation* 9: 225.

- Yao, J., Chen, S., Mao, Z., Cadenas, E., and Diaz Brinton, R. (2011) 2-Deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *PLOS one* 6 (7): e21788.
- Zhang, J., Cao, Q., Li, S., Lu, X., Zhao, Y., Guan, J.S., Chen, J.C., Wu, Q. and Chen, G.Q. (2013) 3-hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism. *Biomaterials* 34: 7552-7562.
- Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine* 34: 1359–1368.



*10. Anexo 1. Publicación original derivada de este trabajo: "Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by  $\beta$ -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species"*

## ORIGINAL ARTICLE

# Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by $\beta$ -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species

Alberto Julio-Amilpas<sup>1,2</sup>, Teresa Montiel<sup>1,2</sup>, Eva Soto-Tinoco<sup>1</sup>, Cristian Gerónimo-Olvera<sup>1</sup> and Lourdes Massieu<sup>1</sup>

Glucose is the main energy substrate in brain but in certain circumstances such as prolonged fasting and the suckling period alternative substrates can be used such as the ketone bodies (KB), beta-hydroxybutyrate (BHB), and acetoacetate. It has been shown that KB prevent neuronal death induced during energy limiting conditions and excitotoxicity. The protective effect of KB has been mainly attributed to the improvement of mitochondrial function. In the present study, we have investigated the protective effect of D-BHB against neuronal death induced by severe noncoma hypoglycemia in the rat *in vivo* and by glucose deprivation (GD) in cortical cultures. Results show that systemic administration of D-BHB reduces reactive oxygen species (ROS) production in distinct cortical areas and subregions of the hippocampus and efficiently prevents neuronal death in the cortex of hypoglycemic animals. *In vitro* results show that D-BHB stimulates ATP production and reduces ROS levels, while the nonphysiologic isomer of BHB, L-BHB, has no effect on energy production but reduces ROS levels. Data suggest that protection by BHB, not only results from its metabolic action but is also related to its capability to reduce ROS, rendering this KB as a suitable candidate for the treatment of ischemic and traumatic injury.

*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* advance online publication, 4 February 2015; doi:10.1038/jcbfm.2015.1

**Keywords:** energy failure; hypoglycemia; ketone bodies; neuronal death; oxidative stress

## INTRODUCTION

Glucose is the main energy source in brain. However, under certain conditions other energy substrates such as the ketone bodies (KB), acetoacetate (AcAc), and  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) can be used by brain, including the suckling period,<sup>1,2</sup> prolonged fasting,<sup>3</sup> and the ketogenic diet;<sup>4</sup> all these situations are associated with increased KB levels in blood. Several studies have shown that KB can protect the brain against damage associated with diverse neurotoxic insults such as hypoxia,<sup>5</sup> ischemia,<sup>6–8</sup> hypoglycemia,<sup>9,10</sup> and excitotoxicity.<sup>11,12</sup> In addition, the ketogenic diet has been used for a long time for the treatment of refractory epilepsy.<sup>4,13,14</sup> The protective effect of KB has been mostly attributed to their conversion to AcetylCoA improving mitochondrial metabolism and preserving energy levels.<sup>15–17</sup> However, studies suggest that besides providing energy to neurons, KB reduce the production of reactive oxygen species (ROS) contributing to their protective effect. It has been observed *in vitro* that AcAc reduces ROS levels induced by glutamate exposure and glycolysis inhibition in cultured neurons,<sup>12,16</sup> and previous *in vivo* studies have shown that BHB decreases hypoglycemia and glutamate-mediated lipoperoxidation in the rat brain.<sup>10,18</sup> The mechanism underlying the reduction of ROS by BHB has not been elucidated but we have previously reported that KB display a scavenging action of ROS, in particular of the hydroxyl radical ( $\cdot$ OH).<sup>10</sup> The physiologic and the

nonphysiologic isomers of BHB (D- and L-BHB, respectively) scavenge  $\cdot$ OH in a free-cell system and reduce neuronal death and ROS production induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons and hypoglycemia-induced lipoperoxidation *in vivo*.<sup>10</sup> These observations support the potential of KB to prevent oxidative stress and cell death induced during energy limiting conditions or overexcitation. Two suitable experimental conditions to further investigate the mechanisms underlying the protective action of KB are the *in vivo* model of insulin-induced hypoglycemia and the *in vitro* model of glucose deprivation (GD). These conditions are associated with decreased glucose supply to neurons favoring the consumption of other energy substrates. It is known that hypoglycemia and GD lead to the generation of ROS and oxidative stress, which contributes to the death of neurons.<sup>10,19–21</sup> In a previous study, we have showed that prolonged hypoglycemia not leading to coma causes neuronal death in the rat cerebral cortex and increases lipoperoxidation in cortex, hippocampus, and striatum.<sup>22</sup> The selective vulnerability to hypoglycemic neuronal death has been well described in animals experiencing the hypoglycemic coma.<sup>23</sup> However, the distribution of ROS in distinct regions of the hypoglycemic rat brain has not been described nor its relation to selective neuronal death. Using the oxidation sensitive fluorescent marker, dihydroethidium (DHE), we have now investigated the distribution of ROS producing cells in the cortex and the hippocampus of hypoglycemic rats not

<sup>1</sup>División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF, México. Correspondence: Dr L Massieu, División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 04510, AP 70-253, México DF, México.

E-mail: lmassieu@fc.unam.mx

The authors thank Selene García de la Cadena for her help in cell culturing and Juan Manuel Barbosa for his help in computer technical support.

<sup>2</sup>These authors contributed equally to this work.

This work was supported by CONACYT S112179 and PAPIIT (UNAM) IN204213 grants to LM.

Received 21 August 2014; revised 27 November 2014; accepted 19 December 2014

subjected to coma. In addition, we aimed to investigate whether BHB reduces ROS generation in distinct cortical areas (frontal, parietal, temporal, and piriform) and hippocampal subregions (CA1, CA3, dentate gyrus, DG), and whether this effect correlates with a decrease in the number of degenerating neurons as assessed by FluoroJade B (FJB) staining. Results show that prolonged noncoma hypoglycemia followed by glucose reperfusion (GR) significantly increases ROS production in all cortical and hippocampal areas, while neuronal death is induced mainly in the cortex. The systemic administration of BHB effectively and significantly reduces ROS levels in all cortical and hippocampal regions and completely prevents cell death in the cortex. Results from cortical cultures show that D-BHB, the physiologic isomer of BHB, efficiently preserves ATP production, reduces ROS generation, and notably prevents neuronal death induced by GD, while the nonphysiologic isomer, L-BHB also reduces ROS production and partially prevents neuronal death, but has no effect on ATP levels. D- and L-BHB also reduced DHE oxidation in cells exposed to xanthine/xanthine oxidase (Xa/Xo), a superoxide producing system, and to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> further suggesting the antioxidant action of BHB. These results support the protective action of BHB against neuronal damage induced by energy failure, and suggest that the preservation of energy levels in combination with reduced ROS production accounts for the protective action of BHB.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Treatment

Three-month-old Male Wistar rats (320 to 380 g) from the animal house of the Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM) were used throughout the study. They were handled according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications No. 80-23 revised 1996), with the approval of the Animal Care Committee (CICUAL) of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. All efforts were made to optimize the number of animals used and minimize their suffering. Rats were housed under control conditions of light and temperature with food and water *ad libitum*. One week before the induction of hypoglycemia, animals were implanted with epidural electrodes under 1.5% to 2.0% isoflurane anesthesia for electroencephalogram (EEG) recording and were randomly distributed among the different experimental and control group. Rats were fasted overnight and hypoglycemia was induced following the methodology described.<sup>27</sup> Briefly, rats were intraperitoneally injected with 24 U/kg bovine insulin (Sigma, St Louis MO, USA) and blood samples were obtained from the tail to monitor glucose levels before (time 0) and at different intervals after insulin administration (0.5, 6, 7, and 24 hours) with a glucometer (Abbott Laboratories, Bedford, MA, USA). Interhemispheric EEG was recorded 30 minutes before the administration of insulin, during the hypoglycemic period and during glucose infusion until normal electrical activity completely recovered. Between 2 and 3 hours after insulin injection EEG showed an increase in the amplitude and the slowing of the theta (4 to 8 Hz) and delta (1 to 4 Hz) waves; the animals were drowsy and lost their righting reflex (RR) (when the animals lose the ability to recover the horizontal position when turned upside down), a behavior preceding the onset of isoelectricity (no EEG activity or flat EEG) (Figure 2). At this moment, a group of animals with severe hypoglycemia (HS) was rescued with glucose alone by an intraperitoneal administration of 0.2 mL of 50% glucose followed by an intravenous infusion (25% glucose in Krebs-Henseleit buffer at 1.5 mL/h during 3 hours) through the femoral vein using a perfusion pump (Harvard Apparatus 22, South Natick, MA, USA). An additional glucose intraperitoneal injection (1 mL 25% glucose) was administered if blood glucose levels remained below 20 mg/dL at the end of the 3-hour infusion. None of the animals from this group showed isoelectricity. A second group of animals (HS Iso) was identically treated but hypoglycemia was left to progress until the animals showed isoelectricity approximately 3 hours after insulin administration. These animals exhibited periods of isoelectricity of variable duration (3 to 7 minutes) and normal brain activity was recovered 1 hour after the onset of glucose infusion (Figure 2).

Another group of animals was treated with D-BHB (HS+D-BHB) and received one intraperitoneal administration of 250 mg/kg of D-BHB 1 hour after insulin administration. None of these rats showed isoelectricity after

3 hours of insulin injection, thus they were rescued with glucose infusion as described above plus a second intraperitoneal administration of D-BHB (250 mg/kg) at the time of the loss of the RR. Control animals received vehicle solution instead of insulin (0.1% acetic acid) and were treated in parallel with the hypoglycemic animals. All rats were anesthetized and transcardially perfused 24 hours after vehicle or insulin administration for brain extraction (see below). In each experiment, one animal from each group was included (control, HS, HS+D-BHB, HS Iso). Animals showing seizures were eliminated from the study.

### Determination of Reactive Oxygen Species in Brain Sections

Reactive oxygen species production in the brain of hypoglycemic rats was monitored using the oxidation sensitive fluorescent marker DHE (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Dihydroethidium was solubilized in 50% DMSO in 10 mmol/L phosphate buffer and all animal groups received two intraperitoneal DHE administrations (6 mg/kg each), 1 hour and 2.5 hours after insulin or vehicle injection. It is preferentially oxidized by superoxide, although it is also sensitive to other reactive species providing an index of ROS production. After its oxidation, DHE produces the fluorescent compounds ethidium (Et) and 2-hydroxyethidium.<sup>24</sup>

Twenty-four hours after insulin injection, animals were anesthetized and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer. Brains were left in fixative solution for 24 hours and then transferred to a 20% to 30% sucrose gradient (24 and 48 hours, respectively) and 25  $\mu$ m coronal sections were cut in a cryostat from +1.70 to -4.20 from Bregma according to Paxinos and Watson.<sup>25</sup> Sections were mounted on slides and counterstained with the nuclear dye Hoechst (0.001% in phosphate-buffered saline for 15 minutes) to facilitate the identification of Et-positive cells. Sections were rinsed and covered with fluoromount-G (EMS, Hatfield, PA USA), and were observed under an epifluorescence Olympus microscope using U-MNG2 (528 to 605) and U-MNU2 (355 to 465 nm) filters for Et and Hoechst, respectively.

Six coronal sections taken at different levels from bregma (1.2, 0.2, -0.26, -3.14, -3.8, and -4.3) were analyzed per animal. Images from different areas of the cerebral cortex (frontal, temporal, parietal, and piriform) were captured: three fields per section from the frontal cortex; six fields from the parietal and temporal cortices, and one field per section for the piriform cortex. Three sections were taken at the level of the striatum (1.2 mm, 0.2 mm, and -0.26 mm) and five fields per section were captured from the dorsolateral striatum. At the level of the hippocampus, three sections were taken (-3.14, -3.8, and -4.3) and four fields per section were analyzed (CA1, CA3, DG, and hilus). The area of each one of the fields was the same and corresponded to 0.48 mm<sup>2</sup>. The Et fluorescence was quantified from the images by means of the Image J (NIH, Bethesda, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>) program by an investigator blind to the different experimental conditions. Background fluorescence was adjusted to zero and the signal from bright fluorescent cells was measured. Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. (standard error of the mean) of Et fluorescence per unit area (Et fluorescence/mm<sup>2</sup>).

### FluoroJade Staining

FluoroJade B staining was performed as described previously.<sup>22</sup> One drop of a 1% NaOH solution diluted in 80% ethanol was added to brain sections mounted on slides. After 2 minutes it was replaced by 70% ethanol solution. Slides were covered with 0.06% potassium permanganate for 10 minutes and then sections were washed and incubated for 20 minutes with 0.0004% FJB solution prepared in 0.1% acetic acid. Finally, the sections were washed, dried at 50°C, rinsed with xylol for 5 minutes and covered with permount. Sections were observed under an epifluorescence Olympus microscope using a U-MNB2 filter (395 to 590 nm) and total FJB-positive cells were manually counted in each cortical and hippocampal area using the Image J program in 18 brain sections (from 3.20 to -4.20 mm from Bregma) from each rat by an investigator blind to the different treatments. In addition, the total number of FJB-positive cells located in the superficial and medium (II to IV) and the deep layers (V to VI) of the cortex were counted separately.

### Determination of D-Beta-Hydroxybutyrate Levels in Blood

The D-BHB concentration was determined in plasma of control and insulin-treated animals by an enzymatic assay as previously reported.<sup>10</sup> Briefly, blood was collected in heparinized tubes 20 minutes after one administration of 250 mg/kg D-BHB in intact and fasted rats or after the second dose of D-BHB at the time of the loss of the RR in insulin-treated animals.

An equal volume of 10% perchloric acid was added, samples were centrifuged at  $3,400\times g$  for 10 minutes and the supernatant collected. D-beta-hydroxybutyrate was determined following the method previously described.<sup>10,11</sup>

#### Cell Culturing

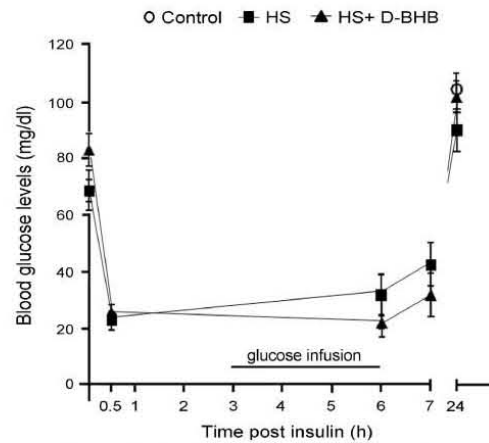
Cortical primary cultures were prepared from Wistar rat embryos of 17 to 18 days of gestation as previously described.<sup>20</sup> Cells were suspended in Neurobasal (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) culture medium supplemented with 1% B27/1% B27 Minus AO (Gibco Life Technologies), 0.5 mmol/L L-glutamine, and 20  $\mu$ g/mL gentamicin (Gibco Life Technologies), and plated at a density of  $2.2\times 10^5/cm^2$  precoated with poly-L-lysine (5  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells were cultured for 8 days *in vitro* (DIV) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Four days after plating, glucose (5 mmol/L), cytosine arabinoside (0.8  $\mu$ mol/L, Sigma-Aldrich), and 200  $\mu$ L of fresh Neurobasal medium (containing 2% B27 Minus AO) was added.

#### Cell Treatments

After 8 DIV, medium was withdrawn from cells plated on 12-well plates and neurons exposed to glucose-free (GD) medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco Life Technologies) for 1.5 hours. After this period, the GD medium was changed for the Neurobasal glucose-containing medium previously withdrawn (glucose reperfusion, GR). We determined that the glucose concentration in Neurobasal medium after 8 DIV ranges between 10 and 13 mmol/L. Cell survival was monitored after 18 hours recovery by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (Sigma-Aldrich) reduction assay and the lactic acid dehydrogenase release assay, as previously described.<sup>20</sup> Briefly, after 18 hours of GR cells were incubated with MTT (150  $\mu$ mol/L) for 1 hour at 37°C in 5%CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere; the medium was aspirated and the precipitated formazan salts were solubilized in acidic isopropanol. Absorbance was monitored spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm. Cell viability is expressed as percentage of MTT reduction relative to control. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was assessed in the culture medium by measuring the decrease in the optical density resulting from the oxidation of NADH at 340 nm using pyruvate as a substrate. After treatment, culture medium was added to potassium phosphate buffer (0.05 mol/L, pH 7.5) with NADH (9.4 mmol/L, Sigma RBL, St Louis, MO, USA). The reaction was started with the addition of pyruvate (20 mmol/L, Sigma RBL) to the mixture, and the change in optical density was monitored after 5 minutes in a spectrophotometer. Data are expressed as percent LDH release relative to control. When the effect of BHB was tested, cultures were treated either with D-BHB or with L-BHB. Dose-response curves were performed to establish the concentrations of D- and L-BHB eliciting protection (Supplementary Figure 1). A 10-mmol/L concentration was chosen for incubation during the GD or the GR period and a combination of 10 mmol/L (GD)+5 mmol/L (GR) was elicited when KB were added during both periods. The effect of KB was also compared with that of pyruvate and lactate tested at the same concentrations (Supplementary Figure 1). Cell survival was monitored after the end of the GR period as described above. In a different series of experiments, cultures were recovered in new Neurobasal medium containing different concentrations of added glucose (5, 10, and 20 mmol/L) either in the presence or in the absence of 10 mmol/L D-BHB. The effect of isomers was also tested when added alone to the recovery medium in the absence of glucose (Supplementary Figure 2).

#### Determination of Reactive Oxygen Species in Cultures

Cells were plated on 12-well plates and ROS levels were determined immediately after 1.5 hours GD or 1 hour after GR using DHE. Dihydroethidium (2.3  $\mu$ mol/L) was added to the medium (DMEM) during GD and added again during GR. Cells were washed with Lockey medium (mmol/L): (NaCl 154, KCL 5.6, NaHCO<sub>3</sub> 3.6, CaCl<sub>2</sub> 2.6, HEPES 5.0, pH 7.4), fixed with formaldehyde 3.7% on ice for 5 minutes and observed by epifluorescence microscopy (Nikon Diaphot, Tokyo, Japan) using the DM 400 filter. Images from six fields per well were captured and Et fluorescence intensity was quantified by an investigator blind to the different experimental conditions. D-beta-hydroxybutyrate or L-BHB was incubated only during GD (10 mmol/L), or during GD (10 mmol/L) and GR (5 mmol/L). Data are expressed as mean Et fluorescence intensity  $\pm$  s.e.m. The effect of KB on the oxidation of DHE was also tested in cells exposed to Xa/Xo to induce the production of the superoxide radical. Cultures were preincubated with Xa (100  $\mu$ mol/L) for 30 minutes and then Xo (45 mU/mL) was added for 1.5



**Figure 1.** Changes in blood glucose induced by severe hypoglycemia (HS). Blood glucose concentration in control and hypoglycemic animals treated (HS+BHB) and nontreated (HS) with D-BHB before (time 0) and after insulin administration, and after glucose reperfusion. At the time of the loss of the righting reflex (RR) (2 to 3 hours after insulin) animals received 25% glucose (intraperitoneally) followed by a continuous 3-hour intravenous infusion of 25% glucose. Control animals were injected with vehicle solution. Blood glucose levels were monitored at the indicated times. Data represent means  $\pm$  s.e.m. ( $n=3$  to 7). BHB, beta-hydroxybutyrate.

hours in the presence or the absence of D- or L-BHB plus DHE (2.3  $\mu$ mol/L). Cells were also exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ mol/L) in the presence or the absence of D- or L-BHB (10 mmol/L) plus DHE during 3 hours. At the end of the exposure, cultures were washed and Et fluorescence determined as described above.

#### ATP Determination

Cells were plated on 12-well plates for 8 DIV. ATP concentration was determined immediately after 1.5 hours GD or after 3 hours GR. ATP levels were determined by means of a luminometer through the luciferin-luciferase quimioluminescent kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), as previously described<sup>20</sup> and ATP concentrations were calculated from readings obtained from an ATP standard curve (from 6.5 to 250 pmol). Aliquots of cell homogenates were kept for protein determination by the Lowry's method<sup>26</sup> and data are expressed as pmol/ $\mu$ g of protein.

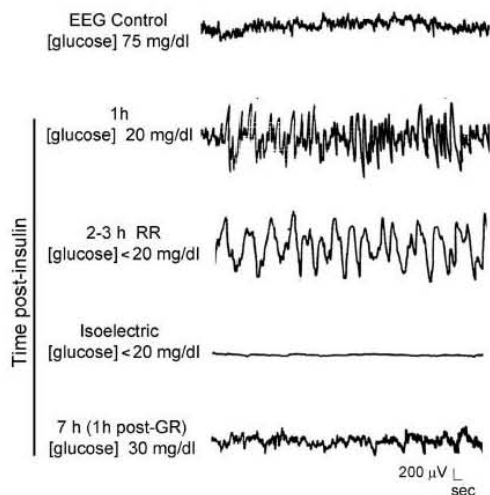
#### Statistics

All data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. and were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least multiple comparison test.

## RESULTS

#### Glucose Concentrations and Electroencephalogram Recording

Basal blood glucose concentrations ranged between 68 and 83 mg/dL and no statistical differences between the groups were observed. The two groups of insulin-treated rats showed glucose concentrations of 22.9 (HS) and 25.7 mg/dL (severe hypoglycemia, HS+D-BHB) 30 minutes after insulin administration. At the end of glucose infusion, animals slowly recovered glucose levels and at 24 hours all groups achieved normal glucose concentrations. The recovery of glucose levels in HS+D-BHB animals tended to be slower, but no statistical differences between the groups were observed (Figure 1). Figure 2 shows the EEG recordings obtained before and during insulin administration and after glucose infusion in a representative animal. Between 2 and 3 hours after insulin administration, the EEG showed the previously reported characteristic changes of hypoglycemia,<sup>22,27</sup> which consist in the



**Figure 2.** Changes in brain electrical activity (electroencephalogram, EEG) induced by severe hypoglycemia (HS). Representative EEG recording showing the changes in brain electrical activity in one insulin-injected animal before (EEG control) and during HS (1 to 3 hours after insulin), during isoelectricity and after the hypoglycemic episode (1 hour after glucose reperfusion, GR). The recording at the bottom shows the recovery of brain electrical activity 1 hour after the end of glucose infusion (7 hours after insulin).

slowing of the electrical brain activity and the predominance of the low frequency theta (4 to 8 Hz) and delta (1 to 4 Hz) waves. If animals were left to progress to the isoelectric period, then electrical brain activity was completely suppressed showing a flat EEG; 1 hour after the end of glucose infusion (7 hours after insulin) brain activity recovered (Figure 2). Animals receiving no D-BHB were separated into two groups; the first group was rescued with glucose at the time of the loss of the RR (HS) while the second group of animals was left to progress to the coma state (HS Iso) (isoelectricity) for a short period of variable duration (3 to 7 minutes) and was rescued with glucose alone after this period. None of the D-BHB-treated animals (HS+D-BHB) fell into the coma state 3 hours after insulin administration and thus they were rescued with glucose plus a second intraperitoneal administration of D-BHB at this time.

The concentration of D-BHB in blood was determined in the different groups of animals and is shown in Table 1. In fasted rats, D-BHB blood levels increased to 0.37 mmol/L relative to intact animals, which showed levels of 0.056 mmol/L. Twenty minutes after one D-BHB (250 mg/kg) injection levels increased to 0.69 mmol/L in control (fasted) animals, while insulin-treated animals showed 0.19 mmol/L. In hypoglycemic animals receiving two doses of 250 mg/kg D-BHB, levels increased to 0.41 mmol/L at the time of the loss of the RR. These results suggest that D-BHB-treated animals show mild ketonemia and that the KB is used as an alternative substrate to glucose during hypoglycemia, since D-BHB decreases from 0.69 to 0.41 mmol/L at the time of the loss of the RR.

#### Neuronal Death Induced by Severe Hypoglycemia and Its Protection by D-Beta-Hydroxybutyrate

Figure 3A shows the number of FJB-positive degenerating cells as observed 24 hours after insulin administration in different cortical areas of hypoglycemic animals not showing isoelectricity (HS).

**Table 1.** Plasma levels of D- $\beta$ -hydroxybutyrate (D-BHB) in rats with the different treatments

Treatment	D-BHB [mmol/L]
Intact	0.056 $\pm$ 0.021
Fasted	0.376 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>
Fasted+D-BHB 1 dose	0.698 $\pm$ 0.048 <sup>a,b</sup>
Insulin	0.194 $\pm$ 0.025
Insulin+D-BHB 2 doses	0.410 $\pm$ 0.058 <sup>a,c</sup>

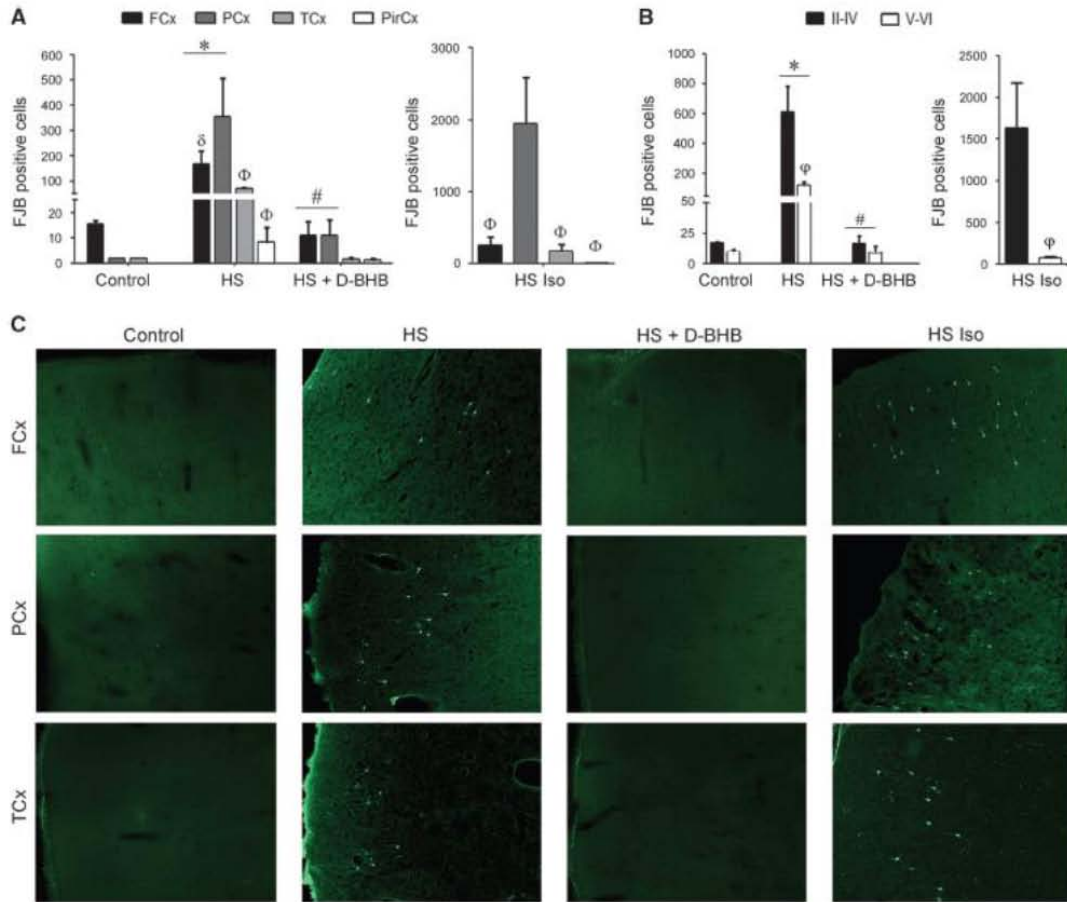
The levels of D-BHB were determined in plasma by an enzymatic assay in intact, fasted and hypoglycemic rats treated or nontreated with D-BHB. Animals were killed 20 minutes after the first D-BHB administration or at the time of the loss of the righting reflex in animals receiving two administrations of D-BHB (250 mg/kg). Data represent means  $\pm$  s.e.m. from at least 3 to 6 independent animals. <sup>a</sup> $P < 0.05$  relative to intact. <sup>b</sup> $P < 0.05$  relative to fasted. <sup>c</sup> $P < 0.05$  relative to insulin.

Only a few FJB-positive cells were observed in control animals in the frontal, parietal, and temporal cortices. The number of FJB-positive cells significantly increased in the frontal and the parietal cortical areas of hypoglycemic animals. The increase in the parietal cortex was higher and significantly different from the that in the frontal ( $P < 0.05$ ), temporal, and piriform cortices ( $P < 0.005$ ) (Figure 3A). Animals treated with D-BHB (HS+D-BHB) showed a notable reduction in the number in FJB-positive cells in all cortical areas. This reduction is significantly different in the frontal and parietal cortices ( $P < 0.05$ ) (Figure 3A). As expected, in animals subjected to a short period of isoelectricity the number of FJB-positive cells augmented in all cortical areas except for the piriform cortex. The parietal cortex showed the largest increase, which is statistically different relative to the frontal and the temporal cortices (Figure 3A).

Most of the degenerating cells were observed in the superficial and medium (II to IV) layers in all cortices rather than the deep layers (V and VI), and animals treated with D-BHB showed a significant reduction in the number of FJB-positive cells in all layers (Figure 3B). In rats exposed to isoelectricity the number of degenerating cells augmented mainly in layers II to IV while in layers V and VI this number remained unchanged (Figure 3B). The effect of D-BHB on cell death induced by coma was not determined because none of the D-BHB-treated rats showed isoelectricity. In Figure 3C, FJB-positive cells are shown in brain sections from representative severe hypoglycemic animals treated and nontreated with D-BHB, as well as hypoglycemic rats showing isoelectricity. As can be observed, FJB-positive cells are present in the frontal, parietal, and temporal cortices in hypoglycemic rats (HS), while D-BHB-treated rats show basically no degenerating cells (HS+D-BHB). More FJB-positive cells are visible in cortical areas from animals showing a short isoelectric period (HS Iso). From these animals only one showed FJB-positive cells in the crest of the dentate gyrus (377 cells) while in the HS group without coma only two rats showed degenerating cells (50 and 167, respectively) in this region. No FJB-positive cells were observed in other subregions of the hippocampus in any group of animals.

#### Reactive Oxygen Species Production Induced by Severe Hypoglycemia and Its Reduction by D-Beta-Hydroxybutyrate

Figure 4A shows Et fluorescence data in distinct cortical areas of animals of the control, HS, and HS+D-BHB groups. As can be observed, the frontal and the piriform cortices showed a higher basal Et signal in control animals as compared with the temporal and parietal cortices. In HS animals, the Et fluorescent signal significantly augmented in all cortical areas. Increases of 2.0-, 2.8-, 8.0-, and 10.0-fold were observed in the piriform, frontal, parietal, and temporal cortices, respectively. Et-positive cells were mainly



**Figure 3.** Number of degenerating Fluorojade B (FJB)-positive cells in different cortical areas of control and hypoglycemic animals treated (HS + D-BHB) and nontreated (HS) with D-BHB and of hypoglycemic animals exposed to isoelectricity (HS Iso) (A). The total number of FJB-positive cells in the superficial and medium (II to IV) and deep (V and VI) cortical layers in the different groups of animals is also shown (B). Data are expressed as  $\pm$  s.e.m. Control ( $n=3$ ), HS ( $n=4$ ), HS+DBHB ( $n=6$ ), HS Iso ( $n=5$ ). <sup>\*</sup> $P < 0.05$  relative to control; <sup>φ</sup> $P < 0.05$  relative to parietal cortex, <sup>δ</sup> $P < 0.005$  relative to parietal cortex, <sup>#</sup> $P < 0.05$  relative to HS, <sup>φ</sup> $P < 0.05$  relative to layers II to IV. Images from brain sections of representative animals of each group showing FJB-positive cells in different cortical areas are shown (C). HS, severe hypoglycemia; BHB, beta-hydroxybutyrate.

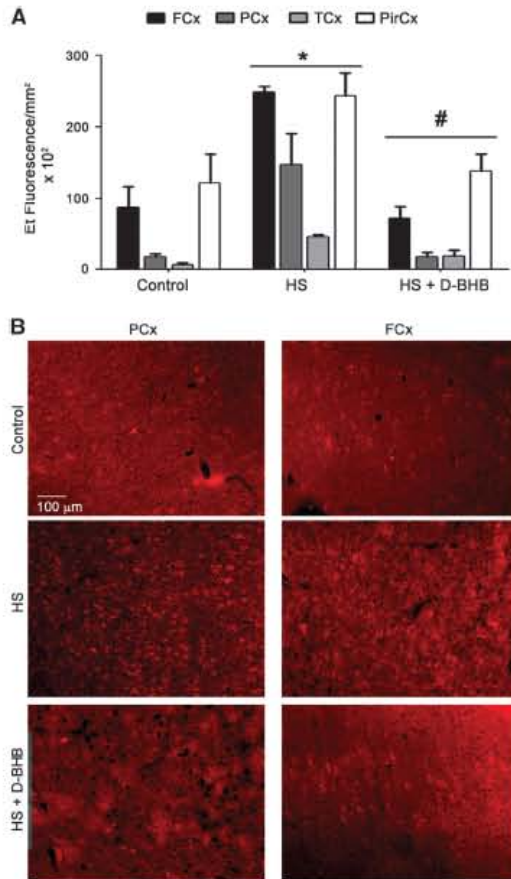
observed in the middle layers (III and IV) in all cortical areas. In animals treated with D-BHB the Et fluorescent signal significantly diminished in all areas, recovering its control value. Figure 4B shows representative images of Et-positive cells in the parietal and the frontal cortex of animals from the different groups.

The changes in Et fluorescence induced by hypoglycemia were also investigated in the hippocampus. As shown in Figure 5A, the hilus and CA3 showed higher basal levels of the Et signal as compared with CA1 and the DG in the control group. In HS rats, Et fluorescence increased in all the hippocampal subregions as compared with control animals. The most important changes relative to control levels were observed in CA1 and the DG showing increases of 11.2- and 17.2-fold, respectively, while in the hilus and CA3 Et fluorescence increased 4.3- and 2.7-fold, respectively. In animals treated with D-BHB Et fluorescence did not increase and remained close to control levels. Figure 5B shows representative images of the different hippocampal regions of animals exposed to the different treatments. As can be observed

Et-positive cells are visible in all hippocampal neuronal layers, while in control and D-BHB-treated animals the Et signal is notably lower.

#### Effect of D-Beta-Hydroxybutyrate on Neuronal Death and ATP Levels in Cultured Cortical Neurons Exposed to Glucose Deprivation

The effect of D-BHB against neuronal death was also investigated in cortical cultured neurons exposed to 1.5 hours of GD followed by 18 hours recovery in glucose-containing medium. Neuronal damage was evaluated by the MTT reduction and the LDH release assays. As observed in Figure 6A, GD caused a 54.8% release of LDH and a 67.0% decrease in MTT reduction. The protective effect of D-BHB against GD-induced neuronal death was tested after its incubation during GD or during GR, or during both periods. According to dose-response curves the maximum protective effect of D-BHB was observed at 10 mmol/L when incubated either



**Figure 4.** Et fluorescence units per area (Et fluorescence/mm<sup>2</sup>) in different cortical areas of control and hypoglycemic animals treated (HS+D-BHB) and nontreated (HS) with D-BHB (**A**). Images from different areas of the cerebral cortex (temporal, parietal, frontal, and piriform) were captured and the Et fluorescent signal measured. Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. Control ( $n=3$ ), HS ( $n=4$ ), HS + D-BHB ( $n=6$ ). \* $P < 0.05$  relative to control; # $P < 0.05$  relative to HS. (**B**) Images taken from brain sections of representative animals of each group showing Et-positive cells in PCx and the FCx. HS, severe hypoglycemia; BHB, beta-hydroxybutyrate.

during or after GD (Supplementary Figure 1A and B). When it was added during both periods, the combination showing maximum protection was 10 mmol/L (GD)+5 mmol/L (GR) (data not shown). The LDH release assay indicates that neuronal death was significantly reduced to 20.9% and 17.1%, when D-BHB was added during GD or during GR, respectively, while it was reduced to 8.4% when D-BHB was incubated during both periods (Figure 6A). No statistical difference was observed between the three different protocols of D-BHB administration. Similar results were found when survival was monitored by the MTT reduction assay (Figure 6B). When D-BHB was added only during GD neuronal survival was significantly stimulated as indicated by the increase in MTT reduction to 61.4% of control values. Incubation of D-BHB during GR also increased significantly cell survival to 48.9% of control levels. Incubation of D-BHB during GD and GR increased

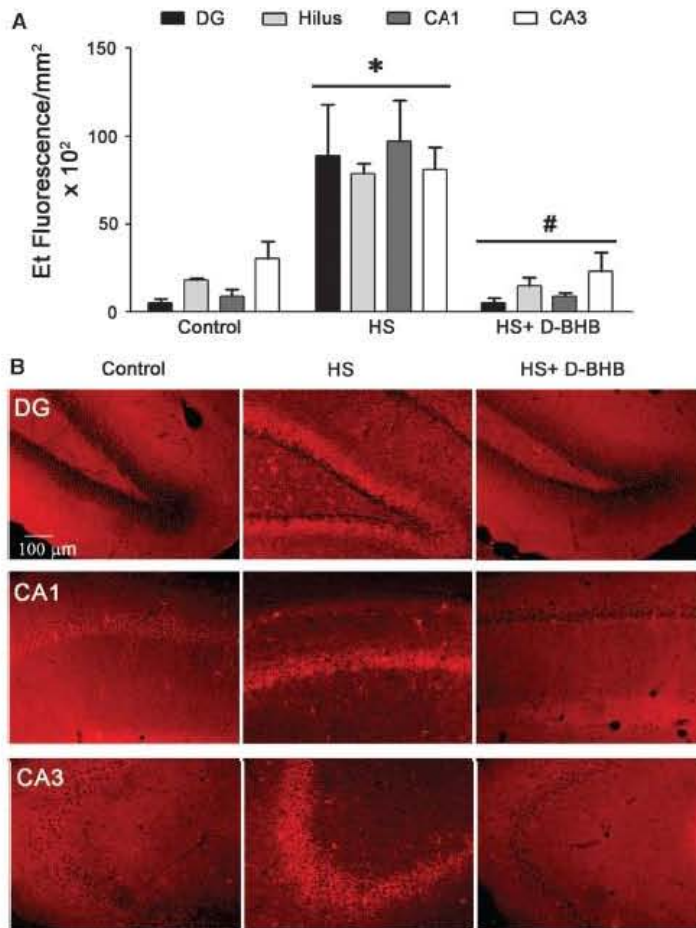
cell survival to 75.2% of control. No statistical difference was observed between the three different treatments.

The effect of L-BHB, the nonphysiologic isomer of BHB, was also tested. Dose-response curves for L-BHB are shown in Supplementary Figure 1A and B. As shown in Figures 5A and 5B, incubation with 10 mmol/L L-BHB only during GD had no effect on neuronal survival according to LDH release and MTT data. In contrast, increased cell survival was observed when L-BHB was present during GD and GR and when it was added only during recovery suggesting that the protective action of L-BHB is exerted during GR. However, L-BHB was less effective and its effect statistically different from that of D-BHB (Figure 6A; Supplementary Figure 1). Images of cultured cells exposed to the different treatments are shown in Figure 6D. As can be observed, exposure to GD causes a decrease in the number of cells with a normal morphology and many of them appear shrunken with thin and damaged processes. In contrast, cells exposed to D-BHB during GD and GR or only during GR appear morphologically similar to cells present in control cultures, while a lower number of cells with a normal morphology can be observed in cultures treated with L-BHB. The effect of D-BHB was compared with that of other energy substrates, such as pyruvate and lactate. Pyruvate significantly prevented neuronal death restoring MTT reduction to 60% of the control when incubated during the GD period, and its effect was not statistically different from that of 5 and 10 mmol/L D-BHB (Supplementary Figure 1A). Lactate was ineffective when incubated during GD. In the case of posttreatment pyruvate elicited significant protection restoring MTT reduction to 51% and 63% at 2 and 10 mmol/L, respectively, and this effect was not different from that of 5 and 10 mmol/L D-BHB (Supplementary Figure 1B). Lactate increased neuronal survival at 2 mmol/L showing a smaller protective effect as compared with 5 and 10 mmol/L D-BHB (Supplementary Figure 1B).

To test whether the preservation of energy levels contributes to the protective action of D-BHB, ATP levels were determined immediately after GD or after 3 hours of recovery in glucose containing medium. As depicted in Figure 6C, ATP concentration significantly declined 68% of the control value immediately after GD (Figure 6C, left bars) and did not recover after 3 hours of GR (Figure 6C, middle). When D-BHB was present during GD, ATP levels declined only 30% of control levels (Figure 6C, left bars) and remained elevated 3 hours after GR (middle bars). When D-BHB was added during GD and GR, ATP levels were restored to 73% of control values 3 hours after GR (right bars). ATP concentrations were also examined when D-BHB was added only during the recovery period, and in this case ATP recovered to 78% of control values (control  $11.86 \pm 0.325$ ; GD  $1.78 \pm 0.64$ ; D-BHB  $9.35 \pm 1.83$   $n=3$ ). No statistical difference was found in the recovery of ATP levels observed after the different protocols of D-BHB administration.

In contrast to D-BHB, incubation with L-BHB during GD did not increase significantly ATP concentration as determined either immediately after GD or 3 hours after GR (Figure 6C, left and middle bars). When L-BHB was present during both GD and GR, ATP levels were neither restored. Similarly, L-BHB had no effect on ATP concentration when incubated only during recovery (control  $11.86 \pm 0.32$ ; GD  $1.78 \pm 0.64$ ; L-BHB  $3.9$ ,  $n=3$ ). As expected, these data suggest that the protective effect of L-BHB can not be attributed to a metabolic action.

In agreement with these results, we observed that 10 mmol/L D-BHB was able to rescue a small percentage (20.2%) of cells when added alone (no glucose) in the recovery medium (Supplementary Figure 2), suggesting that D-BHB can sustain energy metabolism to a limited extent in this conditions. In contrast, 10 mmol/L L-BHB was unable to prevent neuronal damage in the absence of glucose. When D-BHB was added to the recovery medium in combination with different concentrations of glucose, it



**Figure 5.** Et fluorescence units per unit area (Et fluorescence/mm<sup>2</sup>) in different subregions of the hippocampus of control and hypoglycemic animals treated (HS+D-BHB) and nontreated (HS) with D-BHB (A). Images from different hippocampal subregions (CA1, CA3, dentate gyrus (DG), Hilus) were captured and the Et fluorescent signal measured. Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. Control (n=3), HS (n=4), HS+D-BHB (n=6). \*P < 0.05 relative to control; #P < 0.05 relative to HS. (B) Images from brain sections of representative animals of each group show Et-positive cells in the different hippocampal subregions (B). HS, severe hypoglycemia; BHB, beta-hydroxybutyrate.

significantly increased cell survival at 5 and 10 mmol/L glucose, while this improvement was no longer significant when combined with 20 mmol/L glucose (Supplementary Figure 2). Protection by D-BHB in the presence of 10 mmol/L glucose agrees with the protective effect observed in the experiments shown in Figures 6A and 6B, in which the concentration of glucose in the recovery medium was 10 to 13 mmol/L. These results suggest that the improvement of cell survival by D-BHB requires the presence of glucose.

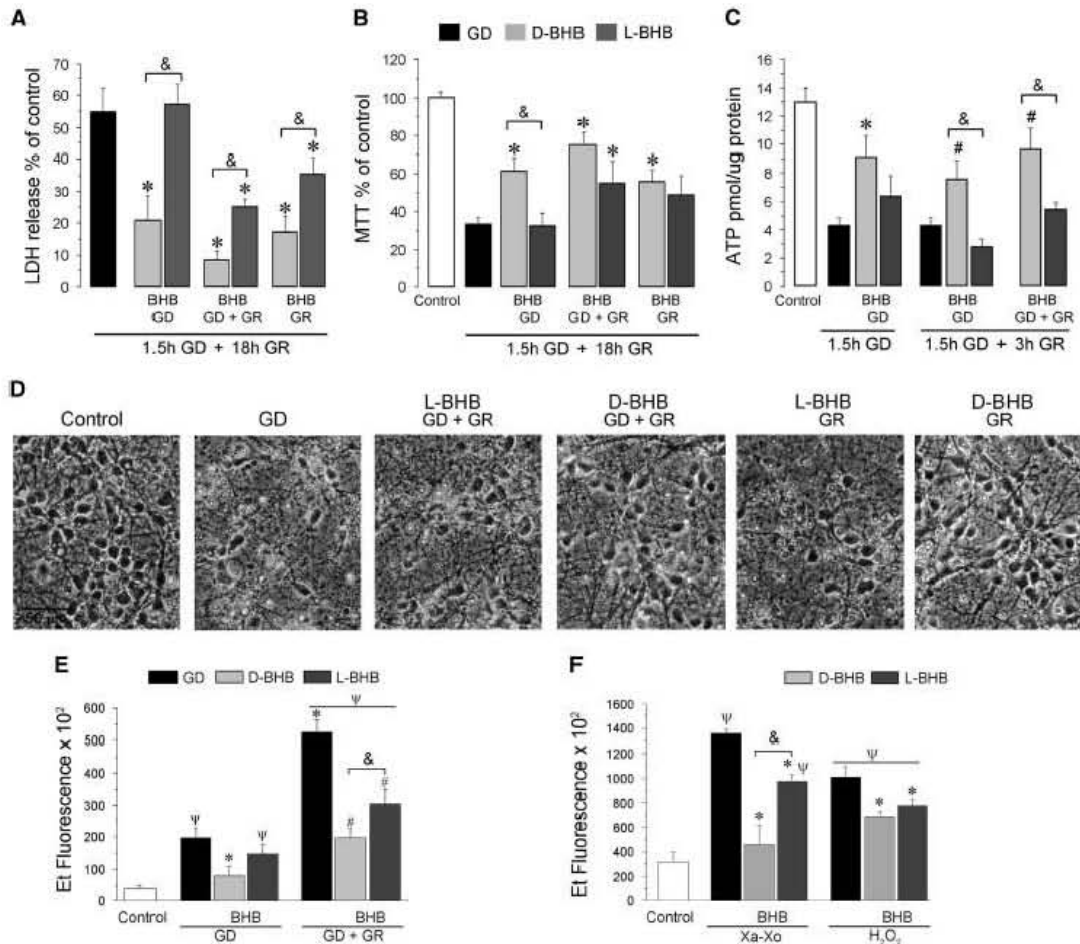
#### Effect of Beta-Hydroxybutyrate on Reactive Oxygen Species Production in Cultured Cortical Neurons Exposed to GD+GR, Xa/Xo, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In a previous study, we reported that both isomers of BHB efficiently prevent the production of ROS induced by glycolysis inhibition.<sup>10</sup> We have now investigated the effect of L- and D-BHB on ROS generated during and after GD. As shown in Figure 6E, the

Et fluorescent signal increased at the end of GD relative to control values, and D-BHB significantly reduced this increase, while L-BHB had no effect. Cultures exposed to 1.5 hours of GD followed by 1 hour of GR showed a notable increase in Et fluorescence relative to cultures exposed only GD indicating that ROS are mainly produced during GR. Cultures exposed to L- or D-BHB during GD and GR significantly reduced ROS production. The effect of D-BHB was significantly different from that of L-BHB (Figure 6E).

These results suggest that protection by BHB can be attributed not only to a metabolic action but also to an antioxidant effect. To further test this hypothesis, we used two different conditions to stimulate ROS production that are not directly associated with energy failure. To stimulate the production of superoxide, cells were exposed to Xa/Xo in the presence of DHE and the Et fluorescent signal was quantitated. As observed in Figure 6F, both BHB isomers reduced Et fluorescence showing D-BHB a better effect. Similarly, the increase in the Et signal induced by





**Figure 6.** Cell survival monitored by lactate dehydrogenase (LDH) (A) and MTT (B) assays in cortical cultures exposed to GD+GR. D-BHB and L-BHB were incubated only during GD (10 mmol/L, left bars), during GD and GR (10 and 5 mmol/L, respectively, middle bars) and only during GR (10 mmol/L, right bars). Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. ( $n=5$  to 10 independent experiments performed in duplicate). \* $P < 0.05$  relative to GD,  $^{\#}P < 0.05$  relative to L-BHB. Changes in ATP levels are shown in (C). Cells were exposed to GD in the presence or the absence of D- and L-BHB (left bars) or exposed to GD and 3 hours of GR (middle and right bars). D- and L-BHB were added only during GD (right and middle bars) or during both GD and GR (right bars). Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. ( $n=3$  to 7) independent experiments. \* $P < 0.05$  relative to GD,  $^{\#}P < 0.05$  relative to GD+GR,  $^{\psi}P < 0.05$  relative to L-BHB. Bright field microscopy images of a representative experiment showing the morphologic changes elicited by the different treatments are shown in (D). The effect of D- and L-BHB on reactive oxygen species (ROS) production induced by GD+GR, by xanthine/xanthine oxidase (Xa/Xo) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are shown in (E) and (F). Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. ( $n=3$  to 4).  $^{\psi}P < 0.05$  relative to control, \* $P < 0.05$  relative to GD, Xa/Xo or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $^{\#}P < 0.05$  relative to GD+GR,  $^{\psi}P < 0.05$  relative to L-BHB. BHB, beta-hydroxybutyrate; GD, glucose deprivation.

incubation of cells in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was significantly reduced by BHB showing the two isomers similar effects.

## DISCUSSION

The present results agree with previous findings showing that prolonged noncoma hypoglycemia induces neuronal death mainly in the cerebral cortex<sup>22,28,29</sup> and add new information about the distribution of degenerating and ROS-producing cells. According to the present data, noncoma hypoglycemia leads to cell death in the parietal and frontal cortices, showing the parietal cortex the highest number of degenerating neurons. In contrast to previous studies,<sup>28,29</sup> we were unable to detect a significant

number of FJB-positive neurons in the piriform cortex. This discrepancy, might be possibly attributed to some variations in the experimental protocols or to differences in strain vulnerability to hypoglycemic neuronal damage. The majority of FJB-positive cells are observed in the superficial and medium cortical layers (II to IV), and in animals experiencing a short period of isoelectricity, the number of FJB-positive cells increases mainly in these layers in all cortical areas except for the piriform cortex. Previous studies reported that animals experiencing a long period (60 minutes) of isoelectricity show most of degenerating neurons in layers II and III of the cerebral cortex.<sup>23</sup> In the present condition, degenerating neurons were also observed in layer IV suggesting that these cells are also vulnerable to prolonged noncoma hypoglycemia. In an

attempt to investigate the correlation between cell death and ROS production, the fluorescent signal emitted by Et-positive cells was measured in different cortical areas. Results indicate that the parietal cortex, which shows the highest number of FJB-positive cells, also substantially increases the Et signal (8-fold). In the case of the frontal cortex, the increase in Et fluorescence is more modest (2.8-fold), as it is also the increase in the number of degenerating neurons relative to the parietal cortex. The temporal cortex showed a large increase in Et fluorescence (10-fold) relative to its control value; however, the total fluorescent signal in this region is much lower than that in the parietal cortex, which correlates with the low number of FJB-positive cells present in this region. Finally, the piriform cortex shows only few FJB-positive cells and a modest increase in Et fluorescence (2-fold). These results suggest a correlation between the amount of fluorescence observed in the different cortical areas and the number of degenerating neurons. However, Et-positive neurons are present mainly in layers III and IV rather than superficial (II) and deep cortical layers (V and VI). Therefore, a good correlation was found between ROS production and cell death in layers III and IV but not in layer II where FJB-positive cells were found while no Et-positive cells were evident, at least 24 hours after insulin administration, suggesting that selective neuronal death cannot be completely attributed to oxidative stress.

However, in the hippocampus Et fluorescence was detected in all subregions being the DG and CA1 the areas with the highest increase in the Et signal. These two areas have been reported as the most vulnerable to cell death induced by the hypoglycemic coma.<sup>23</sup> However, in the present conditions only a few degenerating cells were observed in the crest of the DG in some of the animals, suggesting that despite increased ROS production, the hippocampus is more resistant than the cortex to oxidative damage and cell death induced by noncoma hypoglycemia, in agreement with previous studies showing more damage in the cortex than in the hippocampus of rats subjected to noncoma hypoglycemia.<sup>22,29</sup> They also agree with our recent observations in the brain of mice exposed to noncoma hypoglycemia, which show large increases in ROS production in the hippocampus but no cell death.<sup>21</sup> Therefore, in the present conditions no correlation was found between increased ROS production and cell death the case of the hippocampus.

In the present study we tested the potential of D-BHB to substitute for glucose as an energy substrate during glucose depletion and to prevent the subsequent death of neurons. *In vivo* results show that hypoglycemic animals rescued with glucose and treated with D-BHB showed decreased cell death in the cortex and ROS production in the cortex and the hippocampus as compared with animals rescued with glucose alone. We observed that D-BHB-treated animals did not show the EEG characteristic changes of the coma state after 3 hours of insulin injection. Similar results were reported in rat pups treated with BHB, which showed a delayed onset to the hypoglycemic coma.<sup>30</sup> This effect might be attributed to the utilization of D-BHB in the brain since we observed that blood levels of the KB decrease in insulin-treated rats at the time of the loss of the RR (0.4 mmol/L) as compared with noninsulin-treated animals receiving D-BHB (0.69 mmol/L). These results agree with recent reports suggesting that D-BHB can be used as an alternative substrate, as a decrease in the glucose metabolic rate is observed in the brain of animals subjected to the ketogenic diet.<sup>31,32</sup>

*In vitro* data show that D-BHB notably prevents neuronal death when incubated during GD and GR, but is also effective when incubated only during GD or only during GR. Consistently, ATP levels recover to the same extent when D-BHB is present only during GD, only during GR or during both periods. According to these data preserving ATP concentrations at levels 30% to 40% below control values is sufficient to significantly prevent neuronal death. These observations also indicate that D-BHB can stimulate

ATP production during GD but also during GR likely through its metabolism by the tricarboxylic acid cycle. Even though, D-BHB was able to rescue a small percentage of neurons in the absence of glucose, the best recovery of cells was obtained with the combination of D-BHB plus 5 or 10 mmol/L glucose, suggesting that the improvement of cell survival by D-BHB requires the presence of glucose.

The present results agree with other studies showing protection by the ketogenic diet or BHB infusion against ischemic and traumatic brain injury.<sup>6–8,33–36</sup> The improvement of mitochondrial function and ATP production has been suggested by several studies as the main mechanism involved in the neuroprotective action of KB.<sup>11,16,17,33</sup> We also tested the protective effect of pyruvate and lactate, which can also be used by brain as alternative substrates to glucose through its metabolism by the tricarboxylic acid cycle. In agreement with previous studies,<sup>37–39</sup> we observed a reduction of neuronal death in the *in vitro* model by both substrates, while the effect of pyruvate was similar to that of D-BHB, lactate was less effective.

According to the present data, besides the stimulation of ATP production, D-BHB also reduces ROS levels. Similar results have been previously reported in cultured and isolated neurons<sup>10–12,16</sup> as well as in isolated mitochondria,<sup>16</sup> and this effect has been implicated in the protective action of KB against excitotoxic neuronal death.<sup>10–12,16</sup> In agreement, *in vivo* studies have shown that BHB reduces the increase in lipoperoxidation induced by brain ischemia and hypoglycemia.<sup>6,10</sup> An antioxidant action of KB can result from the increase in NADH oxidation and/or the improvement of mitochondrial function.<sup>10,16</sup> In addition, in a previous study we reported in a free cell system that both isomers of BHB can scavenge the hydroxyl radical with an IC50 of 2 to 3 mmol/L.<sup>10</sup> We also showed that both isomers reduce the number of Et-positive hippocampal cells during glycolysis inhibition, suggesting that they retain their capacity to scavenge ROS in a cellular system.<sup>10</sup> We now show that both BHB isomers reduce ROS production induced by the exposure to Xa/Xo, which produces superoxide and the hydroxyl radical after superoxide dismutation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of Fe<sup>2+</sup>. Similarly, D- and L-BHB reduce the Et fluorescence induced by cell exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The ROS production in these conditions is not initiated by energy failure and therefore the effect of D-BHB would be more related to an antioxidant rather than a metabolic action. According to the present results, L-BHB reduces ROS generated during GR despite its lack of a metabolic action, suggesting that ROS production during this period not only results from mitochondrial dysfunction but additional sources might be involved. In agreement, it has been shown that ROS generated during GR mainly result from the activity of NADPH oxidase,<sup>19</sup> a superoxide producing enzyme, but other sources might also contribute.<sup>20</sup> The present data suggest that the protective action of L-BHB results from its capacity to reduce ROS, since it is effective only during posttreatment, when most ROS are produced.

Other mechanisms of protection by KB have been suggested such as the inhibition of ATP-sensitive potassium channels that induces membrane hyperpolarization and reduces neuronal firing, contributing to the control of seizures in epileptic patients,<sup>40,41</sup> and the blockade of chloride-dependent glutamate uptake into synaptic vesicles, inhibiting glutamate release.<sup>42</sup> These mechanisms might be involved in KB protection against ischemic and hypoglycemic injury, since the release of excitatory amino acids during these conditions initiates the excitotoxic cell death cascade.<sup>43,44</sup> In addition, it has recently been shown that the ketogenic diet and the infusion of BHB stabilize the hypoxia induced factor, which regulates the expression of genes involved in energy metabolism and antiapoptotic proteins such as Bcl-2.<sup>7</sup> It remains to be investigated whether these mechanisms are involved in the protective effect of BHB observed in the present experimental conditions.

In conclusion, the present observations suggest that D-BHB can substitute for glucose in an *in vivo* model of noncoma hypoglycemia and effectively prevent ROS generation and cell death in all affected cortical areas, regardless their differential production of ROS and vulnerability to cell death. *In vitro* results suggest that the metabolic activity of D-BHB in combination with its antioxidant action contributes to the effective protective action of this KB, and that these actions can take place during the recovery period in the presence of glucose. These observations support the therapeutic potential of D-BHB against ischemic and traumatic insults, which are associated with energy impairment and oxidative stress and which require treatments that can be effective when administered after the insult.

**DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

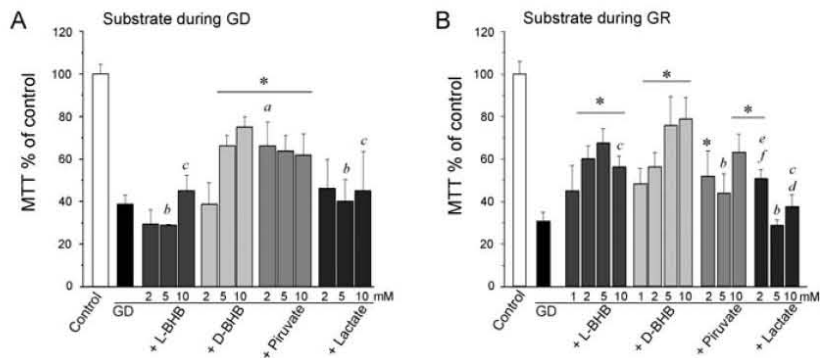
**REFERENCES**

- 1 Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. Ketone body utilization by adult and suckling rat brain *in vivo*. *Biochem J* 1971; **122**: 13–18.
- 2 Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 1993; **40**: 163–221.
- 3 Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 1967; **46**: 1589–1595.
- 4 Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. Ketogenic diet, amino acid metabolism and seizure control. *J Neurosci Res* 2001; **66**: 931–940.
- 5 Masuda R, Monahan JW, Kashiwaya Y. D-beta-hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J Neurosci Res* 2005; **80**: 501–509.
- 6 Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S et al. *β*-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn J Pharmacol* 2002; **89**: 36–43.
- 7 Puchowicz MA, Zechel JL, Valerio J, Emandipator DS, Xu K, Pundik S et al. Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; **28**: 1907–1916.
- 8 Tai KK, Nguyen N, Pham L, Truong DD. Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration. *J Neural Transm* 2008; **115**: 1011–1017.
- 9 Yamada KA, Rensing N, Thio LL. Ketogenic diet reduces hypoglycemia-induced neuronal death in young rats. *Neurosci Lett* 2005; **385**: 210–214.
- 10 Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 2008; **211**: 85–96.
- 11 Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 2003; **120**: 365–378.
- 12 Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS et al. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 2006; **83**: 702–709.
- 13 Nordli DR, Kuroda MM, Carroll J, Koenigsberger DY, Hirsch LJ, Bruner HJ et al. Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics* 2001; **108**: 129–133.
- 14 Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G et al. A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia* 2009; **50**: 1109–1117.
- 15 Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Grene JG et al. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol* 2006; **60**: 223–235.
- 16 Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 2007; **145**: 256–264.
- 17 Zhang J, Cao Q, Li S, Lu X, Zhao Y, Guan JS et al. 3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondrial protection mechanism. *Biomaterials* 2013; **34**: 7552–7562.
- 18 Mejía-Taíber J, Montiel T, Massieu L. D-*β*-hydroxybutyrate prevents glutamate-induced lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochem Res* 2006; **31**: 1399–1408.

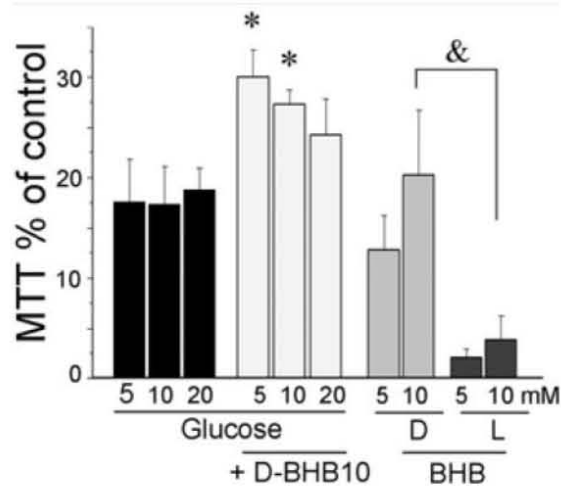
- 19 Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 2007; **117**: 910–918.
- 20 Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez A, Jiménez N, Hernández-Cruz A, Massieu L. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 2010; **167**: 1057–1069.
- 21 Amador-Alvarado L, Montiel T, Massieu L. Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metab Brain Dis* 2014; **29**: 711–719.
- 22 Haces ML, Montiel T, Massieu L. Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 2010; **165**: 28–38.
- 23 Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Sesjö BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 1984; **64**: 177–191.
- 24 Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 1996; **16**: 1324–1336.
- 25 Paxinos G, Watson C (Eds.) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press: Sydney, 1986.
- 26 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265–275.
- 27 Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E et al. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 2003; **23**: 10601–10609.
- 28 Tkacs NC, Pan Y, Raghupathi R, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after non-coma hypoglycemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; **25**: 1645–1655.
- 29 Ennis K, Tran PV, Seaquist ER, Roa R. Postnatal age influences hypoglycemia-induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res* 2008; **1224**: 119–126.
- 30 Schutz PW, Wong PKH, O'Kusky J, Innis SM, Stockler S. Effects of D-3-hydroxybutyrate treatment on hypoglycemic coma in rat pups. *Exp Neurol* 2011; **227**: 180–187.
- 31 LaManna JC, Salem N, Puchowicz M, Erokou B, Koppaka S, Flask C et al. Ketones suppress brain glucose consumption. *Adv Exp Med Biol* 2009; **645**: 301–306.
- 32 Zhang Y, Kuang Y, Xu K, Harris D, Lee Z, LaManna J et al. Ketosis proportionately spares glucose utilization in brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; **33**: 1307–1311.
- 33 Suzuki M, Suzuki M, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A et al. Effect of *β*-hydroxybutyrate; a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 2001; **87**: 143–150.
- 34 Prins ML, Fujima LS, Hovda DA. Age-dependent reduction of cortical contusion volume by ketones following traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2005; **82**: 413–420.
- 35 Hu ZG, Wang HD, Jin W, Yin HX. Ketogenic Diet reduces cytochrome c release and cellular apoptosis following traumatic brain injury in juvenile rats. *Ann Clin Lab Sci* 2009; **39**: 76–83.
- 36 Gibson CL, Murphy AN, Murphy SP. Stroke outcome in the ketogenic state—a systematic review of the animal data. *J Neurochem* 2012; **123**: 52–57.
- 37 Zhou D, Qian J, Chang H, Bo X, Xi E, Sun RP. Pyruvate administered to newborn rats with insulin-induced hypoglycemic brain injury reduces neuronal death and cognitive impairment. *Eur J Pediatr* 2012; **171**: 103–109.
- 38 Won SJ, Jang BG, Yoo BH, Sohn M, Lee MW, Choi BY et al. Prevention of acute/severe hypoglycemia-induced neuron death by lactate administration. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; **32**: 1086–1096.
- 39 Choi BY, Kim JH, Kim HJ, Yoo JH, Song HK, Sohn M et al. Pyruvate administration reduces recurrent/moderate hypoglycemia-induced cortical neuron death in diabetic rats. *PLoS One* 2013; **8**: e81523.
- 40 Ma W, Berg J, Yellen G. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. *J Neurosci* 2007; **27**: 3618–3625.
- 41 Tanner GR, Lutas A, Martinez-Francois JR, Yellen G. Single KATP Channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. *J Neurosci* 2011; **31**: 8689–8696.
- 42 Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 2010; **68**: 99–211.
- 43 Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; **43**: 1369–1374.
- 44 Sandberg M, Nystrom B, Hamberger A. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *In vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 1988; **47**: 178–184.

Supplementary Information accompanies the paper on the Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism website (<http://www.nature.com/jcbfm>)

Figuras suplementarias:



Supplementary Fig1. Protection of different concentrations of energy substrates against neuronal death induced by GD. L-BHB, D-BHB, pyruvate and lactate were added at the indicated concentrations during GD (A) or GR (B) and neuronal survival was assessed by the MTT assay. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments. \* $p < 0.05$  relative to GD, *a*  $p < 0.05$  relative to D-BHB 2 mM, *b*  $p < 0.05$  relative to D-BHB 5 mM, *c*  $p < 0.05$  relative to D-BHB 10 mM, *d*  $p < 0.05$  relative to pyruvate 10 mM, *e*  $p < 0.05$  relative to D-BHB 5 mM, *f*  $p < 0.05$  relative to D-BHB 10 mM.



Supplementary Fig 2. The protective effect of BHB was tested in combination with different concentrations of glucose in the recovery medium and in the absence of glucose. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments. \* $p < 0.05$  relative to glucose, &  $p < 0.05$  relative to L-BHB.