



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Muerte neuronal inducida por
ausencia de glucosa: participación
de la excitotoxicidad y el estrés
oxidativo.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA



BLANCA ESTELA PÁRAMO SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍALOURDES MASSIEU TRIGO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

Índice	i
Abreviaturas	ii
Introducción	1
Transmisión glutamatérgica	3
Receptores a glutamato	4
Transporte de glutamato	7
Excitotoxicidad	8
Estrés oxidativo	10
Especies reactivas de oxígeno y radicales libres	11
Sistemas de defensa antioxidante	14
Metabolismo de la glucosa en el Sistema Nervioso Central	17
Transporte de glucosa	18
Síntesis de ATP	19
Hipoglucemia	21
Características	22
Mecanismos involucrados en el daño hipoglucémico	23
El papel del estrés oxidativo en la muerte neuronal hipoglucémica	24
Hipótesis	27
Objetivos	28
Metodología	29
Cultivos celulares	29
Tratamientos	29
Viabilidad celular	30
Curso temporal de muerte	31
Cuantificación de aminoácidos por HPLC	31
Cuantificación de los niveles de ATP	31
Detección de ERO	31
Análisis estadístico	32
Resultados	34
Discusión	46
Conclusiones	50
Perspectivas	50
Referencias	51

Abreviaturas

- AMPA** α -amino-3-hydroxy-5-metililoxazol-4-propiónico
ATP Adenosín trifosfato
CCSV canales de calcio sensibles a voltaje
DAG diacil glicerol
DIV días *in vitro*
DMEM medio Dulbecco modificado del medio Eagle, Dulbecco's Modified Eagle's Médium
EGG electroencefalograma
H₂O₂ peróxido de hidrógeno
HPLC High Performance Liquid Chromatography
iGluRs receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IP3 inositol trifosfato
mGluRs receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801 (+)-5-metil-10,11- dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imine maleato)
MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide
NADP nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NADPH nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD⁺ nicotinamida adenín dinucleótido
NADH nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NaF fluoruro de sodio
NB medio neurobasal
NBQX 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalina-2,3-diona
NMDA N-metil-D-aspartato
NMDAR Receptores NMDA
NO óxido nítrico
NOS óxido nítrico sintasa
O₂ oxígeno molecular diatómico
O₂⁻ anión superóxido
OH[•] radical hidroxil
ONOO⁻ Peroxinitrito
ERN especies reactivas de nitrógeno
ERO especies reactivas de oxígeno
SNC sistema nervioso central
SNP sistema nervioso periférico
SN sistema nervioso
SOD superóxido dismutasa

Introducción

Generalidades del Sistema Nervioso

El sistema nervioso (SN) se encuentra distribuido en todo el organismo y se divide a su vez en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). El SNP está constituido por ganglios y nervios periféricos que lo conectan con el SNC.

El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal, el primero rodeado por el cráneo, que lo aísla del medio exterior y por debajo del cual se localiza una capa de células denominadas meninges que además de proteger al cerebro producen el fluido cerebrospinal. Debajo de las meninges se localiza un conjunto de células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos unidas unas con otras formando lo que se denomina barrera hematoencefálica. Ésta evita el paso de toxinas u otros metabolitos presentes en la sangre.

Tipos celulares: neuronas y células gliales

La estructura celular del SN está constituida por dos tipos principales de células: neuronas y células gliales. Las neuronas son las unidades de comunicación del SN que poseen la misma estructura básica pero varían en forma y tamaño. Están conformadas por el soma o cuerpo celular y las neuritas: el axón y las dendritas.

Las células gliales son un conjunto de células cuya función es de soporte, tanto estructural como metabólico, contribuyendo al crecimiento y funcionamiento óptimo de las neuronas. Existen cuatro tipos principales de células gliales: astrocitos, microglia, oligodendrocitos y células de Schwann, las tres primeras se ubican en el SNC, en tanto que las últimas se localizan en el SNP.

Transmisión sináptica

La transmisión sináptica es el proceso por medio del cual una señal pasa de una neurona a una célula blanco modificando su actividad. *Sinapsis* es el término acuñado por Charles Sherrington a finales del siglo XIX, que define al lugar específico en donde ocurre la transmisión sináptica bien sea interneuronal o neuromuscular.

La comunicación entre las neuronas se basa en el flujo de iones al interior y exterior de la célula. La distribución selectiva de iones a través de la membrana genera diferencias en la distribución de cargas eléctricas. Esta distribución inequitativa de cargas da lugar a una diferencia de potencial denominada potencial de membrana. Cuando el potencial de membrana permanece sin

cambios se le conoce como potencial de reposo y cuando existe un cambio súbito de potencial debido a un cambio en la permeabilidad iónica de la membrana se produce un potencial de acción.

En condiciones de “inactividad”, las neuronas tienen un potencial de reposo negativo debido a la permeabilidad selectiva de la membrana al potasio (K^+). La diferencia de concentración se mantiene por la presencia de cargas negativas en el interior celular y por la acción de la ATPasa Na^+/K^+ que bombea continuamente iones sodio (Na^+) al exterior y iones K^+ al interior celular. Un potencial de acción es un cambio súbito, del todo o nada en el potencial de membrana, que se extiende a lo largo de toda la membrana neuronal y que se origina por un estímulo despolarizante que supera un umbral. Cuando se genera una despolarización en la membrana debido a un potencial de acción ésta induce la apertura de canales de Na^+ sensibles a voltaje. El influjo precipitado de sodio despolariza la membrana. Al mismo tiempo pero más lentamente, los canales de potasio sensibles al voltaje se abren, lo cual permite que el potasio salga. Esto, aunado a la inactivación de los canales de sodio, permite la repolarización de la membrana.

Tanto el potencial de acción como el potencial de reposo pueden explicarse por los cambios dependientes del tiempo y del voltaje en las permeabilidades de la membrana neuronal al sodio y al potasio.

Sinapsis Química y Eléctrica

Existen dos tipos de sinapsis: química y eléctrica. En la sinapsis eléctrica la comunicación se lleva a cabo a través del flujo de la corriente eléctrica directamente desde una neurona hacia la otra, asegurando una rápida y exacta transmisión de la señal. En la sinápsis química en cambio, la comunicación se lleva a cabo por medio de intermediarios denominados neurotransmisores, que son biomoléculas de distintos tipos que se sintetizan en la neurona presináptica y se liberan por exocitosis, por la fusión de vesículas que contienen al neurotransmisor con la membrana plasmática en la terminal presináptica. La exocitosis es un proceso dependiente de la entrada de calcio subsecuente a la despolarización de la membrana. Una vez que son liberados, los neurotransmisores se unen a receptores específicos que se encuentran en la neurona postsináptica y son removidos del espacio sináptico por transportadores o mecanismos enzimáticos.

Los neurotransmisores a través de su interacción con receptores específicos pueden producir el influjo de iones al interior celular. Estos pueden ser excitadores o inhibidores dependiendo de la carga del ión al que sean permeables sus receptores. En general los neurotransmisores excitadores dan lugar al influjo de Na^+ y los inhibidores al de cloro (Cl^-).

Transmisión glutamatérgica

La transmisión sináptica mediada por el glutamato se denomina transmisión glutamatérgica. El aminoácido glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC de los mamíferos. Es mediador de la información sensorial, la potenciación a largo plazo, la coordinación motora, las emociones, procesos cognitivos como la formación de la memoria y la plasticidad, entre otros.

Un gran número de neuronas en el SNC utilizan al glutamato como neurotransmisor. Aproximadamente el 80-90% de la sinápsis excitadoras son glutamatérgicas (1). Una cantidad importante de energía es utilizada para repolarizar la membrana de las células que son despolarizadas por la activación de los receptores a glutamato, y gran parte del oxígeno y la glucosa consumidos en el cerebro es utilizada para mantener la actividad glutamatérgica.

Además de su papel como neurotransmisor el glutamato es precursor de la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio, y de la glutamina en las células gliales. Además, forma parte de proteínas y de péptidos como el glutatión, que es parte de las defensas antioxidantes del cerebro.

El glutamato se sintetiza como parte del metabolismo de la glucosa y aminoácidos a través de la glucólisis y del ciclo de Krebs a partir del α -cetoglutarato por medio de una reacción de transaminación. El esqueleto de carbón que forma al glutamato proviene de la glucosa sanguínea en tanto que el grupo amino proviene de los aminoácidos que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

Una vez sintetizado, el glutamato se almacena en vesículas localizadas en la terminal presináptica. Ante un estímulo despolarizante, la entrada de calcio a través de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) favorece el anclaje y fusión de las proteínas vesiculares con la membrana plasmática presináptica, lo cual permite la liberación del glutamato al espacio sináptico. En el espacio sináptico, el glutamato activa a sus receptores localizados en la membrana de la postsinapsis.

Receptores al glutamato

De manera general los receptores a glutamato se dividen en receptores ionotrópicos (iGluRs), que son canales iónicos cuya estructura permite la entrada a ciertos iones al citoplasma, y receptores metabotrópicos (mGluRs) que están asociados a proteínas G, cuya función es desencadenar vías de transducción de segundos mensajeros (Figura 1).

Los receptores de tipo ionotrópico a su vez se dividen en dos: los de tipo NMDA (NMDAR), denominados de este modo porque su agonista exógeno es el N-metil-D-aspartato; y los no-NMDA, dentro de los que se encuentran los receptores de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionato) y los receptores de tipo kainato. Estos receptores se denominan como no-NMDA porque comparten ciertas características que los hacen muy diferentes a los NMDA.

Receptores NMDA

El receptor NMDA es un tetrámero transmembranal que forma un poro permeable a N^+ , K^+ y principalmente Ca^{2+} . Responde más tardíamente al glutamato que los receptores no-NMDA ante un estímulo de glutamato y contribuye con el componente lento de la corriente. Este receptor presenta varios sitios moduladores además del sitio de unión al glutamato: 1) el sitio de unión a la glicina (coagonista), que es necesario para la activación del canal; 2) el sitio de unión al Mg^{2+} cuya remoción dependiente del voltaje es necesaria para la apertura del canal, lo cual permite la entrada de iones, incluyendo calcio, y es el sitio al que se une el antagonista no competitivo maleato de dizocilpina (MK-801); 3) el sitio de unión al zinc; 4) el sitio de unión a poliaminas, compuestos endógenos que incrementan o inhiben la actividad del receptor; 5) el sitio de unión al glutatión; y 6) un sitio de unión a protones que hace la actividad del receptor sensible al pH.

Los NMDAR funcionan como heterotetrámeros. A la fecha se han identificado 7 subunidades codificadas por diferentes genes: una NR1, cuatro NR2 (A-D) y 2 NR3 (A y B). Los heterotetrámeros están compuestos por dos subunidades NR1 de unión a glicina y dos subunidades NR2 de unión al glutamato.

La subunidad NR2 le confiere al canal algunas propiedades biofísicas y farmacológicas, incluyendo la sensibilidad al zinc, al pH y a las poliaminas, la cinética de desactivación, la conductancia del canal y su interacción con moléculas señalizadoras intracelulares.

Receptores no-NMDA

Los receptores AMPA y kainato se agrupan como receptores no-NMDA para diferenciarlos de los NMDA, sin embargo poseen características farmacológicas distintas entre sí.

Los receptores AMPA son responsables de la neurotransmisión excitadora rápida que antecede la activación del receptor NMDA. La entrada de Na^+ a través de este receptor despolariza la neurona y permite la extrusión del ion Mg^{2+} que bloquea el poro del canal de los NMDAR.

Los receptores AMPA funcionan como tetrámeros formados por cuatro subunidades (GluR1-GluR4). La subunidad que determina la permeabilidad del receptor al calcio es la GluR2. A nivel molecular esto está determinado por la presencia de un residuo de arginina en el asa transmembranal del dominio M2 que forma el poro del canal. En las subunidades GluR1, 3 y 4 este sitio está ocupado por una glutamina. Los receptores que no contienen la subunidad GluR2 son permeables al Ca^{2+} , mientras que los que la contienen son impermeables a este catión. Las subunidades GluR2 y GluR4 tienen además variantes en el extremo C-terminal, que son diferentes en longitud y determinan la interacción con proteínas intracelulares.

Los receptores de tipo kainato están formados por 4 subunidades de una familia de cinco miembros GluR5-7 y KA-1 y KA2, formando heterómeros u homómeros combinando las diferentes subunidades. Los homodímeros que combinan las subunidades KA-1 y KA2 no forman receptores funcionales, pero unen con gran afinidad al kainato y sus agonistas. Las subunidades GluR5, 6 y 7 en cambio, forman receptores funcionales de composición homomérica ó heterodimérica. También pueden formarse receptores heterodiméricos combinando las subunidades GluR y KA. La mayoría de estos receptores son sensibles tanto a AMPA como a kaínico dependiendo de la combinación de subunidades.

Receptores Metabotrópicos

Los mGluRs son una familia de receptores acoplados a proteínas G que modulan la transmisión sináptica lenta a través de segundos mensajeros intracelulares. A la fecha se han identificado ocho miembros de esta familia: mGluR1-8, agrupados en tres grupos de acuerdo a la homología en su secuencia, segundo mensajero que producen y farmacología. Estos receptores son proteínas formadas por 1199 aminoácidos, con siete dominios transmembranales, los mGluRs funcionales consisten en homodímeros que se estabilizan por uniones disulfuro e interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas en sus largos extremos amino y carboxilo terminal.

El grupo I de receptores estimula a la fosfolipasa C (PLC) induciendo la formación de los segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína cinasa C la cual fosforila otras proteínas, y el inositol trifosfato (IP3) que libera calcio de pozas intracelulares. La activación de los grupos II y III resulta en la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), que inhibe la síntesis de cAMP. Los receptores metabotrópicos generalmente tienen un papel regulador de la excitabilidad neuronal.

El grupo I se localiza principalmente en la región postsináptica somato-dendrítica, mientras que los grupos II y III se expresan primordialmente en la región presináptica, en las terminales axonales donde regulan la liberación del neurotransmisor.

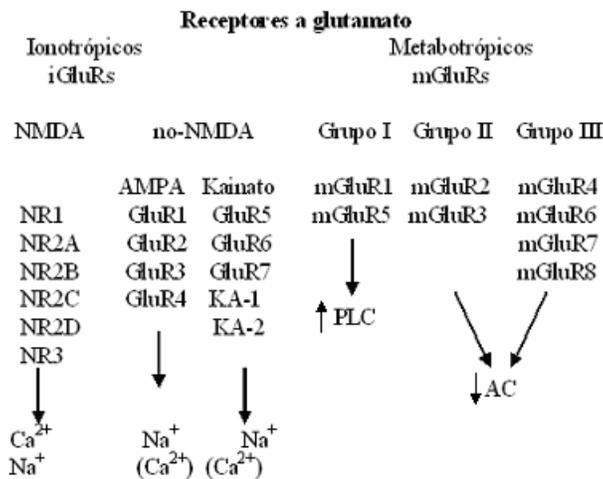


Figura 1. Esquema de los iGluRs y mGluRs en el que se muestran las diferentes subunidades que los conforman, la permeabilidad selectiva a diferentes iones en el caso de los iGluRs y las enzimas que activan (PLC) o inhiben (AC) en el caso de los metabotrópicos, que activan PLC e inhiben, AC.

Transporte de glutamato

Después de haber sido liberado y de activar a sus receptores, el glutamato es removido del espacio sináptico por medio de transportadores. Los transportadores de los aminoácidos excitadores remueven al glutamato liberado durante la transmisión sináptica para mantener los niveles de glutamato (1-3 μM) por debajo de concentraciones que puedan ser tóxicas, como se explicará más adelante.

Se han caracterizado a la fecha cinco subtipos de transportadores dependientes de sodio: EAAT1-5: GLAST-1 (EAAT1), GLT-1(EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 y EAAT5. Estos

transportadores tienen propiedades de tipo canal. El influjo de glutamato está acoplado con el cotransporte de dos o tres iones Na^+ , un protón y el cotransporte de un ion K^+ .

El transportador GLT-1 se localiza tanto en astrocitos como en neuronas y es el principal transportador del cerebro anterior. El transportador GLAST se localiza principalmente en la membrana plasmática de astrocitos asociados con contactos sinápticos excitadores. Está presente abundantemente en la glia de Bergman en el cerebelo. El transportador EAAC1 se expresa en todas las regiones del cerebro y se localiza en la región presináptica de las terminales nerviosas GABAérgicas, mientras que el transportador EAAT4 se expresa mayormente en las células de Purkinje en el cerebelo, y el transportador EAAT5 se expresa en la retina (2).

El funcionamiento de los transportadores depende del gradiente electroquímico del sodio generado por la ATPasa Na^+/K^+ . Éstos toman del espacio extracelular una molécula de glutamato junto con 2-3 iones Na^+ y un H^+ introduciéndolos al interior celular, mientras que extruyen un ión K^+ .

El glutamato capturado por las células gliales es convertido a glutamina mediante la enzima citosólica glutamina sintetasa. Posteriormente la glutamina se libera al espacio extracelular y de ahí es capturada por las neuronas, para ser convertida de nuevo en glutamato por medio de la enzima glutaminasa. Este proceso conocido como el ciclo de la glutamina-glutamato ayuda a reciclar el glutamato evitando su síntesis de novo e impide la disminución de α -cetoglutarato (Figura 2).

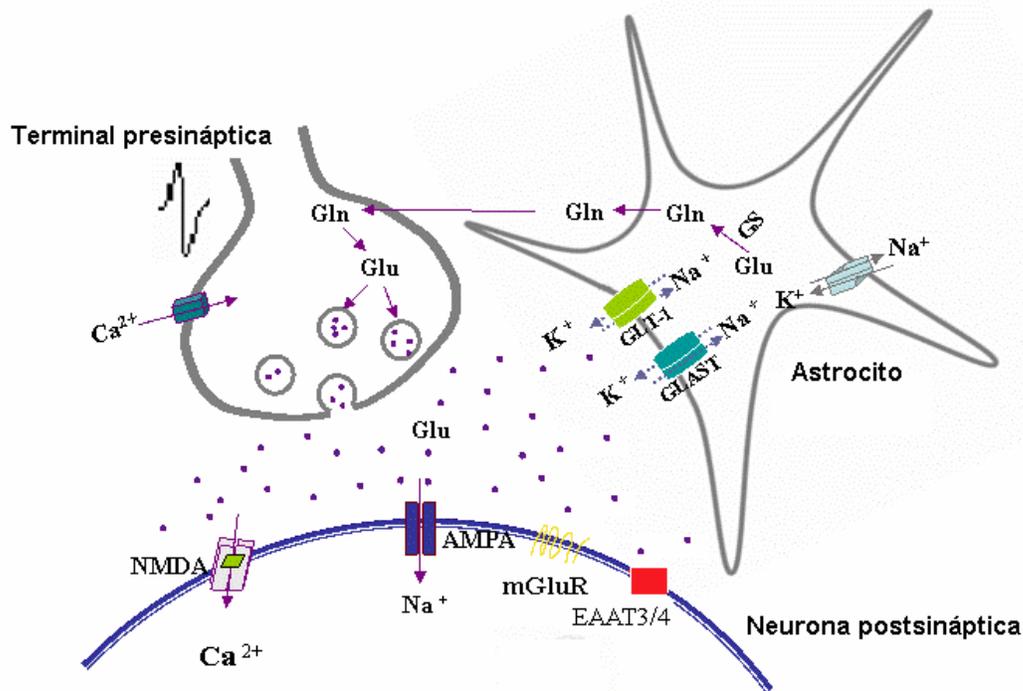


Figura 2. Esquema general de la transmisión glutamatergica. El glutamato sintetizado en la terminal presináptica y posteriormente almacenado en vesículas se libera gracias a la entrada de calcio a través de los CCSV activados por la despolarización de la membrana. Esto permite la fusión de las vesículas con la membrana presináptica y la liberación del transmisor. En el espacio sináptico, el glutamato activa a sus receptores iGluRs y mGluRs localizados en la membrana de la postsinápsis. Posteriormente es removido mediante transportadores específicos. Una parte del glutamato capturado por los astrocitos es convertido a glutamina, la cual se libera y posteriormente es captada por las neuronas que la convierten de nuevo a glutamato.

Excitotoxicidad

La excitotoxicidad hace referencia a la relación entre las propiedades excitadoras y tóxicas del glutamato y sus análogos. La neurotoxicidad del glutamato se conoce desde hace más de 40 años. En 1954 Hayashi describió que el glutamato inyectado directamente en el cerebro del perro era capaz de producir convulsiones (3). En 1957, Lucas y Newhouse encontraron que la inyección sistémica intraperitoneal de glutamato en ratas inmaduras producía degeneración en la retina (4). D.R. Curtis y colaboradores en 1959, mediante microelectroforesis, técnica que permite la aplicación tópica de fármacos y el monitoreo de la tasa de disparo de una neurona, demostraron los efectos postsinápticos excitadores del glutamato. Además encontraron que el glutamato y sus análogos cuando se superfundían en células de la médula espinal del gato

producían un aumento en su tasa de disparo (5). Años más tarde en 1969, J. W. Olney descubrió que el glutamato inyectado en ratones inmaduros producía daño en áreas del cerebro en donde la barrera hematoencefálica no estaba del todo desarrollada (6). De ahí surge el término excitotoxicidad, que hace referencia a la toxicidad del principal neurotransmisor excitador del SNC bajo ciertas circunstancias.

Este mecanismo de daño ha sido ampliamente estudiado durante los años subsecuentes ya que se ha encontrado una relación entre la muerte neuronal excitotóxica y la neurodegeneración en padecimientos de tipo agudo como el trauma, la isquemia y la hipoglucemia, y progresivos como algunas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, y la demencia asociada al SIDA.

En estudios pioneros Olney propuso que el mecanismo a través del cual el glutamato daña a las neuronas estaba relacionado con la excitación prolongada de la neurona agotando sus reservas energéticas. Sin embargo, los trabajos de Choi en 1987, mostraron que la entrada de calcio por los NMDAR es el factor determinante de la muerte excitotóxica (7-9). La concentración de calcio en el medio intracelular es mucho menor (del orden nanomolar) que en el extracelular (1-2mM) y está finamente regulada ya que cuando aumenta activa proteasas, endonucleasas y fosfolipasas entre otras enzimas produciendo daño a organelos y membranas lo que induce muerte neuronal. Además de la entrada de calcio por los NMDAR, el transporte de estos iones al citoplasma puede ocurrir a través de los CCSV. La concentración intracelular de calcio se mantiene baja gracias a la acción de diversos sistemas intracelulares, entre ellos el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cuya acción depende del gradiente de sodio, y que remueve iones calcio del interior celular actuando concertadamente con la ATPasa de Na^+/K^+ . Los iones calcio también son removidos del citoplasma por la acción de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática y almacenados en el retículo endoplásmico a través de la ATPasa de Ca^{2+} presente en este sistema. Estos también pueden ser liberados de este organelo a través de la estimulación de los receptores a IP3 después de la activación de la PLC por las proteínas G.

Cuando el estado energético neuronal es deficiente el glutamato causa daño a las neuronas aún concentraciones fisiológicas, debido a la despolarización de la membrana ocasionada por la falta de ATP. Esto conduce a la liberación del ión Mg^{2+} que normalmente está bloqueando el poro del canal del receptor NMDA de una manera dependiente del voltaje, y la activación de este receptor

y a la subsecuente entrada de calcio. Este fenómeno se conoce como excitotoxicidad secundaria (10).

El daño excitotóxico está correlacionado con el estrés oxidativo debido al incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Figura 3). La mitocondria participa en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Cuando ésta aumenta, es amortiguada por este organelo pero al sobrecargarse de Ca^{2+} cambia el potencial de membrana mitocondrial necesario para la síntesis de ATP y aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Por otro lado el calcio activa a la xantina deshidrogenasa que se convierte en xantina oxidasa, con la consecuente producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno; también activa a la fosfolipasa A2, lo que origina la producción de ácido araquidónico cuyo metabolismo genera radicales libres, y a la óxido nítrico sintasa que genera óxido nítrico. El óxido nítrico activa a la guanilil ciclasa soluble incrementando la concentración de GMP cíclico. Además se une a la citocromo c oxidasa reduciendo su afinidad por el O_2 lo cual afecta el flujo de electrones de la mitocondria y la síntesis de ATP.

Estrés oxidativo

Los organismos aerobios utilizan al oxígeno como aceptor final de electrones para generar el gradiente protón motriz necesario para la síntesis de ATP, pero este mecanismo por sí mismo produce moléculas altamente reactivas denominadas especies reactivas las cuales se generan también durante otras reacciones bioquímicas y funciones celulares, por lo que existen mecanismos para contrarestarlos y evitar el daño a biomoléculas, de tal forma que su formación se equilibra con su remoción. Cuando existe un desequilibrio entre la generación y eliminación de estas especies, ya sea porque aumenta su producción o porque los sistemas antioxidantes disminuyen, se produce un estado denominado **estrés oxidativo** en el que las especies reactivas producen daño a lípidos, proteínas y al DNA.

El cerebro es un órgano particularmente susceptible al daño oxidativo debido en parte a la alta tasa de consumo de oxígeno necesario para mantener los altos requerimientos de ATP.

Otras de las causas de susceptibilidad del cerebro al daño oxidativo son:

- a) Las membranas neuronales tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que son más susceptibles de ser oxidados por sus dobles enlaces. La oxidación lipídica o lipoperoxidación membranar genera metabolitos como el 4-hidroxinonanal, un aldehído que

es citotóxico porque puede unirse a proteínas y afectar su función como es el caso de los transportadores de glutamato, proteínas del citoesqueleto y enzimas como la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

- b) Las defensas antioxidantes son menos abundantes en comparación con otros tejidos.
- c) La presencia de hierro, que además de formar parte importante en las regiones catalíticas de enzimas como los citocromos, aconitasas y ferritinas entre otras, en condiciones de daño se libera junto con el cobre y genera radicales libres a través de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss.
- d) La susceptibilidad al daño oxidativo se incrementa con la edad debido a la acumulación de radicales como parte del metabolismo basal, y a que la efectividad de los mecanismos que se encargan de reparar el daño disminuye.
- e) La auto oxidación de varios neurotransmisores o sus precursores. La dopamina, la L-DOPA, la serotonina y la norepinefrina reaccionan con el O_2 para formar anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ (11).

Las especies reactivas reaccionan con los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos alterando su estado de oxidación, de tal forma que modifican sus funciones fisiológicas. Por ejemplo su interacción con proteínas genera modificaciones en su sitio catalítico inhibiendo sus funciones. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados resulta en la pérdida de la integridad de la membrana, lo que ocasiona un daño severo para las células por la pérdida en la regulación iónica.

Especies reactivas de oxígeno y radicales libres

El oxígeno es un elemento químico con una configuración $1s^2 2s^2 2p^4$ que a temperatura y presión constantes se encuentra como una molécula diatómica de fórmula O_2 .

Los electrones se encuentran distribuidos en orbitales en los átomos, cada uno de los cuales puede ocupar un máximo de dos electrones con spins opuestos. Un radical libre se define como cualquier especie que contiene uno o más electrones desapareados, por lo cual son altamente reactivos ya sea removiendo un electrón de otro compuesto, oxidándolo, o donando uno de sus electrones dando lugar a que el compuesto aceptor se vuelva más reactivo. Los radicales libres generalmente son moléculas de vida corta debido a su alta reactividad, de modo que la medición directa de estas moléculas es complicada, así que las técnicas empleadas para su investigación en los sistemas biológicos se basan en la identificación de indicadores de la presencia de estos

radicales como son bases, proteínas y lípidos oxidados, y compuestos capaces de emitir fluorescencia al ser oxidados por diversas especies reactivas.

Especies reactivas de oxígeno (ERO) es el nombre con el que se designa a los radicales de oxígeno y otras moléculas que no son radicales pero que son agentes oxidantes y/o fáciles de ser convertidos en radicales. También existen especies reactivas del nitrógeno (ERN) radicales y no radicales.

Las especies reactivas más importantes en el contexto celular son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno.

Anión superóxido

El anión superóxido es una molécula diatómica de oxígeno con un electrón desapareado de fórmula $O_2^{\bullet -}$. Este radical se forma en condiciones fisiológicas por varios procesos. Uno de ellos es en la cadena transportadora de electrones. Cuando los electrones pasan a través de los complejos llegan a fugarse y se unen al O_2 , formando superóxido debido a que el oxígeno acepta un electrón a la vez. El superóxido se ha descrito como un radical débil de tal forma que su importancia radica en que reacciona con otros radicales para formar especies más reactivas.

Otra fuente de $O_2^{\bullet -}$ es la autooxidación. Algunas moléculas no radicales como la epinefrina, la dopamina, la 6-hidroxidopamina y moléculas que contienen grupos tiol como la cisteína reaccionan lentamente con el O_2 para formar $O_2^{\bullet -}$.

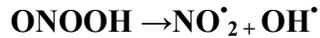
El $O_2^{\bullet -}$ también se forma durante el metabolismo de la xantina a ácido úrico catalizado por la enzima xantina oxidasa, activada por la entrada de calcio subsecuente a la activación de los NMDAR.

El $O_2^{\bullet -}$ es una base débil que acepta un protón formando un radical más reactivo: el radical hidroxilo.

Radical hidroxilo

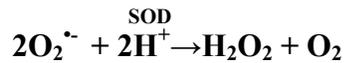
El radical hidroxilo OH^{\bullet} es uno de los radicales del oxígeno más agresivos que reacciona casi con cualquier biomolécula. Usualmente se produce mediante tres mecanismos:

- La fisión homolítica del agua por la radiación ionizante
- La ruptura del H_2O_2 en presencia de metales por la reacción de Fenton
- Mediante la fisión homolítica del ácido peroxinitroso, un ERN no radical pero muy reactivo:



Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es una ERO no radical de fórmula H_2O_2 presente en numerosos sistemas biológicos que se produce mediante diferentes reacciones enzimáticas como la catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), oxidasas de D-aminoácidos, amino oxidasas, glicolato oxidasas, y en las reacciones redox cíclicas de ciertos compuestos como las catecolaminas.



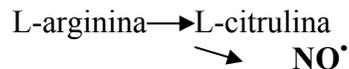
El H_2O_2 puede reaccionar con el Fe^{2+} y formar el radical hidróxilo mediante la reacción de Fenton:



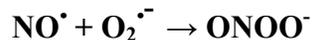
Oxido nítrico

El óxido nítrico es un radical sin carga, hidrofóbico por lo que atraviesa fácilmente las membranas celulares. Además de ser un radical del nitrógeno posee otras funciones biológicas importantes como segundo mensajero, vasodilatador y neurotransmisor.

Se forma a partir de L-arginina a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).



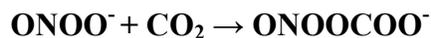
El óxido nítrico reacciona con el radical superóxido para formar peroxinitrito:



Se produce después de la estimulación de los NMDAR de una forma dependiente de calcio en presencia de calmodulina que activan a la enzima óxido nítrico sintasa.

Peroxinitrito

El peroxinitrito se forma rápidamente a través de la interacción entre el $\text{O}_2^{\bullet -}$ y NO^\bullet . El ONOO^- es un nitrato y un poderoso agente oxidante. Ocasiona la nitración de la guanina y la formación de carbonilos y otros productos oxidados en las proteínas como la nitrotirosina.

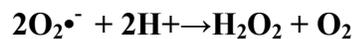


Sistemas de defensa antioxidante

Debido a que las especies reactivas se forman como parte de procesos bioquímicos normales, existen sistemas que se encargan de detoxificar a las células de estas moléculas a través de enzimas o compuestos que por sus características químicas actúan como antioxidantes.

Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima SOD es considerada como un mecanismo de defensa antioxidante debido a que dismuta al superóxido agregándole dos protones en la reacción:



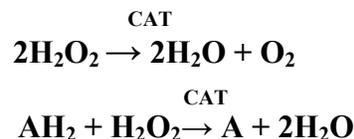
Existen dos isoformas de la enzima, Mn-SOD o SOD2 que se encuentra principalmente en la mitocondria y requiere manganeso en su sitio activo, y la Cu-Zn-SOD o SOD1 citoplasmática y que requiere cobre y zinc en su sitio catalítico.

Esta enzima se expresa en el SN y debido a que en la reacción que cataliza se genera otra especie reactiva no radical, el peróxido de hidrógeno, debe actuar en conjunto con enzimas que catalicen la transformación del H_2O_2 a moléculas menos reactivas, como la catalasa y la glutatión peroxidasa.

En algunas enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica y la ataxia de Frederich se han descrito alteraciones en la SOD involucradas en el mecanismo de daño en estos padecimientos (12, 13).

Catalasa

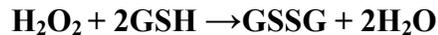
La catalasa (CAT) es una enzima presente en los peroxisomas de las células de mamíferos que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno H_2O_2 a agua y oxígeno en función de la concentración de H_2O_2 . Si ésta es alta lleva a cabo la reacción anterior pero si es baja en presencia de un donador apropiado de hidrógeno como metanol, etanol, fenol u otros la catalasa remueve el H_2O_2 oxidando su sustrato.



Esta enzima actúa junto con la SOD, dado que es una peroxidasa pero su contenido en el cerebro es muy bajo comparado con otros tejidos

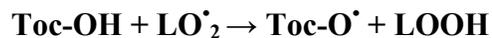
Glutación Peroxidasa GPx

La enzima GPx es el principal mecanismo de detoxificación de peróxidos en el cerebro (14). Se localiza en el citoplasma celular y la matriz mitocondrial. Esta enzima contiene selenio en su sitio catalítico. Descompone el peróxido mediante la siguiente reacción, en la que el glutatión es oxidado:



α -tocoferol

Vitamina E es el nombre con el que se designa a cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles, moléculas liposolubles que forman parte integral de la membrana y evitan la lipoperoxidación eliminando los radicales peróxido usando un grupo OH. Convierten los radicales alquilperoxil en hidroxiperóxidos y simultáneamente éstos en radicales tocoferoxil:



El radical tocoferoxil es poco reactivo y es reducido en parte por el ascorbato convirtiéndolo a tocoferol:



En el cerebro el α -tocoferol parece ser el tocoferol más importante o tal vez el único, su deficiencia afecta más al SNC que al periférico por lo que sus niveles en el cerebro parecen estar altamente regulados.

Glutación (GSH)

El glutatión es el tripéptido γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina que además de sus funciones como antioxidante por contener un grupo tiol, está involucrado en otros procesos celulares como cofactor en reacciones de isomerización, almacenamiento y transporte de cisteína, detoxificación de xenobióticos y mantenimiento del potencial redox tiol en las células conservando a los grupos sulfidrilos en su forma reducida. Se encuentra a una concentración de 1 a 3 mM en el cerebro. Reacciona directamente con los radicales como el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico.

El glutatión oxidado que resulta de la reacción catalizada por la GPx consta de dos moléculas de GSH unidos por un enlace disulfuro y puede ser convertido de nuevo a su forma reducida por las

enzimas glutatión reductasas, que contiene FAD (flavín adenín dinucleótido) y que además requieren de NADPH, mediante la reacción:

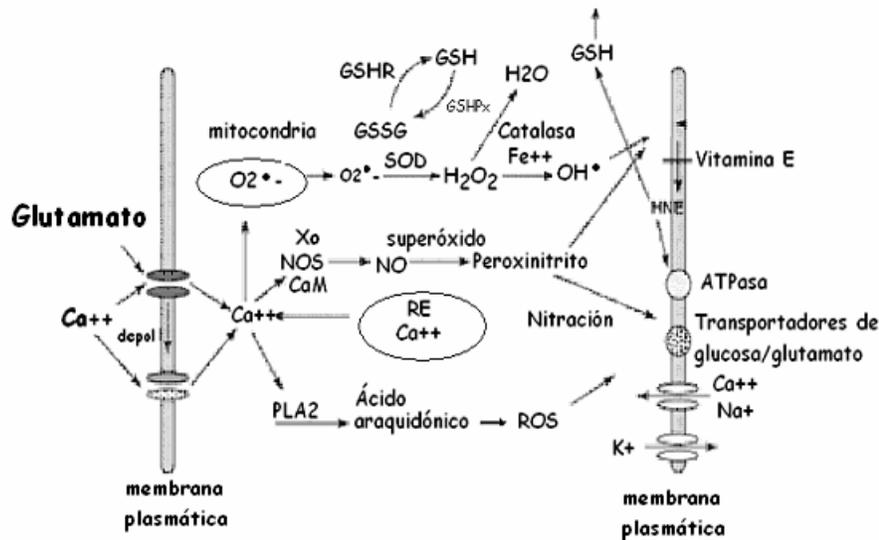


Figura 3. Estrés oxidativo y excitotoxicidad. La entrada de calcio por los receptores a NMDA induce la activación de enzimas productoras de radicales libres como la fosfolipasa A2 (PLA2), xantina oxidasa (Xa) y la óxido nítrico sintasa, (NOS); la sobrecarga de calcio mitocondrial aumenta la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y este a su vez puede dar lugar a la producción de H_2O_2 y de OH^{\bullet} . Las especies reactivas pueden atacar lípidos y diversas proteínas afectando su función.

Metabolismo de la glucosa en el SNC

Con sólo aproximadamente el 2% del peso total del cuerpo humano, el cerebro es un órgano que utiliza alrededor del 20% de la energía total del mismo en estado de reposo, para mantener sus funciones normales. Esto significa que el cerebro es un órgano muy costoso por lo que el entendimiento del metabolismo energético de las células cerebrales es esencial para conocer su funcionamiento tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

El gasto energético del cerebro es similar al de aquellos tejidos que realizan un trabajo mecánico como el corazón o los músculos. Esto se debe a que necesita una gran cantidad de energía tan sólo para mantener el potencial de membrana. Aproximadamente el 75% de la energía se utiliza en funciones relacionadas con la señalización, y el 25% restante para funciones esenciales como

la síntesis y degradación de proteínas, de nucleótidos, de fosfolípidos, transporte axoplásmico así como para evitar o reparar la fuga de protones en la mitocondria.

Además, la eficiencia del cerebro para almacenar nutrientes es muy baja. Por ello es necesario un suministro constante de que ciertos sustratos como la glucosa al cerebro por mecanismos específicos a través de la barrera hematoencefálica.

La glucosa es el sustrato primario del metabolismo energético neuronal. En algunas condiciones las neuronas son capaces de utilizar ácidos monocarboxílicos incluyendo el lactato y los cuerpos cetónicos como el acetoacetato y β -hidroxi-butilato como sustratos energéticos, sin embargo su concentración sanguínea es muy inferior a la de la glucosa.

La fuente de glucosa de los seres humanos no sólo es la que se obtiene mediante la ingesta sino que puede ser producida de manera endógena a partir de tres fuentes: grasas, y proteínas vía gluconeogénesis; y del hígado y el músculo por medio de la glucogenólisis.

Los niveles de glucosa en la sangre están controlados por el SNC a través del hipotálamo que se encarga de censar la cantidad de nutrientes disponibles al recibir e integrar señales que llegan a él de los nutrientes circulantes y hormonas como la insulina y leptina. En respuesta a estos estímulos, el hipotálamo envía señales para normalizar los niveles de glucosa mediante el consumo de alimentos o la producción endógena de la misma.

Transporte de glucosa

El transporte de glucosa del torrente sanguíneo hacia el cerebro se lleva a cabo por proteínas denominadas transportadoras que pueden ser dependientes o independientes de insulina y que también transportan la glucosa del medio extracelular al interior de las células.

Hasta la fecha se han identificado doce tipos de transportadores de glucosa denominados GLUT1-GLUT12, cada uno de los cuales está conformado por doce segmentos transmembranales con sus respectivos extremos C-y N-terminal situados en la parte citosólica de las células y con una cadena de oligosacáridos unida al extremo N-terminal ya sea en la primera o cuarta asa extracelular. De éstos, cuatro se encuentran en el cerebro, GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT5 (15).

El transportador GLUT1 es un transportador independiente de insulina, que se expresa en astrocitos y células endoteliales. El GLUT3 parece expresarse sólo en neuronas, en el

plasmalema y aunque en menor cantidad en las vesículas intracelulares no sinápticas. Al parecer se encuentra predominantemente en estructuras de la materia gris y en la neurohipófisis, también es un transportador independiente de insulina. Además, tiene una gran capacidad para transportar la glucosa. El GLUT4 se encuentra en neuronas y el GLUT5 está presente básicamente en microglia.

Las diferentes isoformas de estos transportadores están distribuidas de una manera diferencial en los distintos tipos celulares en el cerebro, probablemente reflejando diferencias en los requerimientos energéticos de las mismas.

La expresión de los dos principales transportados del cerebro el GLUT1 y GLUT3 está regulada de acuerdo a la demanda metabólica y a la tasa de utilización de energía en las diferentes regiones.

También se ha observado que su expresión varía durante el desarrollo. Los niveles de expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3 aumentan abruptamente con la maduración del cerebro durante la sinaptogénesis.

También existen transportadores de ácidos monocarboxílicos conocidos como MCT de los cuales existen 8 subtipos(MCT1-MCT8). En el cerebro se han identificado básicamente el MCT1 y MCT2.

Síntesis de ATP

La oxidación de la glucosa se lleva a cabo en el citoplasma celular a través de una serie de reacciones denominadas glucólisis. La oxidación de una molécula de glucosa por esta vía genera dos moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato (Figura 4).

El piruvato es transportado a la mitocondria para ser oxidado a acetilcoenzima A, molécula que es metabolizada a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a dióxido de carbono y 16 átomos de hidrógeno por cada molécula de piruvato dentro de la matriz mitocondrial. Estos son transportados a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial generando el gradiente protón motriz para la formación de ATP a partir de ADP utilizando al oxígeno como aceptor final de electrones (Figura 5).

En total, una molécula de glucosa metabolizada a través de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa produce 38 moléculas de ATP.

Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es convertido a lactato, lo que además permite la regeneración del NAD^+ , nicotinamida adenín dinucleótido esencial para mantener un flujo glucolítico continuo.

Otra vía importante en el metabolismo de la glucosa es la vía de las pentosas fosfato la cual produce 2 moléculas de NADPH a través de la deshidrogenación de cada molécula de glucosa-6-fosfato a ribulosa-5-fosfato, reacción limitante en esta ruta metabólica debido a que el cociente NADP/NADPH es el factor que determina la entrada de la glucosa-6-fosfato a esta vía. De esta forma, si un alto poder reductor es requerido, cuando los niveles de NADPH se reducen, se activa el ciclo para generar nuevos equivalentes reductores.

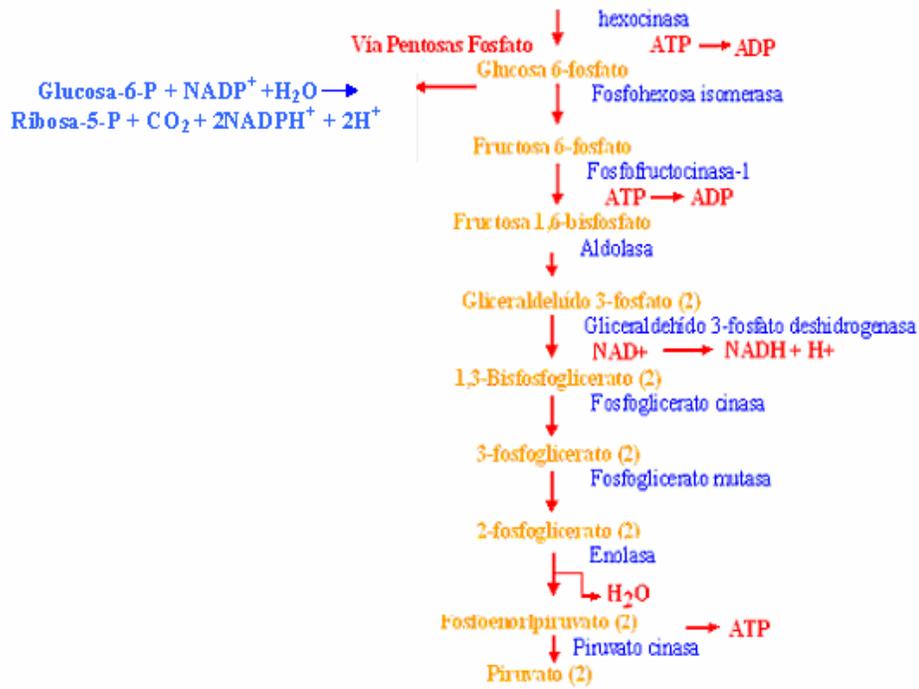
De esta forma la glucosa, principal substrato energético del cerebro, produce dos fuentes de energía: ATP y equivalentes reductores (NADH).

La reacción global de la glucólisis es la siguiente:



Figura 4. Síntesis de ATP a través de la oxidación de la glucosa. A partir de una molécula de glucosa se obtienen 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de piruvato por medio de una serie de 10 reacciones mostradas en esta figura.

Glucosa



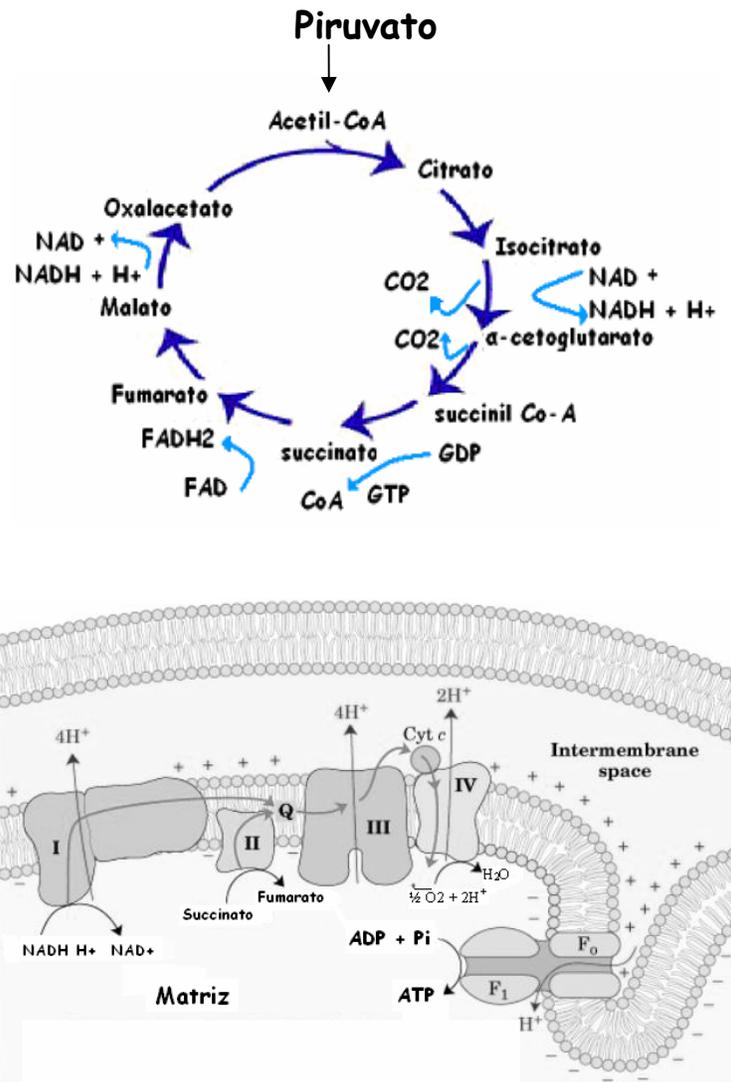


Figura 5. El piruvato que se obtiene luego de la oxidación de la glucosa es convertido a Acetil-CoA, el cual entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (A), en el que se liberan electrones 4 electrones acarreados en el NADH y el FADH₂ que en la fosforilación oxidativa reducen el O₂ a agua. Durante este proceso se produce ATP (B).

Hipoglucemia

En los años 30's la hipoglucemia fue introducida como tratamiento de desórdenes psiquiátricos por Manfred Sakel, en tanto que la insulina se utilizaba para el tratamiento de la esquizofrenia y la adicción a las drogas. Para entonces se sabía que un periodo de coma hipoglucémico con una duración de 30 minutos resultaba en un estado de coma reversible, mientras que un periodo

mayor implicaba un coma irreversible. Los avances en el conocimiento de este fenómeno indican que esto se debe a la escasa necrosis neuronal que ocurre durante un periodo de 30 minutos comparado con la amplificación del daño hacia áreas corticales después de un periodo de 60 minutos. En la actualidad han quedado en desuso los tratamientos hipoglucemiantes para tratar desórdenes psiquiátricos o de adicción a drogas (16-18).

Características de la hipoglucemia

La hipoglucemia está clasificada dentro de las encefalopatías metabólicas. Es un desorden fisiológico que se define como la disminución en los niveles de glucosa sanguínea (del griego *hypo-*, *glykys*, *haima*). En general las causas más comunes son los tratamientos que incluyen insulina o sulfonilureas, trastornos endocrinos, desórdenes hepáticos, fallas renales, desnutrición, trasplante de islotes de páncreas o insulinomas. En los neonatos esta condición es más común originando desordenes neurológicos o incluso la muerte, además también es frecuente en la niñez debido a desórdenes endocrinos, como la producción inadecuada de glucosa, o el incremento en su utilización.

En condiciones fisiológicas, la concentración de la glucosa en el torrente sanguíneo es de 80-90 mg/dl, aumenta hasta 200 mg/dl después de la ingesta de alimentos y disminuye a 40-60 mg/dl durante un ayuno prolongado. Si los niveles de glucosa se mantienen en 40 mg/dl o por debajo de este valor se considera un estado de hipoglucemia.

La hipoglucemia causa daño cerebral aún cuando la función cardiaca permanece intacta, sin embargo la necrosis neuronal se presenta cuando el electroencefalograma (EEG) se vuelve isoelectrico, es decir, cuando se abate la actividad cerebral, a concentraciones de glucosa menores a 1 mM (18 mg/dl), causando un estado de coma (Figura 6).

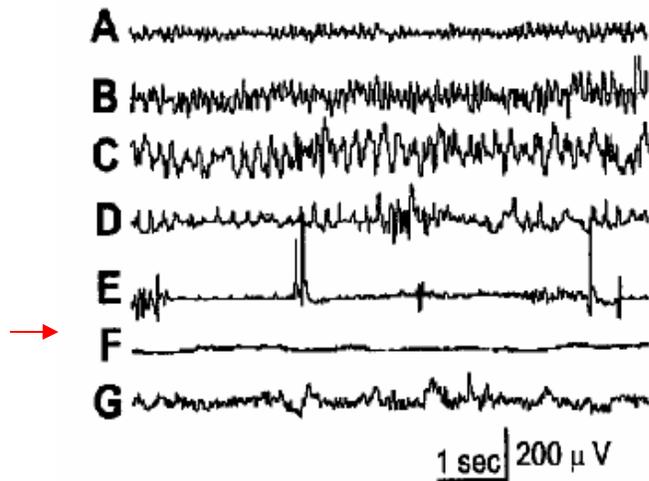


Figura 6. Cambios en el electroencefalograma durante la hipoglucemia. **A**, patrón normal del EEG; **B** muestra el EEG al inicio de la hipoglucemia: las ondas se hacen más lentas y de mayor amplitud; **C**, éstas se hacen más evidentes; **D**, se observa actividad paroxísmica; **E**, se suprime la actividad eléctrica; **F**, el EEG se torna isoelectrico; **G**, se observa la recuperación de la actividad cerebral 30 minutos después de la administración de glucosa, el EEG comienza a normalizarse (19).

Mecanismos involucrados en el daño hipoglucémico

La tasa metabólica cerebral de la glucosa decrece como consecuencia de la disminución del flujo glucolítico debido a la hipoglucemia. Como consecuencia del fallo energético ocasionado por la disminución en los niveles de glucosa hay un decremento en la fosforilación oxidativa, disminuyéndose aún más los niveles de ATP, y aumentando los niveles de fosfato inorgánico y ADP. Sin embargo, es hasta que se presenta el periodo isoelectrico cuando los niveles de ATP decrecen hasta un 40 % y siguen disminuyendo mientras avanza el estado de coma, lo que sugiere que también se agotan otros sustratos metabólicos, originando un déficit energético severo (20). Dicho déficit da lugar a cambios en las concentraciones iónicas; durante los primeros minutos del periodo isoelectrico hay un aumento en la concentración de K^+ extracelular y un aumento en el Ca^{2+} intracelular, que después de unos minutos se normaliza parcialmente, para después volver a aumentar ó disminuir, respectivamente. Esto se debe a la falla en el funcionamiento de la ATPasa Na^+/K^+ dando lugar a la despolarización de la membrana, y a la liberación de glutamato y principalmente de aspartato. Debido a la disminución de los niveles de piruvato y AcCoA, el oxaloacetato se acumula, y el equilibrio de la reacción de la aspartato

aminotransferasa se desplaza hacia el aspartato. El glutamato es utilizado como sustrato en el ciclo de Krebs a través de su transformación a alfa-cetoglutarato. Por esta razón hay más aspartato que glutamato disponible para ser liberado. Por otra parte la despolarización hipoglucémica favorece la extrusión del ion Mg^{2+} del NMDAR induciendo su activación. Además, el aumento en los niveles de aminoácidos excitadores en el espacio extracelular se mantiene por el fallo en sus sistemas de recaptura ya que son dependientes de energía. Lo anterior resulta en una mayor estimulación de los NMDAR favoreciendo el daño excitotóxico, descrito anteriormente.

La vulnerabilidad al daño hipoglucémico varía en las diferentes regiones del cerebro siendo ciertas poblaciones de neuronas más vulnerables que otras: las neuronas de la región CA1, del subiculum y del giro dentado del hipocampo; las neuronas en la capa externa de la corteza y el estriado (21). Todas estas neuronas reciben una gran cantidad de inervaciones glutamatérgicas, lo que ha sugerido que el daño hipoglucémico es de tipo excitotóxico. Además, la muerte neuronal en el estriado debido a la hipoglucemia se previene cuando se eliminan las vías cortico-estriatales que son glutamatérgicas (22).

Otra evidencia que apoya que la excitotoxicidad es el mecanismo de muerte en la hipoglucemia, es que la administración de antagonistas de los NMDAR previene la muerte neuronal (23, 24) aún cuando son administrados después del periodo hipoglucémico (25).

La alteración en la homeostasis iónica del calcio origina un cambio en el potencial de membrana mitocondrial y la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Se ha sugerido que la apertura del MPT está asociada al daño hipoglucémico ya que el tratamiento con un inhibidor de este poro disminuye el daño (26). Además, la mitocondria es muy importante en la activación de vías de señalización que conllevan a la muerte apoptótica liberándose factores proapoptóticos como el citocromo c y el factor inductor de la apoptosis (27).

El papel del estrés oxidativo en la muerte neuronal hipoglucémica

Algunos trabajos han sugerido que el estrés oxidativo puede ser un factor asociado al daño hipoglucémico, sin embargo aún no se han identificado las principales fuentes de producción de radicales libres, ni su relación con la muerte de las neuronas.

Algunos estudios al respecto se han basado en la identificación de indicadores de la presencia de radicales o de ERO como son los lípidos oxidados. En modelos animales de hipoglucemia

inducida por insulina se ha observado un aumento en los niveles de lipoperoxidación de la membrana plasmática (28, 30, 39) y mitocondrial (29), la primera aún antes de que se presente el periodo isoeléctrico.

Por otra parte, la propiedad de algunas moléculas de emitir fluorescencia cuando son oxidadas por ciertas ERO se ha utilizado como indicador de la producción de éstas. Estos marcadores han permitido identificar la producción de ERO en diversos modelos de falla metabólica glucolítica como son: cultivos de retina y de hipocampo incubados con el inhibidor glicolítico, yodoacetato; células PC12 sometidas a la ausencia de glucosa y mitocondrias aisladas de cerebro de cerdos recién nacidos sometidos a hipoglucemia inducida por insulina (31-33, 42).

Otra aproximación experimental es la utilización de moléculas que actúan como antioxidantes como el trolox y el U83836E (derivados de la vitamina E), la vitamina E y el PBN, entre otros. La vitamina E por ejemplo, previene del daño ocasionado por yodoacetato en células de retina, y en cultivos primarios de hipocampo (31,34,42) en tanto que el trolox en cultivos de neuronas corticales protege contra daño ocasionado por la privación de glucosa, aunque sólo cuando se co-incuba con dextrofan, un antagonista de los NMDAR (35). La protección depende de la dosis a la que son administrados y no es completa. En un modelo de neuronas cultivadas de estriado el PBN y el U83836 previenen del daño inducido por la ausencia de glucosa, aunque no completamente (36).

La inhibición de enzimas que generan radicales también se ha utilizado para explorar la participación de éstas en el daño ocasionado por la ausencia de glucosa. En cultivos de astrocitos, la inhibición de la xantina oxidasa y de la óxido nítrico sintasa no previene el daño producido por la privación de glucosa (30), mientras que estudios en neuronas corticales cultivadas y en el modelo animal de hipoglucemia inducida por insulina, sugieren que la actividad de la NADPH oxidasa participa en el daño hipoglucémico al activarse después de la re-introducción de glucosa (38).

Por último, el análisis de la regulación de los sistemas de defensa antioxidante, el cual refleja la respuesta celular ante el estrés oxidativo, también se ha utilizado como índice éste. A este respecto, en ratas con hipoglucemia inducida por insulina se ha observado disminución de la actividad de la catalasa y la Mn-SOD mitocondriales, así como un aumento la actividad de la GPx, y una disminución en los niveles de glutatión reducido mitocondriales (39-40). La disminución en los niveles de glutatión reducido también se ha reportado en cultivos de

astrocitos incubados en medio sin glucosa (30), mientras que el aumento en los niveles de glutatión oxidado se ha observado tanto *in vivo* en el hipocampo de ratas hipoglucémicas como *in vitro* en neuronas de hipocampo en condiciones de ausencia de glucosa (41). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes.

Experimentos previos de nuestro laboratorio en un modelo *in vitro* de inhibición glucolítica inducida por yodoacetato, un inhibidor irreversible de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, sugieren que la producción de ERO está involucrada en la muerte neuronal; y que ésta es dependiente de un mecanismo excitotóxico cuando la falla energética es moderada, mientras que cuando la inhibición glucolítica es severa la muerte ocurre por un mecanismo independiente de la excitotoxicidad (42). Además, este estudio sugiere que la falla en la regulación del calcio intracelular es un factor importante en la producción de ERO y en la inducción de muerte neuronal. Lo anterior sugiere que tanto la excitotoxicidad como el estrés oxidativo participan en la muerte neuronal hipoglucémica, sin embargo aún no se conoce en detalle la relación que existe entre ambos mecanismos.

En el presente estudio utilizando un modelo *in vitro* de privación de glucosa, el cual mimetiza una condición hipoglucémica, se investigó si la producción de ERO participa en la muerte neuronal, y si ésta depende de un proceso excitotóxico. También se utilizó el fluoruro de sodio (NaF), inhibidor de la enzima glucolítica enolasa, para conocer si en esta condición se produce muerte por excitotoxicidad, y así reforzar la hipótesis de la participación de la excitotoxicidad en el daño producido por deficiencia energética, particularmente la inducida por la inhibición de la glucólisis.

Hipótesis

La ausencia de glucosa favorecerá el daño neuronal mediante la producción de especies reactivas de oxígeno. Este proceso estará relacionado con un mecanismo excitotóxico.

Objetivos

- Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno durante y después de la exposición a un medio sin glucosa en neuronas cultivadas del hipocampo.
- Determinar la participación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa.
- Evaluar la participación de la excitotoxicidad en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa.

Metodología

Cultivos celulares

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación de acuerdo a Brewer et al (43) con ciertas modificaciones (44). Después de la disección del hipocampo de 10-12 embriones el tejido se colocó en la base de un rebanador de tejido para cortarse en cuadros de 300 μm y posteriormente se disoció con una solución de medio Krebs con tripsina al 0.25%. Se incubó a 37° C durante 4 minutos y la reacción se detuvo utilizando una solución que contiene inhibidor de tripsina y DNAsa (0.08% y 0.52% respectivamente). Las células se suspendieron en medio neurobasal (NB) suplementado con B27, 0.5 mM de glutamina y 20 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina, se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 células/ml ($260\text{-}290 \times 10^3/\text{cm}^2$), en multicajas de 24 pozos precubiertas con una capa de poli-L-lisina (5 $\mu\text{g/ml}$) y en multicajas de 12 pozos sobre cubreobjetos cubiertos de igual forma con poli-L-lisina.

Las células se colocan en una incubadora a 37°C y 5% CO₂, /95% aire atmosférico. A los 4 días in vitro se agregaron glucosa (5 mM) y citosina arabinosa (10 μM) para mantener la concentración de glucosa y evitar la proliferación de células gliales respectivamente.

Tratamientos

A los 8 DIV las células se expusieron al fluoruro de sodio (NaF) durante 30 minutos a diferentes concentraciones 5 mM, 10 mM y 20 mM en medio Ringer-Krebs (en mM):154 NaCl, 5.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 5 HEPES, 3.6 NaHCO₃, 5.6 glucosa, y en presencia o ausencia de CaCl₂ 2.3 mM. También se expusieron a NaF en presencia del antagonista de los NMDAR, maleato de dizocilpina (MK-801) 10 μM , y del antagonista de los receptores no-NMDA 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil benzo[f]quinoxalina(NBQX) 50 μM . El NaF formó precipitados en el medio Ringer-Krebs de una manera dependiente de la dosis, por lo que se agregó al medio de cultivo donde fueron sembradas las células, y se prolongó el tiempo de exposición a 2 horas.

Con el fin de mimetizar mejor una condición hipoglucémica, en otra serie de experimentos cultivos de 8 DIV fueron expuestos a medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sin glucosa durante diferentes tiempos, y la viabilidad fue medida a las 24 hrs. En estas condiciones no se observaron cambios en la viabilidad celular, así que se probó utilizar las células a los 11 DIV. Para evaluar el efecto protector de los antagonistas de los receptores a glutamato, las

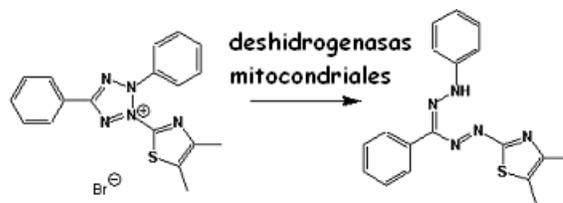
células se incubaron con MK-801(10 μ M) y NBQX (50 μ M) durante diferentes tiempos de exposición al medio sin glucosa. Después del tiempo de exposición a medio DMEM sin glucosa, éste fue sustituido por el medio NB con glucosa que había sido previamente retirado.

La participación de diferentes mecanismos generadores de radicales libres o ERO se evaluó utilizando inhibidores de cada uno de éstos a diferentes concentraciones: la apocinina, inhibidor de la NADPH oxidasa que genera O₂^{•-}, se probó a 0.5 mM y 1 mM y el alopurinol que inhibe a la enzima xantina oxidasa que genera O₂^{•-} y H₂O₂, se probó a 100 y 200 μ M. Estos fueron incubados durante y después de la exposición al medio sin glucosa.

También se utilizaron compuestos antioxidantes en las siguientes concentraciones: 1.2 mM y 600 μ M de vitamina E, 10 μ M de ebselen, que es un compuesto que mimetiza la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, y 100 μ M de ácido nordihidroguaiarético (NDGA), que es un atrapador de varias ERO como OH[•], O₂^{•-} y H₂O₂.

Viabilidad celular

Después de diferentes periodos de exposición a medio DMEM sin glucosa, o de 2 h de incubación con NaF, la viabilidad celular se midió por el método de la reducción del compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT). Este ensayo mide la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales que catalizan el corte del anillo de tetrazolium del MTT generando la transformación de la sal de MTT a la sal insoluble de formazan, cambiando la coloración del compuesto de amarillo a azul violeta. Los cristales se disuelven en isopropanol y se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados se expresan como el porcentaje de reducción de MTT con respecto al control.



Reducción del anillo de tetrazolio del MTT catalizado por deshidrogenasas mitocondriales.

Curso temporal de muerte

Se realizó un curso temporal de la muerte neuronal después de la exposición al medio sin glucosa para determinar el tiempo al cual las células mueren, y así establecer los intervalos de tiempo óptimos para medir la presencia de ERO.

Las células se expusieron durante 1 y 4 horas a medio sin glucosa y se midió la viabilidad a diferentes tiempos: 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas por la reacción del MTT.

Cuantificación de aminoácidos excitadores por HPLC

La liberación de aminoácidos excitadores se midió por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo a Antoine et al. (45). Para la determinación de la liberación de los aminoácidos aspartato y glutamato al medio extracelular, se tomaron las muestras de medio después de 1 y 4 horas de exposición al medio sin glucosa. Las alícuotas de medio DMEM se desproteinizaron con ácido perclórico al 7%, se neutralizaron con KOH 1 N y se filtraron. Las muestras fueron derivatizadas con el mismo volumen de o-ftaldialdehído y después de 3 minutos un volumen de 10 μ l se inyectó en el sistema HPLC (Waters 600) equipado con una columna ODS (25 cm x 4 mm de diámetro interno).

La fase móvil consistió de una mezcla 18% metanol, 22% acetonitrilo, 46% buffer de fosfatos (60 mM, pH 6.62)/buffer de fosfatos (60 mM, pH 6.62) con un flujo de 1ml/min en un gradiente lineal con una duración de 33 minutos con 10% y 90% de los solventes. La concentración de aminoácidos se calculó comparando los datos obtenidos con los de los estándares conteniendo concentraciones conocidas de los aminoácidos procesados de igual forma. Los datos se expresan en μ M.

Cuantificación de los niveles de ATP

Los niveles de ATP fueron determinados después de 15 y 30 min y de 1, 2 y 4 horas de exposición a medio sin glucosa; y después de un período de 1 h de exposición a medio sin glucosa seguido de 3 h de recuperación en medio con glucosa, por medio del ensayo bioluminiscente de luciferin-luciferasa. Las células se lavaron 2 veces con medio Locke's (mM) 154 NaCl, 5.6 KCl, 3.6 NaHCO₃, 2.3 CaCl₂, 5 HEPES y 5.6 glucosa; pH 7.4, se lisaron incubándolas con 125 μ l de buffer de lisis para células somáticas. El lisado (5 μ l) se diluyó en 95 μ l de agua destilada; la mezcla (100 μ l) se colocó en tubos de polietileno para ser leída en un luminómetro. El luminómetro inyectó 400 μ l de mezcla de reacción del ensayo de luciferin-

luciferasa y registró los valores de quimioluminiscencia en milivoltios. La concentración de ATP fue determinada con base en una curva estándar (de 6.5 a 250 pmol). La determinación de proteínas se llevó a cabo por medio del método de Bradford y los datos se expresaron como picomolas por microgramo de proteína.

Detección de ERO

La producción de especies reactivas de oxígeno se evaluó por medio de los marcadores fluorescentes dihidroetidio (DHE) y carboxi-diclorodihidrofluoresceína diaceto (carboxi-H₂DCFDA). Ambos compuestos entran a las células y son susceptibles de ser oxidados convirtiéndose en compuestos que emiten fluorescencia y se utilizan como indicadores de la presencia de ERO.

El dihidroetidio al ser oxidado se convierte a etidio (Et), éste se transporta al núcleo y se intercala entre las bases del DNA y emite fluorescencia roja, la cual se observa con un filtro de rodamina. La carboxi-H₂DCFDA al poseer dos cargas negativas a pH fisiológico permanece dentro de la célula, es deacetilada y al ser oxidada se convierte en diclorofluoresceína (DCF) la cual emite fluorescencia verde cuando se observa con un filtro de fluoresceína, indicando la presencia de ERO en el citoplasma celular. El dihidroetidio se oxida preferentemente por superóxido, aunque también puede oxidarse por otras ERO, mientras que la DCF es oxidada por diversas ERO.

Después de exponer los cultivos a la ausencia de glucosa durante diferentes tiempos y en presencia de los distintos fármacos, las células se incubaron con 8 μ M de carboxi-H₂DCFDA y 3.2 μ M de dihidroetidio.

Después de la incubación las células se lavaron dos veces con medio Ringer Krebs y el cubreobjetos en el que fueron sembradas se colocó en una cámara de perfusión para ser observadas y cuantificar el aumento en la fluorescencia. Los resultados se expresan como el promedio de la sumatoria de la fluorescencia total de todos los campos de cada condición.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por medio de análisis de varianza, ANOVA, de una vía seguida de una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple.

Resultados

La muerte celular observada al utilizar el inhibidor glucolítico NaF fue dependiente de la dosis. Al incubar las células con este inhibidor durante media hora en medio Krebs a una concentración de 5 mM no se produjo un daño significativo (Figura 1A) ya que no se observaron cambios en la reducción del MTT con respecto al control en ninguna de las condiciones. Sin embargo al aumentar la dosis a 10 mM se observó una reducción del 50% en la viabilidad celular. En esta condición la incubación del NaF con los antagonistas de los receptores glutamatérgicos (MK-801 y NBQX) tuvo un efecto protector significativo cuando ambos antagonistas se agregaron al medio, lo que sugiere que la muerte en este paradigma tiene un componente excitotóxico. Cuando se eliminó el calcio del medio también se redujo significativamente la muerte neuronal, sugiriendo que el daño está relacionado con la entrada de éste ión a través de los NMDAR. Dichos receptores se activarían debido a la despolarización de la membrana inducida por la falla energética ya que la glucólisis está inhibida (Figura 1B). A una mayor concentración (20 mM) el NaF se precipitó en el medio dando lecturas positivas que no correspondían a la sobrevivencia celular observada en el microscopio por lo que tales valores no fueron considerados.

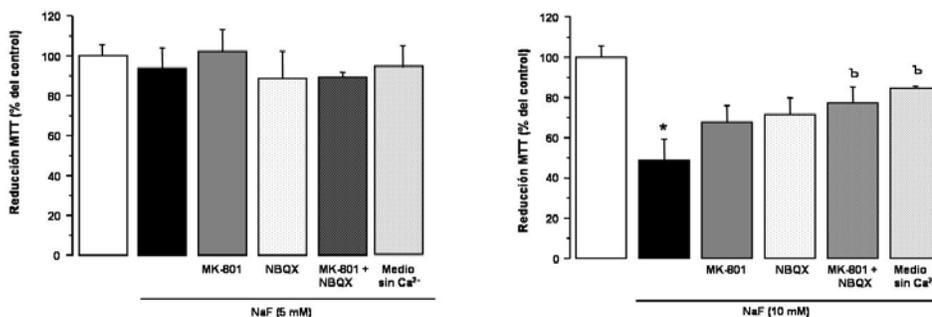


Figura 1. Evaluación de la participación de la excitotoxicidad durante la inhibición glucolítica. Las células se incubaron con NaF a 5 y 10 mM durante 30 minutos en medio Ringer Krebs con o sin los antagonistas de los receptores a glutamato, MK-801 y NBQX, por separado y juntos. También se incubaron con el inhibidor NaF en un medio sin calcio. Los resultados se expresan como por ciento del control. Los datos representan la media \pm ES de 3-5 experimentos independientes analizados con una prueba de análisis de varianza de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.001$ con respecto al control y \flat $P < 0.05$ con respecto a NaF 10 mM.

Para evitar la precipitación de NaF, éste se incubó en medio de cultivo (NB/B27) y se aumentó el tiempo de exposición a 2 horas utilizando diferentes concentraciones (Figura 2).

A 10 mM los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en el medio Ringer Krebs. Hay una reducción del 50% en la viabilidad celular que es prevenida significativamente por el MK-801.

Al aumentar la concentración del inhibidor a 15 mM, la reducción en la viabilidad no es significativamente diferente con respecto a 10 mM y el efecto protector del MK-801 es muy similar, sin embargo al aumentar más la concentración de NaF (20 mM), hay una mayor reducción de la viabilidad y no hay una protección significativa con el MK-801. Esto que sugiere que cuando la inhibición glucolítica es más severa el daño, y por consiguiente la muerte neuronal, no depende del todo de un mecanismo excitotóxico mediado por el receptor NMDA. Este resultado concuerda con datos obtenidos previamente en el laboratorio (42).

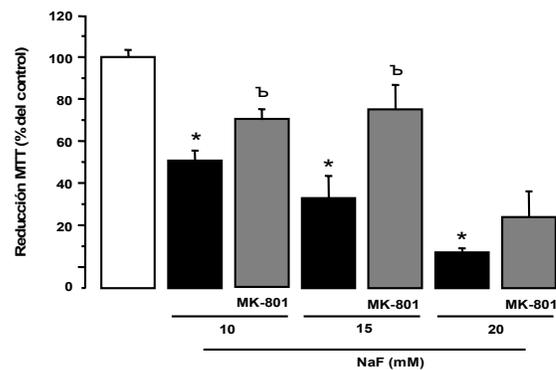


Figura 2. Evaluación de la participación de la excitotoxicidad en el daño producido por la inhibición glucolítica. Las células fueron incubadas en medio neurobasal junto con el NaF a 10, 15 y 20 mM más el antagonista de los NMDAR, MK-801 durante 2 horas. La viabilidad fue medida 24 horas después por MTT. Los resultados se expresan como por ciento del control (media± ES) de 3-6 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.0001$ con respecto al control y ♯ $P < 0.05$ con respecto a NaF 10 mM y 15 mM.

Con el fin de mimetizar mejor la condición hipoglucémica las células fueron expuestas a medio DMEM sin glucosa durante diferentes tiempos. Para evaluar la participación de la excitotoxicidad se utilizaron los antagonistas de los receptores a glutamato, MK-801 y NBQX. La viabilidad fue medida 24 horas después por MTT.

Cuando las células fueron expuestas durante 1 h a la ausencia de glucosa (AG) se observó un 60% de muerte con respecto al control; en esta condición la protección con el MK-801 es significativa más no así la del NBQX (Figura 4). A las 24 h después de la exposición hay pérdida de los somas celulares en los cultivos y adelgazamiento de los procesos neuronales (Figura 3). Las células tratadas con MK-801 se preservan mejor mientras que las tratadas con NBQX se

observan más dañadas (Fig. 3). En los cultivos expuestos durante 4 h a la ausencia de glucosa, el daño es mayor; el MK-801 muestra un buen efecto protector mientras que el del NBQX es mucho menor.

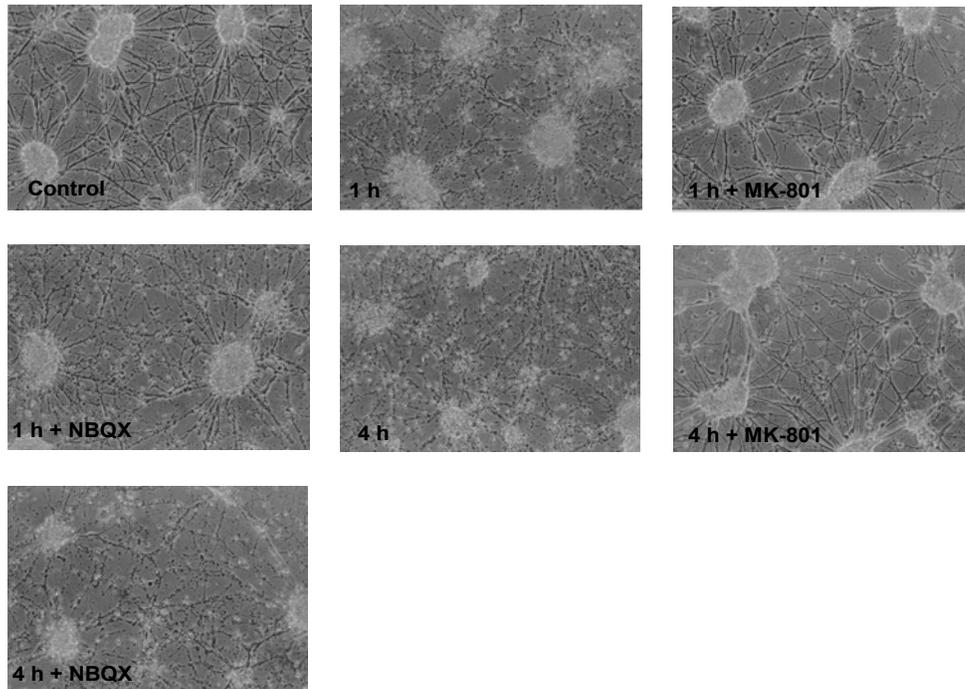


Figura 3. Efecto protector de los antagonistas glutamatérgicos contra la muerte neuronal inducida por la exposición de las células a medio sin glucosa durante 1 y 4 horas. Las células conservan su aspecto morfológico cuando se incuban en presencia del antagonista de los NMDAR MK-801, y en menor medida con el antagonista de los no-NMDAR, NBQX.

Al aumentar el tiempo de exposición al medio sin glucosa se observa un mayor porcentaje de muerte, sin embargo no existe una diferencia significativa entre 2, 4, 6, 8 y 24 horas de incubación. La protección con ambos antagonistas es significativa en todas las condiciones (con excepción de 6 h con NBQX) aunque no es completa (Figura 4). Estos resultados sugieren que independientemente del tiempo de exposición, el mecanismo de daño involucra en parte la participación de ambos tipos de receptores a glutamato. Sin embargo la protección no es total lo que sugiere que otro mecanismo pudiera estar involucrado.

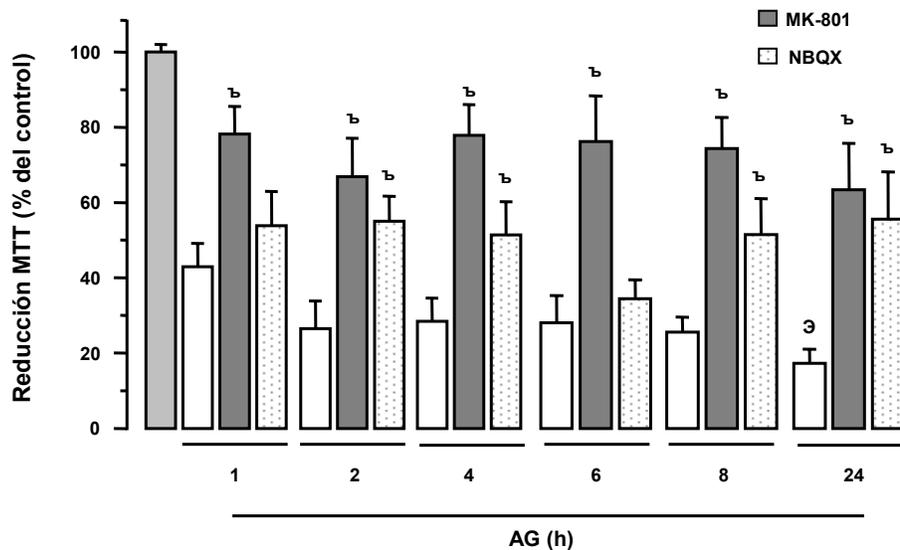


Figura 4. Evaluación del daño y protección con los antagonistas de los receptores a glutamato al exponer los cultivos a la ausencia de glucosa durante diferentes periodos de tiempo. La viabilidad celular se determinó a las 24 h a través del ensayo MTT. Los datos están expresados en por ciento del control (media \pm ES) de 4-10 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. Todos los tratamientos son significativamente diferentes con respecto al control. $P < 0.0001$ ^b $P < 0.05$ con respecto a su respectivo tratamiento y \emptyset $P < 0.05$ con respecto a 1h. AG, ausencia de glucosa.

Para establecer el curso temporal de muerte después de 1 y 4 horas de exposición a ausencia de glucosa, la viabilidad celular fue medida a diferentes tiempos después de la exposición (Figura 5). Después de 1 hora de ausencia de glucosa más una hora de recuperación en medio con glucosa se observa un decremento en la viabilidad de aproximadamente 25%; cuando el periodo de recuperación es de 3 h la viabilidad disminuye un 15% más y cuando es de 5 h ésta decrece en un 60%. No hay mayor pérdida celular si se prolonga el periodo de recuperación (Figura 5, cuadros). Esto sugiere que cuando las células son sometidas a un periodo corto de ausencia de glucosa, el daño se da aún después de que se retira el estímulo y en un intervalo de tiempo relativamente corto, es decir, en las 5 primeras horas.

Por otro lado cuando el estímulo es más prolongado (4 horas), éste produce el mismo porcentaje de muerte independientemente de la presencia de un periodo de recuperación sugiriendo que este

estímulo es más severo y el daño se produce casi completamente durante la ausencia de glucosa (Figura 5, círculos).

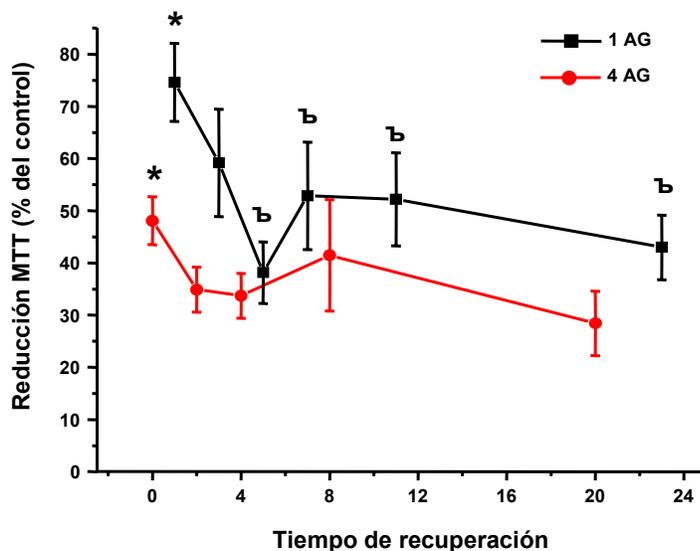


Figura 5. Curso temporal de muerte. Las células fueron expuestas durante 1 y 4 h al medio sin glucosa y a diferentes períodos de recuperación (reintroducción de la glucosa) para determinar el momento en el que se produce el daño. Los datos están expresados en por ciento del control de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron por medio de la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control y ^b con respecto a 3 h. AG, ausencia de glucosa.

Para evaluar la participación de la liberación de los aminoácidos excitadores, se midió su concentración extracelular después de 1 y 4 horas de exposición al medio sin glucosa por medio de HPLC.

Un estímulo de una hora de ausencia de glucosa es suficiente para aumentar de 3.3 a 9.3 μM la concentración extracelular de glutamato. La liberación de éste no disminuye significativamente con la administración de los antagonistas de los receptores a glutamato, aunque éstos si tienen efecto sobre la viabilidad celular. Esto podría deberse a que aunque hay más glutamato en el medio extracelular si los receptores están bloqueados, el aminoácido no podría actuar sobre ellos. Cuando el periodo de ausencia de glucosa fue de 1 h no se observó un aumento en los niveles extracelulares de aspartato.

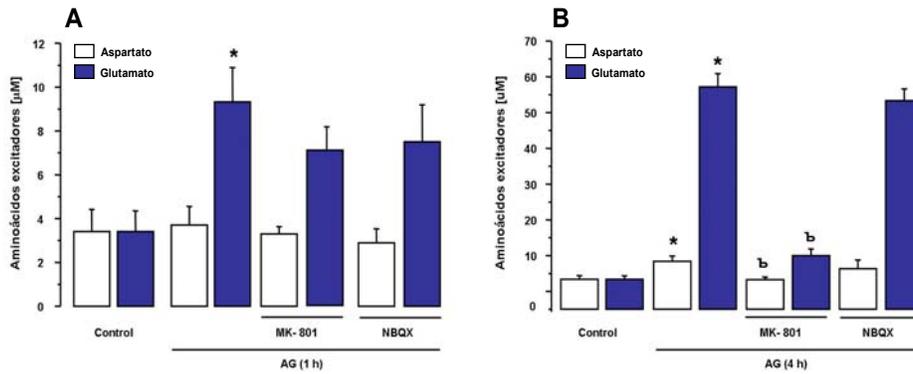


Figura 6. Liberación de los aminoácidos excitadores aspartato y glutamato. El medio sin glucosa fue retirado después de la exposición y se analizó para determinar la concentración de aspartato y glutamato. Los datos se expresan como la media \pm ES de la concentración (μM) de glutamato y aspartato de 3 experimentos independientes analizados por la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control y † $P < 0.05$ con respecto al medio sin MK-801. (AG ausencia de glucosa).

La liberación de aspartato y glutamato se midió después de 4 horas de privación de glucosa. En esta condición la concentración de glutamato extracelular aumenta 16 veces con respecto al control (Figura 6B). Este aumento tan grande podría deberse a fuga por daño ya que después de 4 horas de ausencia de glucosa alrededor del 50% de las células están muertas (Figura 5). Esta hipótesis es posiblemente cierta ya que el MK-801 previno el aumento significativamente con respecto a 4 horas de AG (9.9 μM). El bloqueo de los receptores no-NMDA no previno la liberación de glutamato. La concentración extracelular de aspartato por otra parte aumentó significativamente en esta condición probablemente debido a la liberación por daño. El MK-801 previno este aumento mientras que el NBQX no tuvo efecto.

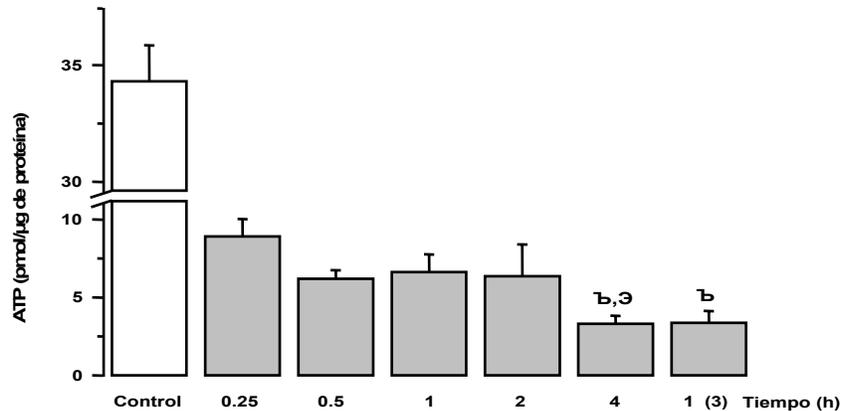


Figura 7. Cuantificación de los niveles de ATP después de exponer las células a medio sin glucosa durante diferentes tiempos. Los datos están expresados como el promedio \pm ES de la concentración de ATP (pmolas/ μ g de proteína) de 4 experimentos individuales y fueron analizados por medio de la prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple. Todos los tratamientos son significativamente diferentes, $P < 0.0001$ con respecto al control, b $P < 0.05$ con respecto a 15 min y c $P < 0.05$ con respecto a 1 hora.

Para evaluar el efecto que produce la falta de glucosa sobre los niveles se determinaron los niveles de ATP a diferentes tiempos, desde los quince minutos hasta las 4 horas de ausencia de glucosa. También se determinaron después de 3 h de recuperación, cuando los cultivos se sometieron a 1 h de ausencia de glucosa (última barra de la figura 7). En la gráfica 7 se puede observar que los niveles de ATP disminuyen un 75% a los 15 minutos de exposición a medio sin glucosa. Esta disminución se mantiene de los 30 minutos hasta las 2 horas y a las 4 horas disminuyen un 10% más, siendo significativamente menores con respecto a 15 minutos y a 1 hora.

Los niveles de ATP después de una exposición de 1 h a medio sin glucosa más tres horas de recuperación (última barra de la figura 7) son muy similares a los observados después de 4 horas continuas de privación de glucosa y son significativamente diferentes con respecto a 15 minutos. Estos resultados sugieren que a pesar de la reintroducción de glucosa al medio los niveles de ATP no se recuperan.

Por otra parte se evaluó si la falta de glucosa favorece la producción de ERO. Para ello se usaron los marcadores DHE y carboxi- H_2DCFDA descritos anteriormente. Para cuantificar los cambios en la fluorescencia de cada marcador en las diferentes condiciones se capturó un número determinado de fotos de cada campo y se utilizó el programa AxionVision AC. En la figura 8 se observa el aumento en la fluorescencia emitida por ambos compuestos al ser oxidados después del tiempo de exposición señalado. A los 30 minutos las células se observan hinchadas. Hay un aumento en la

intensidad de la fluorescencia que se observa en el núcleo debido a la presencia del etidio (rojo) y en el soma debido a la oxidación de la DCF (verde). Algunos de los núcleos marcados con etidio comienzan a condensarse después de 4 h de privación de glucosa.

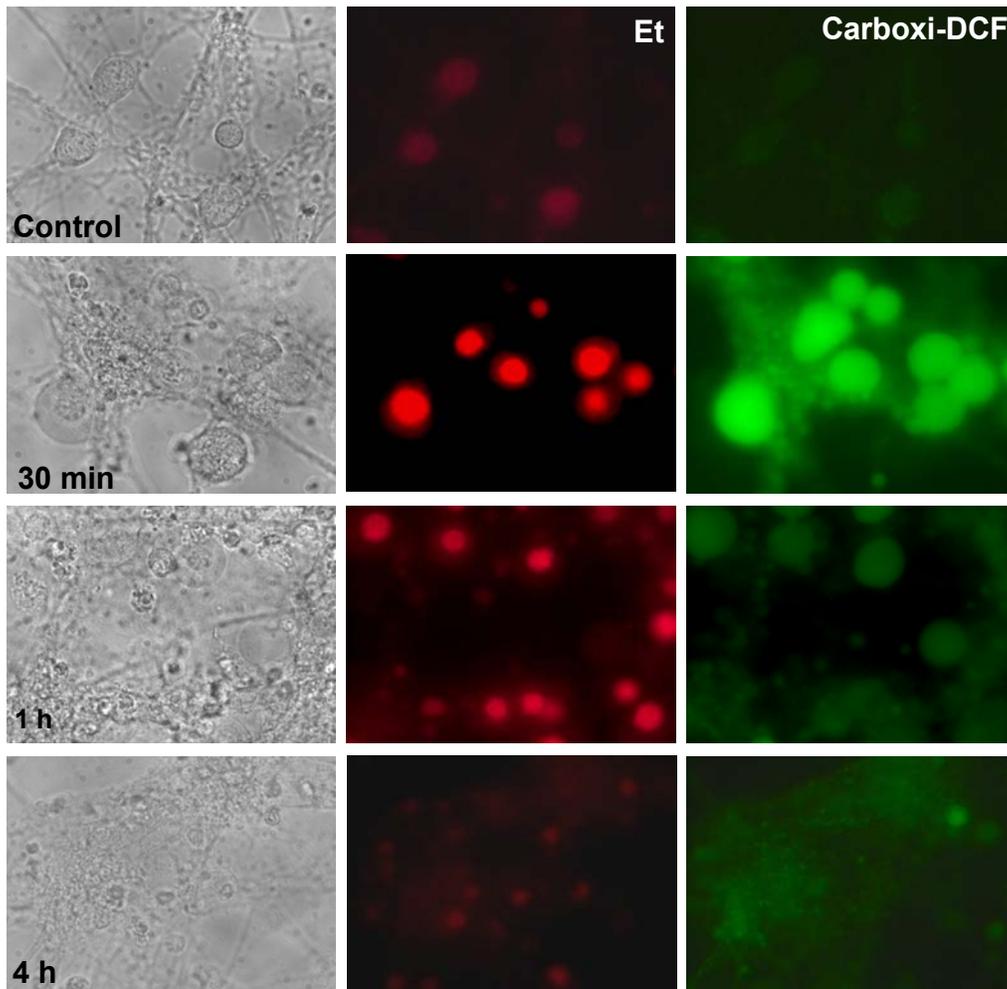


Figura 8. Aumento en la generación de ERO medido a diferentes tiempos de incubación con medio sin glucosa. De izquierda a derecha: campo claro, filtro de rodamina para el etidio y fluoresceína para la CDF. 63X.

Los datos cuantitativos de intensidad de fluorescencia de muestran el la Fig. 9. Después de 30 minutos de ausencia de glucosa se observó un aumento importante en los niveles de ERO por lo que la fluorescencia se midió a tiempos más cortos para observar el comportamiento de dicho incremento (Figura 9). En el caso de la DCF (Figura 9B) el aumento comienza desde los

10 minutos, sin embargo el pico de producción de ERO se da a la media hora, a este tiempo la fluorescencia se incrementa más que en cualquier otra condición y si se aumenta el tiempo de exposición se observa menor intensidad de fluorescencia (Figura 9B). La fluorescencia emitida por el etidio, aunque también comienza a aumentar gradualmente desde los 10 minutos, alcanza el pico después de 1 h, y ésta se mantiene con una intensidad similar hasta las 4 h (Figura 9A).

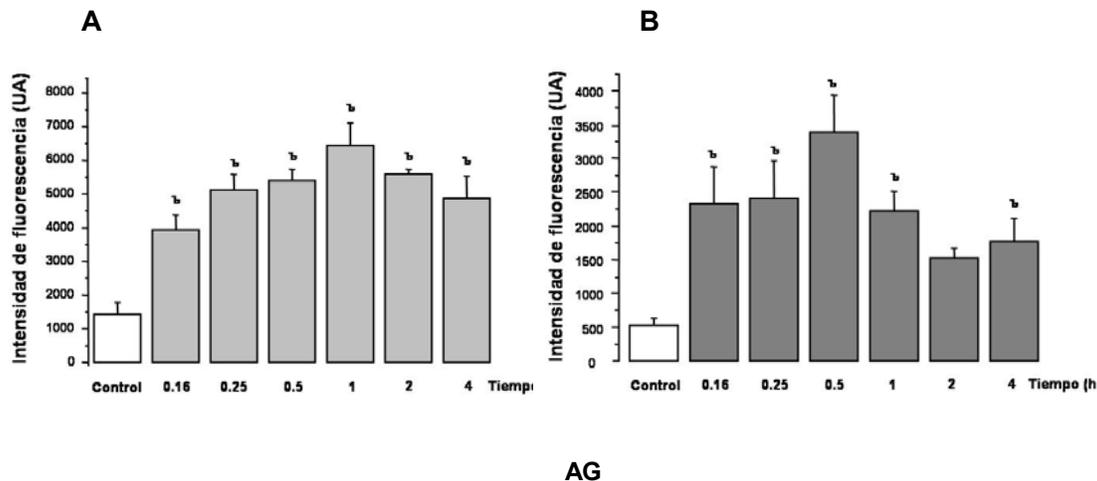


Figura 9. Aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno inducido por la ausencia de glucosa. Las células se incubaron con dihidroetidina para detectar la presencia indirecta de anión superóxido durante los tiempos señalados, y B con carboxy-diclorodihydrofluoresceina diacetato, para detectar la presencia de ERO a diferentes tiempos. Los datos están expresados como el promedio de la intensidad de fluorescencia de 4-7 experimentos independientes y se analizaron por medio de la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple. $\text{b}P < 0.05$ con respecto al control (AG ausencia de glucosa).

Para determinar la relación entre la excitotoxicidad y la producción de ERO, se cuantificaron los cambios en la fluorescencia utilizando los mismos marcadores, incubando las células durante 30 minutos en medio sin glucosa y en presencia de los antagonistas de los NMDAR, MK-801 y no-NMDAR, NBQX así como de los antioxidantes, vitamina E, ebselen y NDGA (Figura 10). Los fármacos se incubaron durante 30 minutos en el medio sin glucosa en las siguientes concentraciones: MK-801, 10 μM , NBQX, 50 μM , vitamina E, 1.2 mM, NDGA, 100 μM y ebselen, 10 μM .

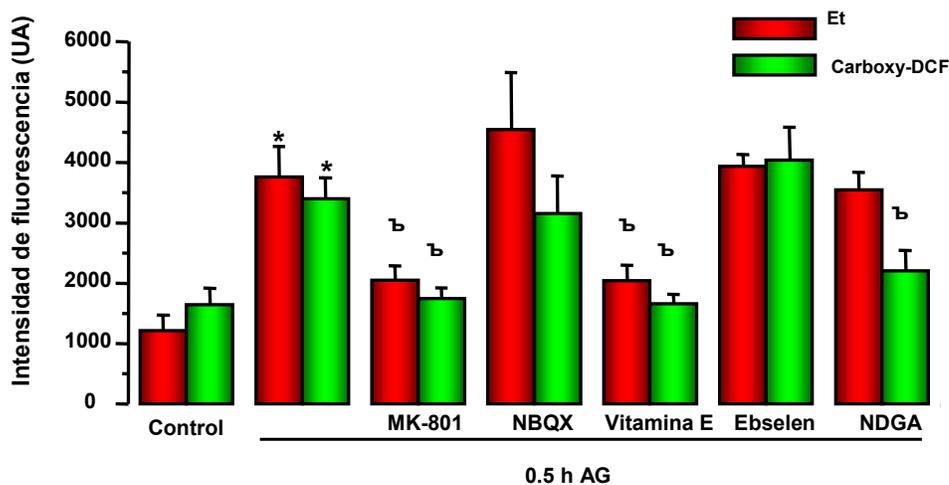


Figura 10. Efecto de los antagonistas MK-801 y NBQX, y de los antioxidantes vitamina E, ebselen y NDGA en la generación de ERO inducida por la exposición durante 30 minutos a un medio sin glucosa. Los datos están expresados como el promedio de la intensidad de fluorescencia de 3-5 experimentos independientes y se analizaron por medio de la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control y † $P < 0.05$ con respecto a 30 minutos. AG, ausencia de glucosa.

El antagonista de los NMDAR, MK-801 redujo significativamente la fluorescencia de cada marcador; las células conservan su morfología (Figura 11) y la marca que generan es muy similar a la presente en los cultivos control. Esto sugiere que el aumento en las ERO está mediada por los receptores NMDA. El NBQX no redujo la intensidad de la fluorescencia emitida por ninguno de los marcadores.

La vitamina E tiene un efecto similar, disminuyendo la fluorescencia de ambos marcadores y preservando parcialmente la morfología neuronal, ya que las células se ven un poco hinchadas pero los procesos se preservan (Figura 11). El NDGA redujo únicamente la intensidad de la fluorescencia emitida por la DCF, y el ebselen no sólo no evitó la producción de ERO sino que además parece afectar a las células ya que las células se observan morfológicamente dañadas (datos no mostrados).

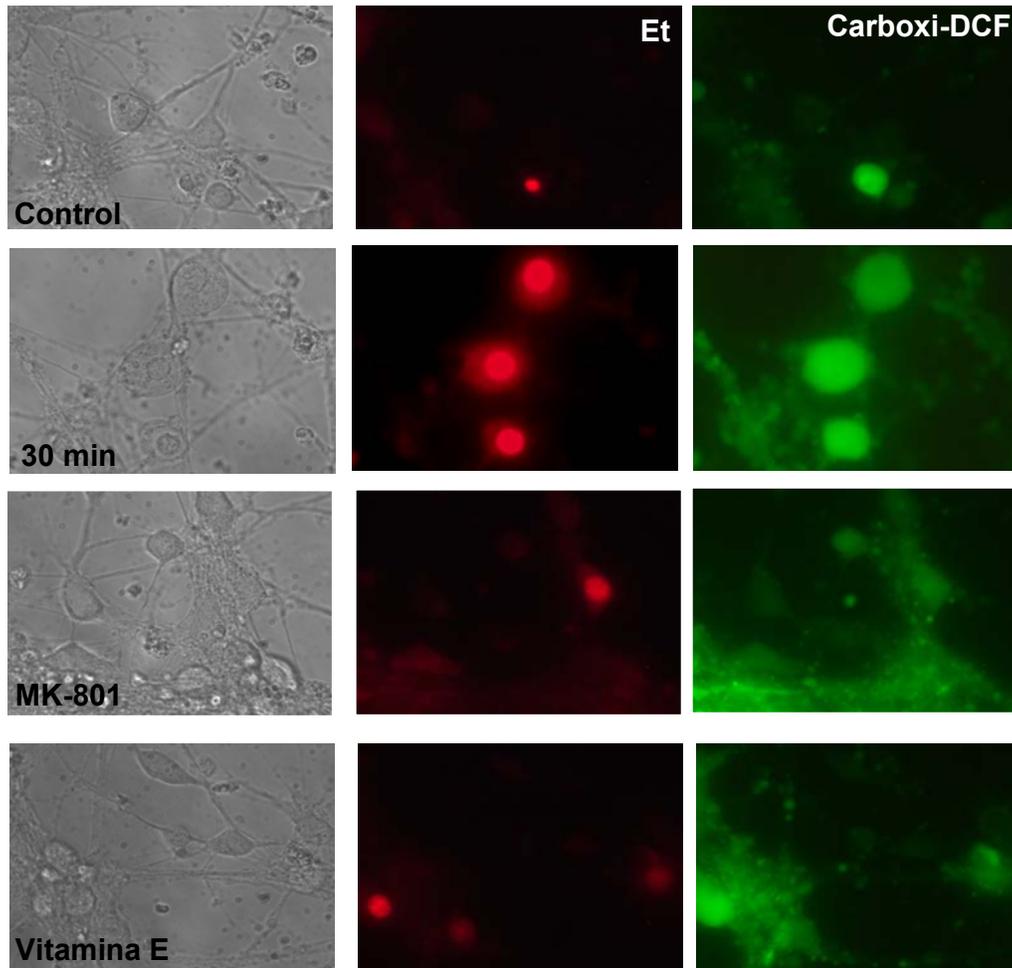


Figura 11. Efecto de los antagonistas MK-801 y NBQX y de la vitamina E en la generación de ERO después de 30 minutos de ausencia de glucosa. De izquierda a derecha: campo claro, filtro de rodamina para el etidio y fluoresceína para la CDF 63X.

El efecto en la viabilidad celular de los inhibidores de enzimas que generan radicales libres se evaluó después de incubar las células durante 1 hora en medio sin glucosa en todos los casos. Este tiempo se eligió porque el aumento en la generación de ERO es, al parecer, un evento temprano, y por tanto los mecanismos generadores de ERO deben activarse a tiempos cortos, al igual que la disminución en los niveles de ATP y el aumento en la concentración extracelular de glutamato.

La apocinina, inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, se probó a varias concentraciones pero ninguna de ellas tuvo un efecto protector. El alopurinol, un inhibidor de la enzima xantina oxidasa tampoco tuvo efecto alguno en la viabilidad celular a las concentraciones utilizadas (Figura 12). Por otro lado se utilizó vitamina E a diferentes concentraciones y a pesar de que sí previene el aumento de ERO, su efecto en la viabilidad no es significativo.

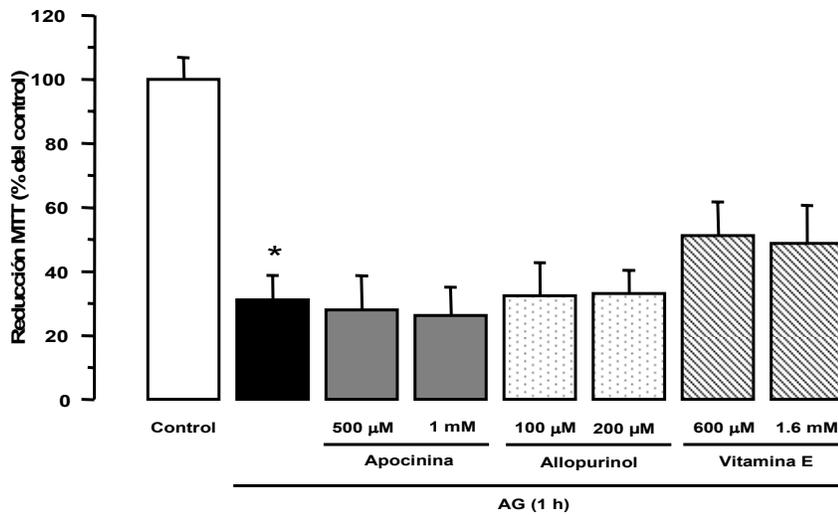


Figura 12. Evaluación de la participación dos mecanismos enzimáticos y de un antioxidante sobre la viabilidad celular en condiciones de privación de glucosa. La apocinina, inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, el alopurinol, un inhibidor de la enzima xantina oxidasa, y la vitamina E fueron expuestos a las concentraciones indicadas durante 1 hora de ausencia de glucosa. La viabilidad se midió 24 horas después. Los datos están expresados como por ciento del control \pm ES. Los datos se analizaron por medio de la prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple. * $P < 0.05$ con respecto al control. AG, ausencia de glucosa.

Discusión

Desde hace varias décadas se sabe que cuando existe una deficiencia energética como la ocasionada por la falta de glucosa o a la inhibición de su metabolismo, se favorece el daño excitotóxico. En el modelo de inhibición glucolítica por yodoacetato, se ha observado que el mecanismo de daño es de tipo excitotóxico cuando la inhibición es moderada y los niveles de ATP no disminuyen completamente. Debido que este compuesto inhibe a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que además de su función en la glucólisis, participa en la regulación de procesos como la replicación y reparación del DNA, la exportación del RNA nuclear, la organización del citoesqueleto, la exocitosis y la muerte celular programada, se decidió estudiar la participación de la excitotoxicidad en la muerte, inhibiendo otra enzima de la misma vía, la enolasa, utilizando NaF. Los resultados corroboraron que un mecanismo excitotóxico participa en el daño neuronal inducido por la falla glucolítica, ya que en este modelo el daño fue prevenido por los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato. Estos resultados están de acuerdo con estudios pioneros que demostraron que la administración de los antagonistas de los receptores NMDA previenen el daño hipoglucémico inducido en animales experimentales por la administración de insulina. Además la eliminación de las fibras glutamatérgicas cortico-estriales disminuye el daño neuronal en el estriado (22-23).

Con el fin de mimetizar mejor una condición hipoglucémica se estudió la muerte neuronal en neuronas cultivadas del hipocampo, una de las regiones más vulnerables a la hipoglucemia (21), sometidos a la ausencia de glucosa. En este modelo el antagonista de los NMDAR, MK-801, previno significativamente el daño neuronal, aun cuando los periodos de privación de glucosa fueron largos (6, 8 y 24 h). El NBQX tuvo un efecto menor pero significativo sobre la viabilidad celular, con excepción del daño producido por la exposición a la ausencia de glucosa durante 1 h. Estos resultados sugieren que durante un período mas corto de ausencia de glucosa los principales receptores involucrados en la muerte son los NMDA, mientras que cuando el estímulo se prolonga los receptores no-NMDA participan de manera más importante en el daño.

Los resultados indican que en el modelo de privación de glucosa el daño celular está mediado por un mecanismo excitotóxico, por esta razón decidimos evaluar la liberación de aminoácidos excitadores.

La liberación de aminoácidos excitadores principalmente aspartato al medio extracelular se ha reportado ocurre en la hipoglucemia (46). En nuestras condiciones experimentales observamos

que se libera principalmente glutamato a tiempos cortos (1 hora), y que este aumento no es prevenido si se bloquean los iGluRs. La concentración de glutamato observada después 1 hora de ausencia de glucosa es una concentración tóxica (2) por lo cual puede decirse que el de daño esta mediado por el glutamato liberado, aunque no podemos descartar la activación de los receptores NMDA por la falla energética (debido a la liberación del ión Mg^{2+} del poro del canal del NMDAR) involucrando también un mecanismos de excitotoxicidad secundaria (10). En estas condiciones ni el Mk-801 ni el NBQX previenen la liberación de glutamato, pero si tienen un efecto positivo sobre la viabilidad celular, lo cual puede deberse a que aunque haya más glutamato en el medio éste no puede actuar sobre sus receptores ya que se encuentran bloqueados.

Por otro lado, en este tiempo no se encontró un aumento significativo en los niveles de aspartato extracelular, lo cual que sugiere que el equilibrio de la reacción de transaminación mediada por la aspartato aminotransferasa no está alterado y que en estas condiciones el glutamato no se metaboliza a α -cetoglutarato sino que está disponible para liberarse de las neuronas.

A tiempos más largos (4 horas) la concentración de glutamato aumenta 16 veces probablemente debido a fuga por daño celular, ya que a este tiempo alrededor del 70% de las células están muertas a este tiempo. Esta hipótesis es posible ya que el MK-801 previene este aumento aunque los niveles remanentes del aminoácido siguen siendo tóxicos. Sin embargo, debido a que este compuesto bloquea a los receptores aunque la concentración de glutamato en el medio sea alta, los receptores estarían bloqueados previniendo el daño. Además dado que aumenta la viabilidad celular evita la fuga del aminoácido debida al daño. El NBQX no tiene efecto alguno en la liberación de ambos aminoácidos probablemente debido a que su contribución a la viabilidad celular es menor.

A este tiempo se observó un aumento en los niveles de aspartato extracelular, el cual sólo se previno con el MK-801. De igual forma, este aumento podría deberse fuga por daño ya que a este tiempo alrededor del 70% de las células están muertas.

Dado que no se observó liberación de aspartato 1 hora después de ausencia de glucosa, en un principio se consideró que el estímulo no era tan severo como para cambiar el equilibrio de la reacción de la aspartato-amino transferasa hacia al aspartato, y que el glutamato no estaría utilizándose como metabolito en el ciclo de Krebs. Para evaluar esta posibilidad se cuantificaron los niveles de ATP después de exponer las células al medio sin glucosa. A los 15 minutos los

niveles de ATP disminuyen un 75% con respecto al control. De los 30 minutos y hasta las dos hora disminuyen hasta en un 80% y a las 4 horas disminuyen hasta un 90%. Cuando se deja a las células recuperar en un medio con glucosa durante 3 h, después de 1 h de privación de glucosa, niveles de ATP son muy similares a los observados después de 4 horas seguidas de privación de glucosa. Este resultado sugiere que pesar de la reintroducción de glucosa los niveles de ATP no se recuperan, lo que podría deberse a que el ATP que se sintetiza en el medio de recuperación podría estarse utilizando rápidamente, por ejemplo para restablecer los gradientes iónicos a través de la ATPasa de Na^+/K^+ , o para contrarrestar (a través de mecanismos dependientes de ATP) el daño originado. Otra explicación podría ser que las células dañadas pierden la capacidad de sintetizar ATP aunque la glucosa esté disponible de nuevo. De acuerdo a los datos de sobrevivencia aproximadamente el 50% de las células sobreviven en esta condición aún cuando los niveles de ATP están muy reducidos.

El aumento en la concentración extracelular de glutamato y la disminución severa en los niveles de ATP a tiempos cortos de ausencia de glucosa sugieren que los mecanismos involucrados en el daño son rápidos y que si el estímulo se prolonga se exacerbaban.

El aumento en la generación de ERO también es un evento temprano. Se observó un aumento significativo en la fluorescencia emitida por el etidio a partir de los 10 minutos de exposición a medio sin glucosa, y un pico de generación después de 1 h. El pico de producción de ERO capaces de oxidar a la carboxy- H_2DCFDA , en cambio, se presenta a los 30 min y la producción de ERO conforme aumenta el tiempo de exposición. La producción de ERO como consecuencia de la deficiencia de glucosa o de la inhibición farmacológica de la glucólisis ha sido reportada en otros modelos celulares (31-33). En éstos se ha sugerido que las ERO juegan un papel importante dentro de los mecanismos generadores de daño bajo estas condiciones.

En nuestras condiciones, observamos que el daño neuronal tiene un componente excitotóxico, y que aumenta la producción de ERO. Para determinar la relación entre ambos procesos evaluamos la producción de ERO durante la ausencia de glucosa en presencia de los antagonistas de los iGluRs. El MK-801 previno la generación de ERO marcados tanto por la CDF como por el etidio, sugiriendo que la producción de ERO está relacionada con la activación de los NMDAR y por tanto con la excitotoxicidad.

La producción de ERO puede explicarse por la activación de diversos sistemas por el influjo de calcio a través de los NMDAR. Los iones calcio pueden favorecer la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a través

de la activación de la xantina oxidasa, por la sobrecarga de calcio mitocondrial, o por la activación de NOS induciendo la formación de NO. El NO reacciona con el $O_2^{\bullet-}$ para formar una ERN más reactiva, el peroxinitrito $ONOO^-$. Además el $O_2^{\bullet-}$ puede ser convertido en H_2O_2 y OH^{\bullet} . El calcio activa además a la enzima fosfolipasa A_2 que degrada componentes de la membrana celular y origina la liberación de ácido araquidónico cuyo metabolismo genera radicales libres. De esta forma la excesiva activación de los receptores glutamatérgicos conlleva al daño oxidativo. Por otra parte la NADPH oxidasa es otra enzima generadora de $O_2^{\bullet-}$ cuya actividad se ha observado durante de la reintroducción de glucosa después de un periodo de ausencia de ésta (38).

El aumento en las ERO sólo se previno utilizando una concentración alta de vitamina E pero ninguno de los antioxidantes utilizados ni de los inhibidores de las distintas enzimas tuvo efecto alguno sobre la viabilidad celular ni en la generación de ERO. La vitamina E tampoco redujo la muerte neuronal. En trabajos previos se ha mostrado que la eficiencia de antioxidantes como el trolox sólo es significativa únicamente cuando se coincuba con antagonistas de los NMDAR como el dextrofano (35), por lo que posiblemente no es suficiente contrarrestar las ERO o las ERN para prevenir la muerte neuronal sino que además es necesario bloquear los NMDAR.

Tampoco se ha observado efecto protector de inhibidores de enzimas que generan radicales libres (como el alopurinol y el L-NAME, que inhiben a la xantina oxidasa y a la NOS, respectivamente) en otros modelos celulares (30). Estos resultados podrían deberse a que la inhibición de una sola enzima activada por calcio podría no ser suficiente para contrarrestar el daño dado que otras enzimas o sistemas generadores de ERO o ERN seguirían activos. Sin embargo, de acuerdo a los presentes resultados el bloqueo de los NMDAR, esto es suficiente para evitar la producción de ERO inducida por la ausencia de glucosa, sugiriendo que la entrada de calcio por estos receptores juega un papel importante en este proceso.

Conclusiones

La muerte inducida en condiciones de privación de glucosa se origina por un proceso de excitotoxicidad clásica en el que la producción de ERO depende de la activación de los NMDAR. Durante la ausencia de glucosa se producen especies reactivas, aunque su papel en el daño neuronal todavía no es claro.

Perspectivas

Este estudio nos permitió establecer que la activación de los NMDAR tiene como consecuencia la producción de ERO. Aún falta conocer cuales son las fuentes productoras de dichas especies, su relación con el aumento en la concentración intracelular de calcio y su papel en la muerte de las neuronas

Referencias

1. Braitenberg, V., Schuz, A., *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity*, 2da edición. Berlin, Springer, 1998.
2. Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65:1-105.
3. Hayashi T. 1954. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* 3: 183–192.
4. Lucas, DR, Newhouse, JP. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* 58:193-2.
5. Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. 1959. Chemical excitation of spinal neurons. *Nature.* 183:611-612.
6. Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 9; 164(880):719-721
7. Choi DW., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 7:369-79.
8. Choi DW., Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci.*7:357-368.
9. Choi DW., Koh JY., Peters S. 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci.*8:185-196.
10. Novelli A., Reilly JA., Lysko PG et al. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451:205–212.
11. Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem;* 97:1634-1658.
12. Beal M. F. and Shults C. W. 2003. Effects of Coenzyme Q10 in Huntington's disease and early Parkinson's disease. *Biofactors* 18, 153–161.
13. Hart P. E., Lodi R., Rajagopalan B. et al. 2005. Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch. Neurol.* 62:621–626.
14. Brigelius-Flohe R. 1999 Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27:951–965.
15. Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1766-91.

16. Sakel, M. 1937. The methodical use of hypoglycemia in the treatment of psychoses. *Am. J. Psychiatry.* 94:111–129.
17. Baker, A.B. 1938. Cerebral lesions in hypoglycemia. II. Some possibilities of irrevocable damage from insulin shock. *Arch. Pathol.* 26:765–776.
18. Fazekas, J.F., Alman, R.W., and Parrish, A.E. 1951. Irreversible posthypoglycemic coma. *Am. J. Med. Sci.* 222:640–643.
19. Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA. 2003. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci.* 23:10681-10690.
20. Lewis LD., Ljunggren B., Rathchenson RA., Siesjo BK.,. 1974. Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia related to blood glucose and EEG. *J Neurochem*; 21: 673-679.
21. Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjo BK (1984b) The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 64:177–191.
22. Wieloch T., Engelsen B., Westerberg E., Auer R. 1985. Lesions of the glutamatergic cortico-striatal projections in the rat ameliorate hypoglycemic brain damage in the striatum. *Neurosci Lett.* 58: 25-30.
23. Wieloch T., 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an *N*-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683.
24. Nellgard B., Wieloch T. 1992. Cerebral protection by AMPA and NMDA-receptor antagonists administered after severe insulin-induced hypoglycemia. *Exp Brain Res.* 92: 259-266.
25. Papagapiou MP., Auer RN. 1990. Regional neuroprotective effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in hypoglycemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 10: 270-276
26. Friberg H., Ferrand-Drake M., Bengtsson F., Halestrap AP., Wieloch T. 1998. Cyclosporin A, but no FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 18; 5151-5159.
27. Moley KH, Mueckler MM. 2000. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis*; 5:99-105.

28. Patockova J, Marhol P, Tumova E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkovska J, Andel M. 2003. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res.*;52:131-135.
29. Ballesteros JR., Mishra OP., McGowan JE. 2003. Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol Neonate* 84; 159-163.
30. Papadopoulos MC, Koumenis IL, Dugan LL, Giffard RG. 1997. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res*; 748:151-156.
31. Rego AC., Santos MS., Oliveira CR. 1999. Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia or oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 26; 1405-1417.
32. Liu Y., Xiao-Dong S., Liu W., Zhang T-Y., Zuo J. 2003. Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med.* 7: 49-59.
33. McGowan JE, Chen L, Gao D, Trush M, Wei C. 2006. Increased mitochondrial reactive oxygen species production in newborn brain during hypoglycemia. *Neurosci Lett.* 399:111-114.
34. Massieu L, Montiel T, del Río P, Hernández-Fonseca K, Haces ML, García O, Camacho A, Mejía J. 2003, Role of energy metabolism in neuronal death associated with cerebral ischemia and neurodegenerative diseases, and its prevention with energy substrates, *Recent Res. Devel. Neuroch.* 6: 81-104.
35. Chow HS, Lynch JJ 3rd, Rose K, Choi DW. 1994. Trolox attenuates cortical neuronal injury induced by iron, ultraviolet light, glucose deprivation, or AMPA. *Brain Res.* 639:102-108.
36. Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P. 1996. Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience.*73:185-200.
37. Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. 2004. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. *Neurosci Lett.* 362:61-4.
38. Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. 2007. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest.* 117:910-8.
39. Singh P., Jain A., Kaur G., 2004. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem* 260:153-159.

40. Bhardwaj SK, Sharma ML, Gulati G, Chhabra A, Kaushik R, Sharma P, Kaur G. 1998. Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Mol Chem Neuropathol* 34:157–168.
41. Hino K., M. Nishikawa, E. Sato, M. Inoue. 2005. L-Carnitine inhibits hypoglycemia-induced brain damage in the rat. *Brain Research*. 1053: 77-87.
42. Hernández-Fonseca K., Cárdenas-Rodríguez N., Pedraza-Chaverri J., Massieu L. 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultures hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res* (en prensa).
43. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free combination. *J Neurosci Res*. 35: 567-576.
44. Hernández-Fonseca K., Massieu L. 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 82:196-205.
45. Antoine FR, Wei CI, Litell RC et al. 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthalaldehyde precolumn derivatization. *J Agric Food Chem*. 47:5100–5107.
46. Auer RN, Siesjö BK. 1993. Hypoglycaemia: brain neurochemistry and neuropathology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 7:611-25.