



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

VÍAS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES
REACTIVAS DURANTE LA AUSENCIA DE
GLUCOSA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA
MUERTE NEURONAL

T E S I S

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

P R E S E N T A:
BIÓL. BLANCA ESTELA PÁRAMO SÁNCHEZ

Tutor: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

VÍAS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DURANTE LA AUSENCIA DE GLUCOSA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MUERTE NEURONAL

RECONOCIMIENTOS

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

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Arturo Hernández-Cruz, del Departamento de Neurociencia Cognitiva del IFC, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de medición de calcio intracelular.

Se reconoce la asesoría técnica del Biólogo Nicolás Jiménez en los experimentos de medición de calcio intracelular.

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

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (48645-Q). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT (221021) para la realización de la presente tesis.

El jurado de examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM

Agradecimientos

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo por todo su apoyo para empezar, continuar y terminar este proyecto, por todo su interés en este trabajo y por todo el tiempo dedicado a mi formación desde el taller.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dr. Julio Morán Andrade y Dra. Susana Castro Obregón por todas sus dudas y comentarios, por su ayuda y atención, y el tiempo dedicado a este trabajo y a mi formación.

A los miembros del jurado de examen: Dra. Rocío Salceda, Dr. Rolando Hernández, Dra. María Elena Ibarra Rubio, Dr. Julio Morán Andrade y Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez por sus valiosos comentarios y correcciones.

A Tere por sus consejos, su ayuda y por la cochina, entre otras muchas cosas.

A mis compañeros del laboratorio, Ana, Paloma, Sharlen, Leti, Selene y Alberto Julio.

A Leti García por toda su ayuda con los trámites y resolución de dudas.

A Ceci por todo el material, por sus pláticas y por su compañía.

A Aldo...elipsis, iluminaciones, etcétera.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1 La glucosa en el Sistema Nervioso Central	3
1.2 Transporte de glucosa	4
1.3 Síntesis de ATP.....	6
2. Hipoglucemia	7
2.1 Características de la hipoglucemia	7
2.2 Hipoglucemia y daño neuronal	9
3. Transmisión glutamatérgica	11
3.1 Receptores a glutamato.....	13
3.2 Transporte de glutamato	20
3.3 Excitotoxicidad	22
4. Estrés oxidativo	24
4.1 Especies reactivas y radicales libres	25
4.2 Sistemas de defensa antioxidante	29
5. Señalización por calcio y estrés oxidativo	32
5.1 Regulación del calcio intracelular.....	33
5.2 Vías de producción de especies reactivas activadas por calcio	34
6. Mecanismos involucrados en el daño hipoglucémico	38
7. Antecedentes	40
8. Hipótesis	42
9. Objetivos	43
10. Metodología	44
10.1 Tratamientos	44
10.2 Determinación de especies reactivas	45
10.3 Determinación de calcio intracelular	45
10.4 Viabilidad celular.....	46
10.5 Análisis estadístico	47

11. Resultados	48
11.1 Producción de especies reactivas durante la ausencia de glucosa	48
11.2 Vías de producción de especies reactivas durante la ausencia de glucosa	49
11.3 Antioxidantes en la producción de especies reactivas inducida por la ausencia de glucosa	55
11.4 La producción de especies reactivas depende de calcio	56
11.5 Excitotoxicidad, estrés oxidativo y muerte neuronal durante la ausencia de glucosa	58
12. Discusión	63
13. Conclusiones	66
14. Perspectivas	67
15. Referencias	68
16. Anexo	74

Artículo publicado:

Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons.

Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez AM, Jiménez N, Hernández-Cruz A, Massieu L. Neuroscience 167:1057-1069.

Abreviaturas

AACOCF3	Araquidonilmetil cetona
AG	Ausencia de glucosa
AMPA	(α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionato)
CCSV	Canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje
c-H ₂ DCFDA	carboxi-2',7'-dihidrodiclorofluoresceina diacetato
c-DCF	carboxi-diclorofluoresceina
cPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ citósolica dependiente de Ca^{2+}
DHE	Dihidroetidio
DIV	Días in vitro
EPTU	2-etil-2-tiopseudourea hidrobromuro
ER	Especies reactivas
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Et	Etidio
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IP3	Inositol trisfosfato
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801	Maleato de dizocilpina
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
RNMDA	Receptores a N-metil-D-aspartato
RFU	Relative fluorescence units, unidades relativas de fluorescencia
SNC	Sistema nervioso central
XaO	Xantina oxidasa
7-NI	7-nitroindazol
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración intracelular de calcio

Resumen

La glucosa es el principal sustrato del metabolismo energético neuronal. Cuando los niveles de glucosa disminuyen durante la hipoglucemia, se produce muerte neuronal a causa de la disminución en los niveles de ATP, lo cual conlleva a la pérdida de los gradientes iónicos, al aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y liberación de aminoácidos excitadores. Se ha propuesto que la excitotoxicidad subsecuente a la liberación de glutamato y aspartato es el mecanismo responsable de la muerte neuronal en estas condiciones. También se ha propuesto que el estrés oxidativo es un factor que contribuye a la muerte neuronal en la hipoglucemia, ya que se ha observado un aumento temprano en la producción de especies reactivas (ER) en esta condición. No obstante, la fuente de dichas especies no se conoce del todo. En el presente trabajo, examinamos las vías de producción de ER y su contribución a la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa (AG) en neuronas cultivadas de hipocampo de rata. Se observó un rápido incremento en la producción de ER que concuerda con un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Además, determinamos que la producción de superóxido a través de la actividad de la xantina oxidasa (XaO) y de la fosfolipasa A_2 (cPLA₂) contribuye a la muerte neuronal, ya que su inhibición protegió a las células en contra de la muerte. La inhibición de la cPLA₂ y de la NADPH oxidasa (NOX) disminuyó la producción de especies reactivas a tiempos cortos de AG, mientras que la inhibición de la XaO tuvo efecto a tiempos más largos de AG. La óxido nítrico sintasa (NOS) parece no estar involucrada, ya que su inhibición no tuvo efecto alguno sobre la producción de ER ni sobre la muerte neuronal. Los antioxidantes trolox y ebselen disminuyeron la producción de ER y protegieron en contra de la muerte neuronal. En resumen, los presentes resultados muestran que la AG causa un aumento en la producción de ER por mecanismos dependientes de Ca^{2+} lo cual contribuye a la muerte neuronal.

1. Introducción

1.1 La glucosa en el Sistema Nervioso Central

El cerebro es un órgano con una alta demanda energética, semejante a la de órganos que llevan a cabo trabajo mecánico como el músculo o el corazón. Del peso total del cuerpo humano, el cerebro representa aproximadamente el 2% y se estima que utiliza alrededor del 20% de la energía total del mismo en estado de reposo para llevar a cabo sus funciones de manera óptima (Attwell y Laughlin, 2001).

La alta demanda energética del cerebro se debe a la gran cantidad de energía necesaria para mantener el potencial de membrana y funciones relacionadas con la señalización. Se estima que el cerebro utiliza alrededor del 75% de la energía en funciones relacionadas con la señalización, mientras que el 25% restante lo utiliza en funciones esenciales como la síntesis y degradación de proteínas, nucleótidos y fosfolípidos, el transporte axoplásmico, así como para prevenir la fuga de protones en la mitocondria (Attwell y Gibb, 2005).

Además, la eficiencia del cerebro para almacenar sustratos energéticos como el glucógeno es baja, por lo que depende del aporte continuo de ciertos sustratos, principalmente la glucosa, los cuales son transportados del torrente sanguíneo hasta el cerebro por medio de transportadores específicos situados en la barrera hematoencefálica (Spector, 2009), la cual está formada por células endoteliales de los capilares cerebrales y separa a la sangre del fluido intersticial del cerebro (Abbott et al., 2006).

El principal sustrato del metabolismo energético neuronal es la glucosa, aunque, en ciertas condiciones como durante la lactancia o el ayuno prolongado, las neuronas son capaces de utilizar ácidos monocarboxílicos incluyendo el lactato y los cuerpos cetónicos como el acetoacetato y el β -hidroxi-butirato; sin embargo, la concentración sanguínea de éstos es muy inferior a la de la glucosa (Nehlig y de Vasoncelos, 1993).

La glucosa se obtiene a través de la ingesta de alimentos, o bien puede producirse de manera endógena a partir de compuestos de tres carbonos como el piruvato, el lactato y el glicerol; así como algunos aminoácidos a través de la gluconeogénesis, y por el rompimiento del glucógeno o glucogenólisis que ocurre principalmente en el hígado (Nelson y Cox, 2000).

Los niveles de glucosa en la sangre están controlados por la acción conjunta de la insulina y el glucagón, entre otras hormonas, sobre el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Mayes, 1984), lo cual permite que se mantenga una concentración determinada de glucosa y evita fluctuaciones causadas por la ingesta de alimentos y el ejercicio vigoroso. Un aumento en la concentración sanguínea de glucosa estimula a las células β pancreáticas a liberar insulina, la cual aumenta la captura de glucosa y favorece la síntesis de glucógeno y triacilgliceroles (Barret, 2009; Suchy, 2009). Por otro lado, la disminución en los niveles de glucosa estimula la liberación de glucagón de las células α pancreáticas, lo cual estimula el rompimiento del glucógeno del hígado y la oxidación de ácidos grasos (Nelson y Cox, 2001; Barrett, 2009). En condiciones de ayuno prolongado, la disminución de insulina y el aumento en los niveles de glucagón, promueve la oxidación de los ácidos grasos a cuerpos cetónicos en el hígado, los cuales pueden ser liberados a la sangre y ser utilizados como sustratos energéticos en el cerebro (Barret, 2009).

1.1 Transporte de glucosa

El transporte de glucosa del torrente sanguíneo hacia el cerebro se lleva a cabo por transportadores localizados en las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica. Éstos transportan la glucosa del torrente sanguíneo hasta el fluido intersticial. También se localizan en la membrana plasmática de las células donde se encargan de transportar la glucosa del medio extracelular hacia el interior de las células.

Hasta la fecha se han identificado doce tipos de transportadores de glucosa, los cuales pueden ser dependientes o independientes de insulina, denominados GLUT1-GLUT12, cada uno de los cuales está conformado por doce segmentos transmembranales con sus respectivos extremos carboxilo(C-) y amino(N-) terminal situados en la parte citoplasmática 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 (Simpson et al., 2007).

El transportador GLUT1 es un transportador independiente de insulina, se expresa en astrocitos y células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La isoforma 55kDa de este transportador se localiza en células endoteliales mientras que la isoforma 45kDa se localiza en la membrana plasmática de los astrocitos. El GLUT3 se expresa predominantemente en neuronas, en la membrana plasmática y aunque en menor cantidad, en las vesículas intracelulares no sinápticas. Se localiza principalmente en estructuras de la materia gris y en la neurohipófisis. Éste también es un transportador independiente de insulina. Además, tiene una gran capacidad para transportar la glucosa. El GLUT4 es un transportador dependiente de insulina y se encuentra en neuronas y el GLUT5 está presente básicamente en microglia (Vannucci et al., 1997; Dwyer et al., 2002).

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 (Vannucci et al., 1998).

La expresión de los dos principales transportadores de glucosa en el cerebro, GLUT1 y GLUT3, está regulada de acuerdo a la demanda metabólica y a la tasa de utilización de energía en las diferentes regiones. 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 (Vannucci y Simpson, 2003).

También existen transportadores de ácidos monocarboxílicos conocidos como MCT de los cuales existen 14 subtipos (MCT1-MCT14). En el cerebro se han identificado básicamente el MCT1 y MCT2. Dichos transportadores son abundantes en el cerebro en desarrollo, consistentemente con el transporte de cuerpos cetónicos al cerebro durante el período de amamantamiento, y su contenido se reduce en etapas posteriores aunque se mantienen presentes en cerebro adulto (Pierre y Pellerin, 2005).

1.3 Síntesis de ATP

La oxidación de la glucosa se lleva a cabo en el citoplasma a través de una serie de reacciones que integran la vía metabólica conocida como glucólisis. La oxidación de una molécula de glucosa por esta vía genera dos moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato.

El piruvato es transportado a la mitocondria para ser oxidado a acetilcoenzima A (AcetilCoA), la cual es metabolizada a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a dióxido de carbono y equivalentes reductores (NADH, FADH₂) por cada molécula de piruvato dentro de la matriz mitocondrial. Los equivalentes reductores son transportados a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial generando el gradiente de protones necesario para la formación de ATP a partir de ADP, utilizando al oxígeno como aceptor final de electrones (Mitchell, 1966)

En total, una molécula de glucosa metabolizada a través de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa produce 30 o 32 moléculas de ATP.

Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es convertido a lactato, lo que además permite la regeneración del nicotinamida adenín dinucleótido (NAD⁺), 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 nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido

(NADPH) a través de la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato a ribulosa-5-fosfato, a través de dos reacciones limitantes 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. Si un alto poder reductor es requerido, es decir, cuando los niveles de NADPH disminuyen, se activa esta ruta metabólica para generar nuevos equivalentes reductores. De esta forma, la glucosa, principal substrato energético del cerebro, produce dos fuentes de energía: ATP y equivalentes reductores (Nelson y Cox, 2000).

La reacción global de la glucólisis es la siguiente:



2. Hipoglucemia

En los años 30's la hipoglucemia fue introducida por Manfred Sakel como un tratamiento en la psiquiatría (Sakel, 1937), en tanto que la insulina se utilizaba para tratar desórdenes como 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 (Baker 1938, Fazekas et al., 1951), mientras que un periodo mayor implicaba un coma irreversible. Los avances en el conocimiento de este fenómeno indican que esto se debe a la menor 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 (Auer et al., 1984a). En la actualidad han quedado en desuso los tratamientos hipoglucemiantes para tratar desórdenes psiquiátricos o de adicción a drogas.

2.1 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 sanguíneos de

glucosa (del griego *hypo-*, *glykys*, *haima*). En general, las causas más comunes son los tratamientos que incluyen insulina o sulfonilureas, los trastornos endócrinos, desórdenes hepáticos, fallas renales, desnutrición, trasplante de islotes de páncreas o insulinomas. En los neonatos, esta condición es más común, originando desórdenes neurológicos o incluso la muerte; además, también es frecuente en la niñez debido a desórdenes endócrinos, como la producción inadecuada de glucosa, o el incremento en su utilización. La hipoglucemia se presenta más comúnmente como un efecto adverso en el tratamiento de la diabetes, conocida como hipoglucemia iatrogénica, que se desarrolla cuando los enfermos exceden la dosis de insulina, y es más común en los pacientes que padecen diabetes tipo I y en estadios avanzados de los que padecen diabetes tipo II. La hipoglucemia iatrogénica resulta tanto del exceso en la dosis de insulina como de la afectación en la respuesta contrarreguladora que corrige los niveles de glucosa sanguínea (Cyer, 2007).

En condiciones fisiológicas, la concentración de la glucosa en el torrente sanguíneo es de 90-100 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 50 mg/dl o por debajo de este valor se considera un estado de hipoglucemia (Davidson, 2009).

Durante la hipoglucemia se activan mecanismos para contrarrestar la disminución en los niveles de glucosa. Cuando los niveles de glucosa están por debajo de 81 mg/dl cesa la secreción de insulina, mientras que a concentraciones por debajo de 68 mg/dl aumenta la secreción de epinefrina y glucagón. Sin embargo, si la concentración de glucosa sanguínea sigue disminuyendo y alcanza valores de 54 mg/dl se presenta la respuesta simpatoadrenal o autónoma, la cual es responsable de los síntomas autonómicos o neurogénicos como son el aumento del ritmo cardíaco, sudoración, debilidad, irritabilidad, ansiedad y temblores (Cryer, 2007). Los síntomas neurológicos o

neuroglucopénicos que resultan de la privación de glucosa cerebral se presentan casi a los mismos niveles de glucosa que los síntomas autonómicos, los cuales incluyen sensación de calor, debilidad, fatiga, dificultad para pensar, confusión, fallas en la visión y dolor de cabeza. La percepción de los síntomas neurogénicos dispara la respuesta conductual que lleva a la ingesta de alimentos y corrige el estado hipoglucémico (Cryer, 2007).

Sin embargo, en los pacientes que padecen diabetes tipo I tratados con administración de insulina, los niveles de ésta no disminuyen conforme los niveles de glucosa decrecen y la falla en la secreción tanto del glucagón como de la epinefrina causa que la respuesta contrarreguladora no se lleve a cabo adecuadamente (Cryer, 2006). La falla en la respuesta simpatoadrenal causa inadvertencia del episodio hipoglucémico. Se ha sugerido que episodios previos de hipoglucemia recurrente causan tanto fallas en la contrarregulación como la inadvertencia de un episodio hipoglucémico posterior (Cryer, 2006). En estos pacientes los rangos glucémicos en los que se presentan las respuestas simpatoadrenal y neurogénicas cambian y se presentan a concentraciones de glucosa más bajas ocasionando que la hipoglucemia pase inadvertida. La hipoglucemia precedente causa entonces un círculo vicioso de hipoglucemia recurrente así como deterioro posterior en la respuesta contrarreguladora (Cryer, 2003). Si esta respuesta falla y los niveles de glucosa continúan disminuyendo se presenta deterioro cognitivo, crisis epilépticas, coma (40 mg/dl, daño cerebral funcional) y, dependiendo de la duración del coma, muerte neuronal cuando los niveles de glucosa disminuyen por debajo de los 20 mg/dl (Cyer, 2007).

2.2 Hipoglucemia y daño neuronal

La hipoglucemia causa daño cerebral aun cuando la función cardíaca permanece intacta.

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 1) en el modelo murino (Auer, 2004).

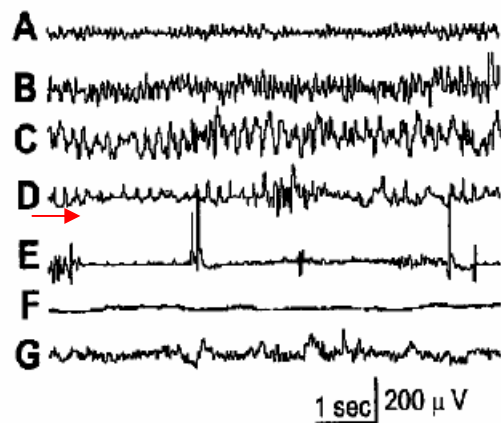


Figura 1. Cambios en el electroencefalograma (EEG) durante la hipoglucemia inducida por la administración de insulina. **A**, patrón normal del EEG, **B** administración de insulina, se muestra el EEG al inicio de la hipoglucemia: las ondas se hacen más lentas y de mayor amplitud; **C**, lo anterior se hace más evidentes, **D**, se observa actividad paroxística; (**B-D** transcurren 1.5 horas aproximadamente después de la administración de insulina) **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 (Suh et al., 2003).

La tasa metabólica del cerebro decrece cuando el flujo glucolítico disminuye durante 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 (Auer et al., 1984b). Dicho déficit da lugar a cambios en las concentraciones iónicas; durante los primeros minutos del periodo

isoeléctrico hay un aumento en la concentración de K^+ extracelular y Ca^{2+} intracelular, que después de unos minutos se normaliza parcialmente, para después volver a aumentar y disminuir, respectivamente. Esto se debe a la falla en el funcionamiento de la ATPasa de Na^+/K^+ dando lugar a la despolarización de la membrana, y a la liberación principalmente de aspartato así como de glutamato (Sandberg et al., 1986).

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 aumentando sus niveles intracelulares. El glutamato es utilizado como substrato en el ciclo de Krebs a través de su transformación a α -cetoglutarato. Por esta razón hay más aspartato que glutamato disponible para ser liberado (Auer, 2004).

El aumento en la concentración extracelular de aminoácidos excitadores, entre otras evidencias, sugiere que el mecanismo de daño neuronal en la hipoglucemia se debe a la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, fenómeno descrito desde hace algunas décadas y denominado excitotoxicidad (Sandberg et al., 1986, Wieloch, 1985). Sin embargo, también se ha sugerido que existe un componente en el daño originado por el estrés oxidativo (Patockova et al., 2003; Singh et al., 2004; Suh et al., 2007). Ambos mecanismos se explicarán más adelante, así como las evidencias que apoyan su participación en la muerte neuronal hipoglucémica.

3. 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, de la potenciación a largo plazo, de la coordinación motora, de las emociones, de procesos cognitivos como la formación de la memoria y la plasticidad, entre otros (Salt y Herrling, 1991; Hassel y Dingle, 2006).

Un gran número de neuronas en el SNC utilizan al glutamato como neurotransmisor. Se ha sugerido que aproximadamente el 80-90% de la sinapsis excitadoras son glutamatérgicas aunque hay variaciones en esta estimación (Braitenberg y Schuz, 1998). 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 (Attwell y Laughlin, 2001).

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 (Yudkoff et al., 1993; Palmada y Centelles, 1998). Además, forma parte de proteínas y de péptidos como el glutatión, que es parte de las defensas antioxidantes del cerebro (Dringen, 2000).

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 (Mason et al., 1992).

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 de la membrana vesicular 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.

3.1 Receptores al glutamato

De manera general, los receptores a glutamato se dividen en receptores ionotrópicos (iGluRs) y metabotrópicos (mGluRs). Los iGluRs son canales iónicos que al unir glutamato cambian su conformación abriéndose y permitiendo la entrada de ciertos iones al medio intracelular. Los mGluRs no permiten el flujo de iones, son receptores activados por ligando y acoplados a proteínas G, cuya función es desencadenar vías de transducción de segundos mensajeros (Tabla 1).

Receptores a Glutamato					
Receptores ionotrópicos iGluRs			Receptores metabotrópicos mGluRs		
NMDA	no-NMDA		Grupo I	Grupo II	Grupo III
	AMPA	KA			
NR1	GluR1	GluR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
	GluR2	GluR6	mGluR5	mGluR3	mGluR6
NR2A	GluR3	GluR7			mGluR7
NR2B	GluR4				mGluR8
NR2C		KA1			
NR2D		KA2			
NR3A					
NR3B					
Ca ²⁺			PLC		AC
Na ⁺	Na ⁺ (Ca ²⁺)		IP3 Ca ²⁺	↓cAMP	↓cAMP

Tabla 1. Receptores a glutamato. Los receptores a glutamato se dividen en ionotrópicos (iGluRs) y metabotrópicos (mGluRs) y están formados por diferentes subunidades. Los iGluRs son canales iónicos que permiten el paso de ciertos iones, mientras que los mGluRs son receptores acoplados a proteínas G que activan vías señalización a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC) o inhibición (adenilato ciclasa (AC)).

Receptores ionotrópicos

En los receptores ionotrópicos, el sitio de unión al agonista y el canal iónico asociado forman parte del mismo complejo macromolecular. La unión del agonista genera un

cambio conformacional en el receptor lo cual aumenta la probabilidad de apertura del canal. Los receptores de tipo ionotrópico se dividen en dos: los de tipo NMDA (RNMDA), denominados de este modo porque su agonista exógeno es el N-metil-D-aspartato (NMDA); 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 (KA). Estos receptores se denominan no-NMDA porque comparten ciertas características que los hacen muy diferentes a los RNMDA (Lodge, 1997).

La afinidad por el glutamato varía dependiendo del tipo de receptor. La EC_{50} del glutamato para el receptor NMDA es de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/l}$ mientras que para el receptor AMPA es de 400 $\mu\text{mol/l}$ (Dingledine et al., 1999). Algunas moléculas endógenas también activan al receptor NMDA, algunas de ellas al igual que el glutamato son aminoácidos como el aspartato y el homocisteato.

El receptor canal activado por ligando es funcional cuando se ensamblan las diferentes subunidades en tetrámeros. El ensamblaje de diferentes combinaciones de subunidades genera receptores con características funcionales diferentes.

Receptores NMDA

El receptor NMDA es un tetrámero transmembranal que forma un poro permeable principalmente a Ca^{2+} , así como a Na^+ y K^+ . Responde más tardíamente al glutamato que los receptores no-NMDA y contribuye con el componente lento de la corriente. La disponibilidad de NMDA y diferentes antagonistas específicos de este receptor, permitió su caracterización, y de hecho fue el primero en ser aceptado como receptor glutamatérgico (Lodge, 1997).

El RNMDA es uno de los receptores a neurotransmisores más fuertemente regulado ya que presenta mínimo 6 sitios de unión a distintos ligandos endógenos que influyen directamente en la probabilidad de apertura del canal. Entre estos sitios se encuentran los de unión a los dos diferentes agonistas, glutamato y glicina, el sitio de unión a

poliaminas, y diferentes sitios de reconocimiento para Mg^{2+} , Zn^{2+} y H^+ que actúan inhibiendo el flujo de iones a través del receptor. El estado redox del receptor también afecta su respuesta. Uno de los tres pares de residuos de cisteína debe estar reducido (lo cual aumenta las corrientes mediadas por este receptor) u oxidado formando puentes disulfuro (lo que reduce las corrientes) (Hassel y Dingledine, 2006).

Este receptor es el único que requiere la unión simultánea de los dos diferentes agonistas, glicina y glutamato, para su activación. El sitio de unión a glicina en el RNMDA es farmacológicamente distinto del sitio de unión al receptor de glicina, en tanto que no se bloquea por estriocina y tampoco es activado por β -alanina.

El glutamato y la glicina actúan en conjunto para abrir el canal, sin embargo, el Mg^{2+} juega un papel determinante, ya que se une en un sitio en la boca del canal y su remoción es necesaria para la apertura de éste, lo cual depende del voltaje (Nowak et al., 1984). Otros bloqueadores del canal dependientes de voltaje son el antagonista no competitivo, el maleato de dizocilpina (MK-801), la ketamina y la fenciclidina (Lodge, 1997). Otro inhibidor alostérico endógeno importante del RNMDA es el H^+ . Los protones reducen la frecuencia de apertura del canal en los receptores que contienen la subunidad NR2B, a un pH de 6 la activación del receptor se suprime (Traynelis et al., 1995).

Además de los mecanismos de regulación anteriores, un mecanismo de inactivación dependiente de Ca^{2+} se lleva a cabo por la calmodulina. La entrada de Ca^{2+} activa a la calmodulina, que a su vez interactúa con la subunidad NR1 lo cual causa la inactivación del receptor ya que se reducen el tiempo y la frecuencia de apertura del canal (Ehlers et al., 1996). La fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, calcineurina, también inactiva a este receptor (Tong et al., 1995), lo cual sugiere que ambas reacciones son necesarias en la modulación del receptor, su desfosforilación seguida de la unión del complejo Ca^{2+} /calmodulina.

Los RNMDA funcionan como heterotetrámeros. A la fecha se han identificado 7 subunidades codificadas por diferentes genes: una NR1, cuatro NR2 (A-D) y dos NR3 (A y B) (Kew y Kemp, 2005). Los diferentes mRNA que codifican para las subunidades del RNMDA están distribuidos diferencialmente en el SNC al igual que los mRNAs de otros receptores a glutamato. El mRNA que codifica para la subunidad NR1 se encuentra prácticamente en cualquier área del SNC, mientras que el mRNA de la subunidad NR2A está distribuido en todo el cerebro anterior y el cerebelo. La expresión más alta de la subunidad NR2B se ha localizado en el cerebro anterior mientras que el mRNA de la subunidad NR2C se localiza en cerebelo donde el mensajero de la subunidad NR2B no se ha detectado. La expresión de la subunidad NR2D al parecer es complementaria a la de la NR2A ya que su expresión es alta en el cerebro medio y en el cerebro posterior y es baja en el cerebro anterior (Monyer et al., 1992; 1994). NR3A se expresa en la médula espinal y en la corteza (Wong et al., 2002), en tanto que NR3B se localiza en las neuronas motoras de la médula espinal, en el puente y en la médula oblonga (Matsuda et al., 2002).

Los heterotetrámeros están compuestos por la combinación de las subunidades NR1, NR2 y NR3. Para que un receptor sea funcional se requiere contenga la subunidad NR1 donde se encuentra el sitio de unión a glicina y una o dos subunidades NR2 donde está el sitio de unión al glutamato. (Nishi, et al., 2001; Kew y Kemp, 2005).

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 (Traynelis et al., 1995).

Receptores no-NMDA

El estudio de la complejidad farmacológica de los receptores no-NMDA se retrasó con respecto al de los NMDA debido a la falta de agonistas específicos. Los receptores

AMPA y kainato se agrupan como receptores no-NMDA para diferenciarlos de los NMDA, sin embargo poseen características farmacológicas distintas entre sí (Lodge, 1997).

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 RNMDA (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1994).

Los receptores AMPA funcionan como tetrámeros formados por cuatro subunidades diferentes: GluR1-GluR4 (Kew y Kemp, 2005). La subunidad que determina la permeabilidad del receptor al calcio es la GluR2. Un residuo de glutamina se localiza en la misma posición en las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4, sin embargo, en la subunidad GluR2 se localiza una arginina por lo que se denomina sitio Q/R. La carga positiva de la arginina repele al Ca^{2+} , por lo que los receptores que no poseen la subunidad GluR2 no son permeables a Ca^{2+} . La secuencia en el gen de esta subunidad tiene un codón de glutamina en el sitio Q/R, sin embargo éste es substituido por uno que codifica para arginina, por un proceso de edición del mRNA por acción de la adenosina deaminasa. La deaminación de la adenosina hace que el codón CAG se substituya por CIG y se traduzca como arginina en vez de glutamina (Seeburg y Hartner, 2003). De qué que la subunidad GluR2 al estar editada impide el paso de los iones Ca^{2+} . La mayor parte de ésta subunidad está editada por lo que naturalmente los receptores a AMPA no son permeables a este catión, pero cuando ésta está ausente, los receptores sí presentan permeabilidad al Ca^{2+} .

Las subunidades GluR2 y GluR4 presentan variantes en el extremo C-terminal, que son diferentes en longitud, y determinan la interacción con proteínas intracelulares (Dingledine et al., 1999).

Los receptores de tipo kainato están formados por 4 subunidades de una familia de cinco miembros GluR5-7 y KA-1 y KA2, formando tetrámeros en combinación heterómera u homómera 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 (Kew y Kemp, 2005). Las subunidades GluR5, 6 y 7 en cambio, forman receptores funcionales de composición homomérica que se combinan con KA1 y KA2 formando receptores heteroméricos con distintas propiedades farmacológicas (Alt et al., 2004). 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 (Kew y Kemp, 2005). A la fecha se han identificado ocho miembros de esta familia: mGluR1-8, agrupados en tres grupos de acuerdo a la identidad en su secuencia, segundo mensajero que producen y farmacología (Conn, 2003). Estos receptores son proteínas de un tamaño heterogéneo que va desde los 854 hasta los 1179 aminoácidos (Waxham, 2003). El receptor posee siete dominios transmembranales y un extremo N-terminal extracelular largo. 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. Los miembros de cada clase comparten alrededor de 70% de identidad en su secuencia, con alrededor de 45% de identidad entre clases (Conn y Pin, 1997).

El glutamato activa a todas las variantes recombinantes de los mGluRs con afinidades distintas y a la fecha ya se han identificado antagonistas selectivos para cada uno de los

grupos. Los receptores del grupo I estimulan 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, e inositol trisfosfato (IP3), que libera Ca^{2+} al activar a su receptor localizado en el retículo endoplásmico. La habilidad para incrementar los niveles de calcio intracelular varía entre los miembros de la clase y sus variantes, lo cual podría deberse a la afinidad que cada receptor tiene por la proteína G (Hassel y Dingledine, 2006).

La activación de los grupos II y III resulta en la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), que inhibe la síntesis de cAMP. Este efecto es sensible al bloqueo por toxina pertussis, lo que sugiere que la proteína G involucrada pertenece a la familia G_i (Nestler y Duman, 2006).

Los receptores metabotrópicos generalmente tienen un papel regulador de la excitabilidad neuronal. Los mGluRs localizados en la membrana postsináptica modulan una amplia variedad de canales iónicos activados por ligando o dependientes de voltaje (Conn y Pinn, 1997). La activación de los tres grupos de mGluRs inhibe los CCSV de tipo L, y la de los grupos II y III, inhiben los canales de Ca^{2+} de tipo N. La activación de estos receptores cierra canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y de voltaje en células del hipocampo y de la corteza, lo cual ocasiona una despolarización lenta y en consecuencia excitación de la neurona (Anwyl, 1999).

La activación presináptica de los receptores mGluRs puede llevar a la inhibición presináptica, ya que bloquea tanto la transmisión excitadora glutamatérgica como la inhibidora GABAérgica (Takahashi et al., 1996; Goudet et al., 2009).

El grupo I se localiza principalmente en la región postsináptica somato-dendrítica (Kim et al., 2008), mientras que los grupos II y III se expresan primordialmente en la región presináptica, en las terminales axonales donde regulan la liberación del neurotransmisor (Shigemoto y Mizuno, 2000).

3.2 Transporte de glutamato

Después de haber sido liberado y de activar a sus receptores, el glutamato es removido del espacio sináptico por medio de los transportadores de los aminoácidos excitadores lo cual mantiene 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. El influjo de glutamato está acoplado con el cotransporte de dos iones Na^+ , un protón y el contratransporte de un ion K^+ (Boudker et al., 2007).

El transportador GLT-1 se localiza tanto en astrocitos como en neuronas y es el principal transportador del cerebro anterior (Danbolt et al., 1992; Pines et al., 1992; Furuta et al., 1997). El transportador GLAST-1 se localiza principalmente en la membrana plasmática de astrocitos asociados con contactos sinápticos excitadores y está presente abundantemente en la glía de Bergman en el cerebelo (Danbolt et al. 1992; Shashidharam y Plaitakis, 1993). El transportador EAAC1 se expresa en todas las regiones del cerebro y se localiza en la región presináptica de las terminales nerviosas. Se ha localizado en 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 (Danbolt, 2001; Beart y O'Shea, 2007).

El funcionamiento de los transportadores depende del gradiente electroquímico del sodio generado por la ATPasa de Na^+/K^+ . Éstos toman del espacio extracelular una molécula de glutamato junto con 2 iones Na^+ y un H^+ introduciéndolos a la célula, mientras que extruyen un ión K^+ (Boudker et al., 2007).

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 impidiendo la disminución de α -cetoglutarato (Figura 3).

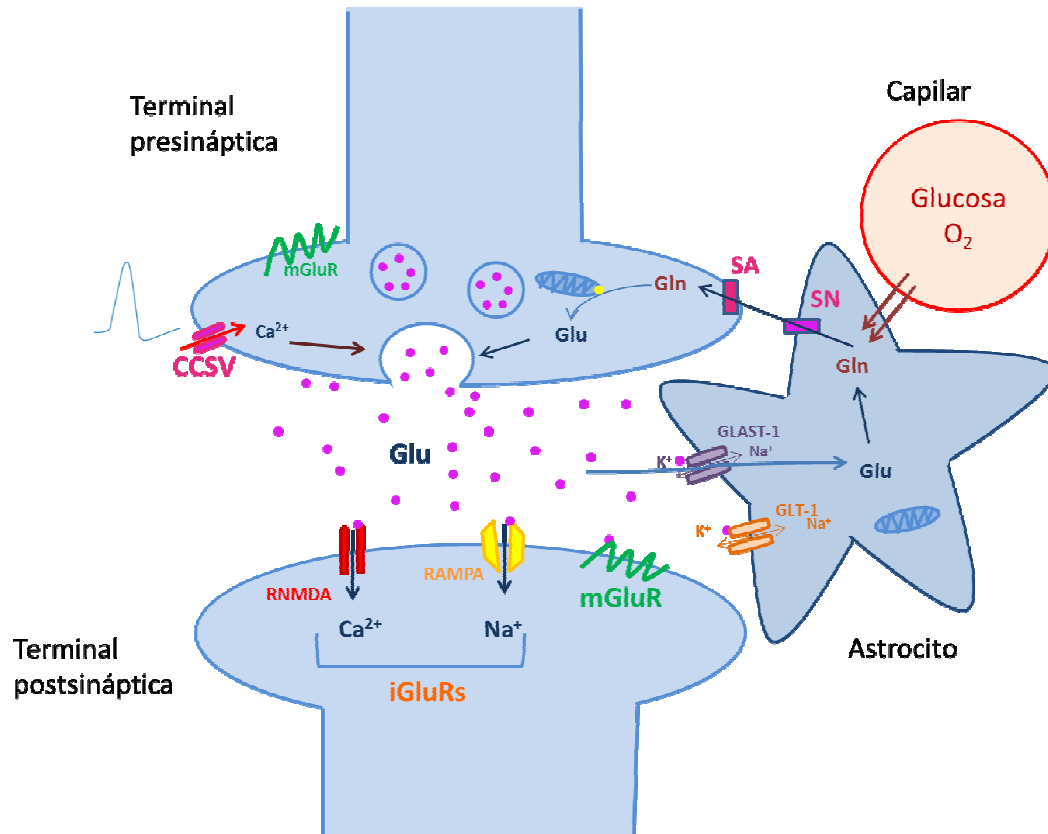


Figura 3. Esquema general de la transmisión glutamatergica. El glutamato es sintetizado en la terminal presináptica y posteriormente almacenado en vesículas se libera debido a la entrada de calcio a través de los CCSV activados por la despolarización de la membrana. Esto permite la fusión de las vesículas 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.

3.3 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 (Hayashi, 1954). En 1957, Lucas y Newhouse encontraron que la inyección sistémica intraperitoneal de glutamato en ratas inmaduras producía degeneración en la retina (Lucas y Newhouse, 1957). 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 (Curtis, 1959). 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 (Curtis et al., 1959). Años más tarde, en 1969, 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 (Olney, 1969). 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 últimos años 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 (Lipton y Rosenberg, 1994).

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 RNMDA es el factor determinante de la muerte excitotóxica (Choi, 1987; Choi et al., 1987, Choi et al., 1988). La concentración de calcio en el medio intracelular es mucho menor (del orden nanomolar) que en el extracelular (1-2 mM) 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 la muerte neuronal. Además de la entrada de calcio por los RNMDA, 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 (Berridge et al., 1998). El calcio también puede ser liberado del retículo endoplásmico a través de la estimulación de los receptores a IP_3 después de la activación de la PLC por las proteínas G o por los receptores a rianodina estimulados por calcio (Berridge, 1993; Hamilton, 2005).

Cuando el estado energético neuronal es deficiente, el glutamato causa daño a las neuronas aún a 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 RNMDA de una manera dependiente de voltaje, y a la activación de este receptor, con la subsecuente entrada de calcio. Este fenómeno se conoce como excitotoxicidad secundaria (Novelli et al., 1988). El daño excitotóxico está relacionado con el estrés oxidativo inducido por el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo cual se discutirán más adelante.

4. Estrés oxidativo

El oxígeno es un elemento químico con una configuración $1s^2 2s^2 2p^4$ que a temperatura y presión estándar se encuentra como una molécula diatómica de fórmula O_2 . 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 de oxígeno (ERO), las cuales se generan también durante otras reacciones bioquímicas y funciones celulares, por lo que existen mecanismos para contrarrestar su producción y evitar el daño a biomoléculas, de tal forma que su generación se equilibre con su remoción. Cuando existe un desequilibrio entre la generación y la 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 ERO producen daño a lípidos, proteínas y 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 (Halliwell, 2006). Otras de las causas de susceptibilidad del cerebro al daño oxidativo son:

- 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-hidroxinonenal, un aldehído citotóxico que puede unirse a proteínas y afectar su función, como es el caso de los transportadores de glutamato, proteínas del citoesqueleto (Mark et al. 1997; Ong et al. 2000b) y enzimas como la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Sheu and Blass 1999).
- Las defensas antioxidantes son menos abundantes en comparación con otros tejidos (Halliwell, 2001).

- 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 (Halliwell, 2001).
- 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 (Halliwell, 2006).
- La 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 ($O_2^{\bullet-}$) (Spencer et al., 1998).

Las ERO reaccionan con 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.

4.1 Especies reactivas y radicales libres

Los electrones se encuentran distribuidos en orbitales en los átomos y moléculas. Cada orbital puede contener un máximo de dos electrones con spins opuestos. Un radical libre se define como cualquier especie que contiene uno o más electrones desapareados y es capaz de existir de manera independiente (Halliwell y Gutteridge, 1999). La presencia de un electrón desapareado en ocasiones hace a los radicales libres altamente reactivos aunque su reactividad química puede variar. Los radicales libres generalmente son moléculas de vida corta debido a su reactividad ya que actúan removiendo un electrón

de otro compuesto, oxidándolo, o donando uno de sus electrones dando lugar a que el compuesto aceptor se vuelva más reactivo. 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 y radicales libres.

Especies reactivas (ER) es un término amplio que abarca tanto a las ERO radicales y no radicales, como a las especies reactivas de nitrógeno (ERN) que son moléculas reactivas que contienen nitrógeno aunque en sentido estricto también son ERO ya que contienen oxígeno, y pueden ser radicales y no radicales (Tabla 1).

Tabla 1. Especies reactivas radicales y no radicales

Radicales libres	No radicales
<p>ERO</p> <p>Superóxido $O_2^{\bullet-}$</p> <p>Hidroxilo OH^{\bullet}</p> <p>Hidroperoxil HO_2^{\bullet} (superóxido protonado)</p> <p>Carbonato $CO_3^{\bullet-}$</p> <p>Peroxil RO_2^{\bullet}</p> <p>Dióxido de carbono radical $CO_2^{\bullet-}$</p> <p>Singulete $\uparrow O_2$ ($1\Sigma g$)</p> <p>Alcoxil RO^{\bullet}</p>	<p>ERO</p> <p>Peróxido de hidrógeno H_2O_2</p> <p>Peróxidos orgánicos $ROOH$</p> <p>Ácido hipobromoso $HOBr$</p> <p>Ácido hipocloroso $HOCl$</p>
<p>ERN</p> <p>Óxido nítrico NO^{\bullet}</p> <p>Dióxido de nitrógeno NO_2^{\bullet}</p> <p>Nitrato NO_3^{\bullet}</p>	<p>ERN</p> <p>Peroxinitrito $ONOO^-$</p> <p>Peroxinitrato O_2NOO^-</p> <p>Ácido peroxinitroso $ONOOH$</p> <p>Ácido nitroso HNO_2</p> <p>Catión nitrosil NO^+</p> <p>Anión nitrosil NO^-</p>

Las ER más importantes en el contexto celular son el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico.

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.

Por ejemplo, en la cadena transportadora de electrones. Cuando los electrones pasan a través de los complejos pueden fugarse y unirse al O₂, formando superóxido debido a que el oxígeno acepta un electrón a la vez (Turrens, 2003). 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 (Sawyer, 1981).

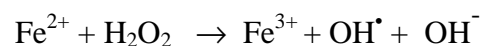
Otra fuente de O₂^{•-} es la oxidación de algunas moléculas no radicales como la epinefrina, la dopamina, la 6-hidroxi-dopamina y moléculas que contienen grupos tiol como la cisteína, las cuales reaccionan lentamente con el O₂ para formar O₂^{•-} (Spencer et al., 1998).

El O₂^{•-} también se forma durante la conversión de la xantina a ácido úrico catalizado por la enzima xantina oxidasa (Hille y Nishino, 1995), activada por la entrada de calcio (Dykens et al., 1987) subsecuente a la activación de los RNMDA (Coyle y Puttfarcken, 1993).

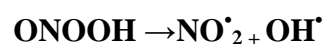
Radical hidroxilo

El radical hidroxilo OH[•], uno de los radicales del oxígeno más agresivos, reacciona casi con cualquier biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 1999). Usualmente se produce mediante tres mecanismos:

- La fisión homolítica del agua por la radiación ionizante (von Sonntag, 1987).
- La ruptura del H₂O₂ en presencia de metales por la reacción de Fenton (Sutton y Winterbourn, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1992):



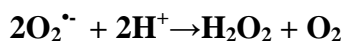
- Mediante la fisión homolítica del ácido peroxinitroso, una ERN no radical pero muy reactivo (Halliwell, 2006):



Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es una ERO no radical, de fórmula H_2O_2 presente en numerosos sistemas biológicos y que se produce mediante diferentes reacciones enzimáticas, como la catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), las oxidasas de D-aminoácidos, las amino oxidasas, las glucolato oxidasas y en las reacciones redox cíclicas de ciertos compuestos como las catecolaminas (Halliwell y Gutteridge, 1999):

SOD



Óxido nítrico

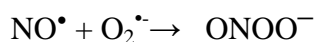
El óxido nítrico es un radical sin carga, hidrofóbico, por lo que atraviesa fácilmente las membranas celulares (Beckman y Koppenol, 1996). El óxido nítrico actúa como vasodilatador, neurotransmisor y segundo mensajero (Stamler, 1994; Halliwell y Gutteridge, 1999).

Se forma a partir de L-arginina a través de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Moncada y Higgs, 1995):



La enzima que produce al óxido nítrico puede ser activada por el aumento en la concentración intracelular de calcio, de una manera dependiente del complejo calcio-calmodulina (Alderton et al., 2001).

Por otro lado el óxido nítrico reacciona con el radical superóxido para formar peroxinitrito:

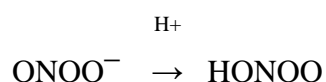


Además, el óxido nítrico se une a la citocromo c oxidasa reduciendo su afinidad por el O_2 lo cual afecta el flujo de electrones de la mitocondria y la síntesis de ATP (Poderoso et al., 1996).

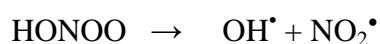
Peroxinitrito

El peroxinitrito se forma rápidamente a través de la interacción entre el $O_2^{\bullet-}$ 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 (Pryor y Squadrito, 1995).

La protonación del peroxinitrito conduce a la formación del ácido peroxinitroso (Alvarez y Radi, 2003):



El ácido peroxinitroso se puede descomponer en radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno:



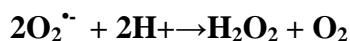
El radical dióxido de nitrógeno es un poderoso agente nitrante y promueve procesos de lipoperoxidación (Augusto et al., 2002).

4.2 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 SOD es considerada un mecanismo de defensa antioxidante debido a que dismuta al superóxido agregándole dos protones (Fridovich, 1989) en la reacción:



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

superóxido extracelular EC-SOD, la cual es liberada al espacio extracelular y se expresa principalmente en el músculo liso vascular (Maier y Pak, 2002).

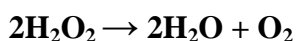
La SOD se expresa en el sistema nervioso y debido a que en la reacción que cataliza se genera otra especie reactiva no radical, el peróxido de hidrógeno, debe actuar en conjunto con enzimas que catalicen la transformación del H_2O_2 a moléculas menos reactivas (Halliwell, 2006), como las peroxidasas, 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 (Beal y Shults, 2003; Hart et al., 2005).

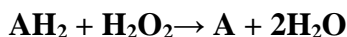
Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima presente en los peroxisomas de las células de mamíferos (Chance et al., 1979), que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno en función de la concentración de H_2O_2 . Si ésta es alta, se lleva a cabo la reacción anterior, pero si es baja, en presencia de un donador apropiado de hidrógeno como el metanol, el etanol, el fenol u otros, la catalasa remueve el H_2O_2 oxidando su sustrato (Chance et al., 1979):

CAT



CAT

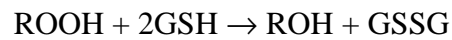
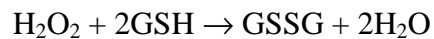


Esta enzima actúa junto con la SOD, pero su contenido en el cerebro es muy bajo comparado con otros tejidos (Halliwell, 2001).

Glutatión Peroxidasa (GPx)

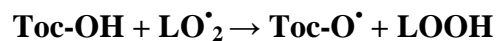
La GPx es el principal mecanismo de destoxificación de peróxidos en el cerebro (Brigelius-Flohe, 1999). Se localiza en el citoplasma y la matriz mitocondrial. Esta

enzima contiene selenio en su sitio catalítico (Maiorino et al., 1995). Descompone los peróxidos mediante las siguientes reacciones, 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 (Parks and Traber 2000). 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:



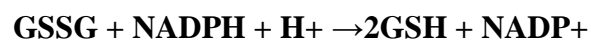
En el cerebro, el α -tocoferol parece ser el tocoferol más importante o tal vez el único (Roy et al., 2002; Hayton and Muller 2004) y su deficiencia afecta más al SNC que al periférico, por lo que sus niveles en el cerebro parecen estar altamente regulados (Halliwell, 2006).

Glutatión (GSH)

El glutatión es el tripéptido γ -L-glutamyl-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, destoxificación de xenobióticos y mantenimiento del potencial redox de los tioles en las células, conservando a los grupos sulfhidrilos en su forma reducida (Dringen, 2000). Se encuentra a una concentración de 1 a 3 mM en el cerebro

(Cooper, 1997). Reacciona directamente con radicales como el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico (Saez et al., 1990; Clancy et al., 1994; Winterbourn y Metodiewa, 1994; Singh et al., 1996).

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 flavín adenín dinucleótido (FAD) y que además requieren de NADPH, mediante la reacción (Halliwell y Gutteridge, 1999):



5. Señalización por Ca^{2+} y estrés oxidativo

El calcio puede actuar como una molécula señalizadora. Los procesos de señalización regulados por Ca^{2+} son procesos biofísicos y moleculares que relacionan al estímulo externo con la expresión de respuestas intracelulares mediante el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Generalmente el estímulo externo es una hormona, un factor de crecimiento o un neurotransmisor (Bird y Putney, 2006). En las células excitables, el estímulo inicial puede causar cambios en el potencial de membrana, lo que a su vez, al modificar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, activa vías de señalización. Varios estímulos fisiológicos aumentan transitoriamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sin embargo, en condiciones patológicas, este aumento es más sostenido y pronunciado (Leist y Nicotera, 1999).

El papel del calcio como molécula señalizadora requiere de la existencia de un gradiente de concentración extra e intracelular. Este gradiente de concentración se debe a que la concentración extracelular varía entre 1.3 y 1.8 mM en tanto que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es cuatro órdenes de magnitud menor, alrededor de 100 nM (Carafoli, 1997).

La regulación en la $[Ca^{2+}]_i$ es un proceso muy controlado ya que un aumento pronunciado puede causar daño celular al activar enzimas hidrolíticas, originando gasto de energía debido a que los sistemas de extrusión y almacenamiento de este catión son dependientes de ATP, degradación del citoesqueleto y muerte celular (Leist y Nicotera, 1999).

.

5.1 Regulación del calcio intracelular

En el medio intracelular, el Ca^{2+} está compartimentalizado dentro de varias pozas. En estos sitios localmente restringidos, el Ca^{2+} puede encontrarse ya sea libre o unido a proteínas, como parte de sus funciones efectoras (por ejemplo la calmodulina o la calbindina) o almacenado (calbindina) (Carafoli, 1991; Mattson et al., 1991). El Ca^{2+} intracelular es secuestrado en organelos por procesos que consumen energía. El sistema de captura con mayor afinidad se encuentra en el retículo endoplásmico. A concentraciones de calcio mayores, la captura originada por el potencial en la mitocondria también puede activarse (Brookes et al., 2004).

Además del amortiguamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ por organelos, éste también puede ser removido a través de antiportadores de H^+ o Na^+ (White y Reynolds, 1995) y por la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP localizada en la membrana plasmática, lo que origina el consumo de ATP (Carafoli, 2002).

En las neuronas, el influjo de Ca^{2+} del medio extracelular ocurre principalmente a través de canales de CCSV, los cuales se abren cuando la membrana plasmática neuronal se despolariza. Existen varios tipos de CCSV, de éstos, los N y P están involucrados en la entrada de Ca^{2+} de la presinápsis, necesaria para la fusión vesicular y la liberación del neurotransmisor, en tanto que los de tipo L están involucrados en la despolarización postsináptica (Miljanich y Ramachandran, 1995).

Otra vía de entrada de Ca^{2+} importante en el SNC es a través de los RNMDA. Los RNMDA, canales de calcio activados por ligando, son probablemente los más importantes en la muerte neuronal (Rottman y Olney, 1995; Choi, 1988).

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también puede elevarse debido a la inhibición de su extrusión o bien por la liberación de pozas intracelulares. En el retículo endoplásmico, esta liberación está dada por dos tipos de receptores, los receptores a IP_3 (Berridge, 1993) y los receptores a rianodina, (Hamilton, 2005) por lo que la liberación de Ca^{2+} del retículo puede deberse a la estimulación de receptores que no están ligados al Ca^{2+} , por ejemplo los mGluRs (Fisher et al., 1987, (Kostyuka y Verkhratskya, 1994). La mitocondria también puede liberar el Ca^{2+} que almacena cuando la membrana mitocondrial se despolariza (Brookers et al., 2004).

El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no necesariamente origina muerte neuronal. Al parecer, el influjo de Ca^{2+} a través de CCSV es mejor tolerado que cuando ocurre a través de los RNMDA (Leist y Nicotera, 1999).

A diferencia del exceso de Na^+ que puede dañar a las células por efecto osmótico directo, el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ probablemente no origina daño por sí mismo, pero sí las vías que se activan río abajo. Algunas de estas vías son el resultado de una concentración de Ca^{2+} elevada que se sostiene, en tanto que otras sólo requieren de un aumento transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como disparador de la señal (Leist y Nicotera, 1999).

5.2 Vías de producción de ER activadas por Ca^{2+}

El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa varias enzimas que producen especies reactivas.

Óxido nítrico sintasa

La sintasa de óxido nítrico (NOS) es una enzima relacionada con el citocromo P450, y cataliza la conversión de arginina y oxígeno en citrulina y óxido nítrico. Requiere NADPH, FMN, FAD, tetrahidrobiopterina y un grupo hemo Fe^{3+} para llevar a cabo su

función. En el cerebro existen diferentes isoenzimas de esta enzima. Dos isoformas se expresan constitutivamente en las neuronas, la NOS neuronal (nNOS) y la eNOS o endotelial. Estas isoformas se activan de una manera dependiente del complejo calcio/calmodulina que se forma cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_i$. En cambio, la NOS inducible, presente en las células gliales, se activa por estímulos tales como las citocinas y funciona a concentraciones basales de Ca^{2+} (Murphy, 2000).

La activación de la nNOS inducida por la entrada de Ca^{2+} a través de los RNMDA se ha implicado en el daño excitotóxico en cultivos de neuronas corticales (Dawson et al., 1991) y en la isquemia (Huang et al., 1993). El posible mediador citotóxico terminal parece ser el peroxinitrito que se forma cuando el anión superóxido reacciona con el óxido nítrico (Dawson y Dawson, 2004).

Fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de Ca²⁺ (cPLA₂)

La fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio (cPLA₂) es una lipasa que remueve el ácido graso de la posición 2n de los glicerofosfolípidos liberando un ácido graso y un lisofosfolípido.

La cPLA₂ está involucrada en la neurotoxicidad. Su activación mediada por calcio origina la liberación del ácido araquidónico y ácidos grasos poliinsaturados que son posteriormente metabolizados por lipooxigenasas y ciclooxigenasas con la producción simultánea de ER, O₂^{•-} y OH[•] (Nanda et al., 2007). Además, la activación de la cPLA₂ genera lisofosfátidos que alteran la estructura de las membranas, lo cual puede facilitar el influjo de Ca^{2+} y su liberación de pozas intracelulares (Traystman et al., 1991). En neuronas, el influjo de Ca^{2+} a través de los RNMDA y la activación de la cPLA₂ están relacionados (Dumuis et al., 1988; 1993). La liberación del ácido araquidónico posterior a la activación de la cPLA₂ puede inhibir la recaptura de glutamato tanto en neuronas como en células gliales y puede por tanto prolongar la excitotoxicidad (Volterra et al., 1992).

Xantina oxidasa

La enzima xantina deshidrogenasa se convierte a xantina oxidasa (XaO) por proteólisis dependiente de Ca^{2+} y por oxidación de sus grupos $-\text{SH}$, causando la oxidación de la hipoxantina acumulada a xantina en condiciones de disminución de ATP, produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno (McCord, 1985; Hille y Nishino, 1995).

En condiciones de isquemia cerebral se ha observado la participación de esta enzima en la generación de ER durante la reoxigenación (Lin y Phillips, 1991; Abramov et al., 2007).

NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa (NOX) es una enzima multimérica que produce anión superóxido reduciendo al oxígeno molecular. La activación de varias isoformas de esta enzima depende de la translocación a la membrana plasmática de una de las subunidades que la componen, lo cual ocurre después de su fosforilación por proteína cinasas como la proteína cinasa C (PKC). La PKC es activada por Ca^{2+} , por lo que la activación de la NOX depende indirectamente y en parte del Ca^{2+} (Kishida et al., 2005; Shelat et al., 2008; Brennan et al., 2009).

Mitocondria

La mitocondria juega un papel dual en la toxicidad del Ca^{2+} . Por una parte reduce su aumento en el citoplasma secuestrando este ion, en tanto que al sobrecargarse de Ca^{2+} y después de la pérdida de su potencial de membrana, puede liberarlo y generar ER. Además, cuando este organelo está comprometido, no sólo participa pasivamente en la citotoxicidad, dado que ya no provee a la célula del ATP suficiente, sino que también genera señales involucradas en la ejecución de la apoptosis (Lizard et al., 1995; Liu et al., 1996).

El Ca^{2+} se secuestra en la mitocondria principalmente por un uniportador de Ca^{2+} o por un antiportador de $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ bajo condiciones de sobrecarga de Na^+ . El uniportador

funciona por el potencial de membrana y posee una gran capacidad, pero su afinidad es relativamente baja. El nivel más bajo al cual la mitocondria en el cerebro regula la $[Ca^{2+}]_i$ es 300 nM en presencia de espermina y puede requerir incluso concentraciones mayores de Ca^{2+} (1 μ M) bajo condiciones desfavorables. Así, se ha sugerido que el Ca^{2+} se importa a la mitocondria sólo durante condiciones de estimulación prolongada y sobrecarga, o cuando se crean altas concentraciones de Ca^{2+} transitorias en sitios cercanos a la mitocondria (Kostyuka y Verkhratskya, 1994).

Se han postulado varios mecanismos por los cuales el Ca^{2+} puede ser liberado de la mitocondria. La extrusión del Ca^{2+} es un proceso que requiere energía y está relacionado con el intercambio de dos H^+ . La liberación de Ca^{2+} de la mitocondria se estimula por el estrés oxidativo. Tal aumento en la liberación de Ca^{2+} puede originar un “ciclo del Ca^{2+} ”, es decir, la captura y liberación continua de Ca^{2+} por la mitocondria conllevan a la pérdida del potencial de membrana y a la falla de la mitocondria (Brookes et al., 2004).

La interacción entre el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y las ROS pueden generar un círculo vicioso, dado que la mitocondria, al tratar de compensar las consecuencias de la activación de los RNMDA y la captura de Ca^{2+} , aumenta la producción de ER y la extrusión de Ca^{2+} , dañando aún más a la cadena transportadora de electrones que ya se encuentra desacoplada (Dykens, 1994; Dugan et al., 1995; Reynolds y Hasting, 1995).

Otro mecanismo de liberación de Ca^{2+} de la mitocondria involucra la transición de la permeabilidad mitocondrial, la cual está relacionada con la apertura de un poro en la membrana interna mitocondrial, lo que la hace completamente permeable a iones y pequeñas moléculas. En tales condiciones, la liberación de Ca^{2+} no necesita energía. La transición de la permeabilidad es una consecuencia tanto de la sobrecarga de Ca^{2+} como del estrés oxidativo, y eventualmente genera la pérdida del potencial de membrana y la distensión de la mitocondria (Crompton, 1999).

La principal ERO que se forma en la mitocondria es el anión $O_2^{\bullet-}$, el cual se puede convertir a H_2O_2 por la SOD o por dismutación espontánea; y el H_2O_2 puede formar OH^{\bullet} por la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En la figura 3 se esquematiza la relación entre la excitotoxicidad y el estrés oxidativo debido al aumento en la concentración de calcio.

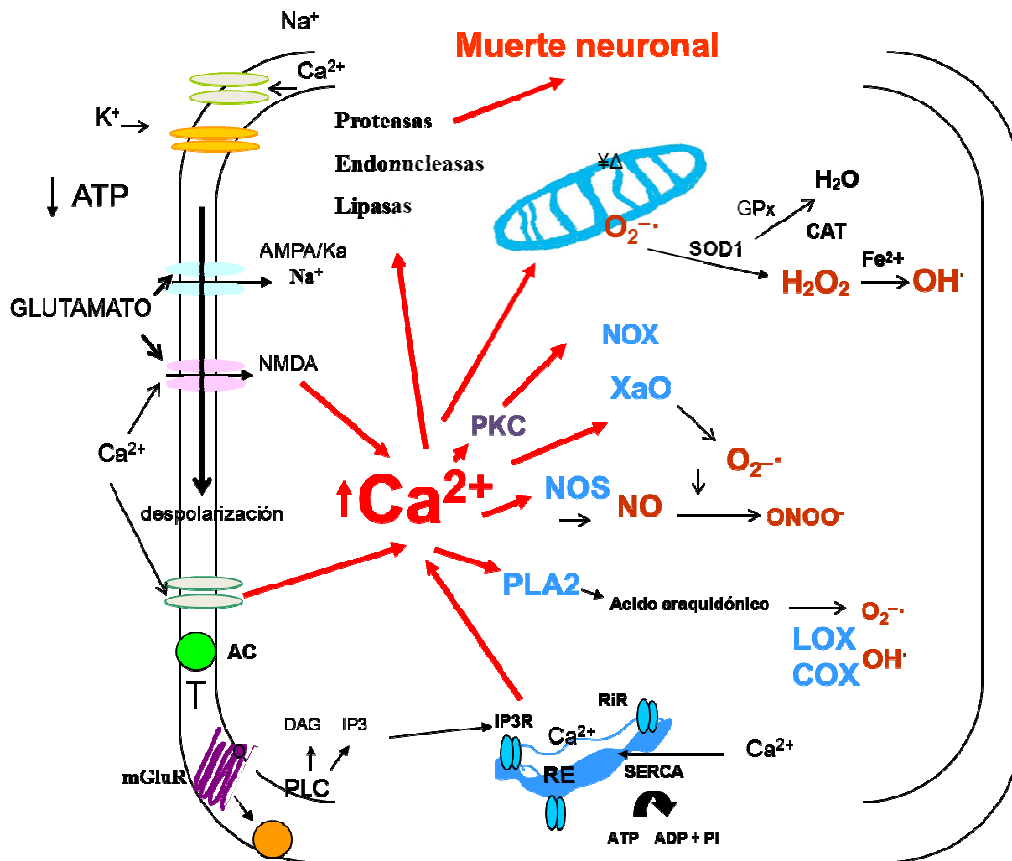


Figura 4. Excitotoxicidad y estrés oxidativo. La entrada de Ca^{2+} por los RNMDA induce la activación de enzimas productoras de ER como la cPLA₂, la XaO, la NOX y la NOS; la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial aumenta la producción de $O_2^{\bullet-}$ y este a su vez puede dar lugar a la producción de H_2O_2 y de OH^{\bullet} . Las especies reactivas pueden atacar lípidos y diversas proteínas afectando su función.

6. Mecanismos involucrados en el daño hipoglucémico

La disminución en los niveles de ATP resultante de la hipoglucemia favorece la extrusión del ion Mg^{2+} del RNMDA induciendo su activación. Además, ocurre un aumento en los niveles de aminoácidos excitadores en el espacio extracelular por el

fallo en sus sistemas de recaptura, ya que son dependientes de energía. Los aminoácidos excitadores también se liberan porque debido a la falla energética se despolariza la membrana plasmática, ya que se colapsan los gradientes iónicos. Lo anterior resulta en una mayor estimulación de los RNMDA favoreciendo el daño excitotóxico (Sandberg et al., 1986; Wieloch, 1985).

La vulnerabilidad al daño hipoglucémico varía en las diferentes regiones del cerebro siendo ciertas poblaciones de neuronas más vulnerables que otras. Las neuronas más vulnerables son las neuronas de la región CA1, del subiculum y del giro dentado del hipocampo; las neuronas en la capa externa de la corteza y las neuronas del estriado (Auer et al., 1984b). 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 se previene cuando se eliminan las vías cortico-estriatales que son glutamatérgicas (Wieloch et al., 1985).

Otra evidencia que apoya a la excitotoxicidad como el mecanismo de muerte en la hipoglucemia es que la administración de antagonistas de los RNMDA previene la muerte neuronal (Wieloch, 1985; Nellgard y Wieloch, 1992), aun cuando son administrados después del periodo hipoglucémico (Papagapiou y Auer, 1990).

La alteración en la homeostasis iónica del Ca^{2+} 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 lo disminuye (Friberg et al., 1998). Además, la mitocondria es muy importante en la activación de vías de señalización que conllevan a la muerte apoptótica liberando factores proapoptóticos como el citocromo c y el factor inductor de la apoptosis (Moley y Mueckler, 2000).

Por otra parte, se ha sugerido el estrés oxidativo como otro mecanismo que contribuye al daño neuronal en la hipoglucemia. Las evidencias que apoyan lo anterior se discuten a continuación.

7. Antecedentes

El estrés oxidativo se ha sugerido como un mecanismo de daño neuronal asociado con la hipoglucemia. En modelos animales de hipoglucemia inducida por insulina se ha observado un aumento en los niveles de lipoperoxidación de la membrana plasmática (Papadopoulos et al., 1997; Patockova et al., 2003; McGowan et al., 2006) y mitocondrial (Ballesteros, 2003) en cerebros de animales hipoglucémicos aún antes de que se presente el periodo isoelectrico (Haces et al., 2010).

Por otra parte, se ha observado la producción de ER y la protección con antioxidantes en condiciones de inhibición glucolítica o de ausencia de glucosa (AG) in vitro (Chow et al., 1994; Nakao et al., 1996; Rego et al., 1999; Liu et al., 2003; Massieu et al., 2003; McGowan et al., 2006; Hernández-Fonseca et al., 2008).

En cuanto a las fuentes de dichas ER, se ha observado que en cultivos de astrocitos la inhibición de la XaO y de la NOS no previene el daño producido por la privación de glucosa (Papadopoulos et al 1997), mientras que estudios en neuronas corticales cultivadas y en el modelo animal de hipoglucemia inducida por insulina, sugieren que la actividad de la NOX participa en el daño hipoglucémico al activarse después de la reintroducción de glucosa (Suh et al., 2007). También se ha observado que la lipooxigenasa-12 participa en la producción de ER durante la reintroducción de glucosa posterior a la privación de glucosa en cultivos primarios de corteza (Nagasawa, 2007).

Por otra parte, la inhibición de la NOS en células de retina en condiciones de deficiencia energética no tiene efecto protector alguno (Rego et al., 1999).

En el modelo de privación de glucosa en nuestro laboratorio encontramos que la producción de ER ocurre después de la activación de los receptores NMDA, ya que cuando éstos son bloqueados se evita el aumento en las ER así como la muerte neuronal (Páramo, 2008). Lo anterior sugiere que el estrés oxidativo en estas condiciones

depende directamente de la excitotoxicidad. Sin embargo su contribución a la muerte neuronal no se ha esclarecido.

La entrada de Ca^{2+} a través de los RNMDA activa sistemas generadores de ER, sin embargo en la hipoglucemia o durante la ausencia de glucosa in vitro no se han explorado del todo cuáles son las vías productoras de ER que se activan, ni cuál es su participación en el daño y la muerte neuronal.

Por esto, en el presente estudio nos proponemos identificar si la producción de ER depende de Ca^{2+} , cuáles son sus vías de producción y cuál es su papel en la muerte neuronal.

8. HIPOTESIS

La ausencia de glucosa inducirá la producción de ER por sistemas dependientes de Ca^{2+} .

La producción de especies reactivas contribuirá a la muerte neuronal.

9. OBJETIVOS:

- Establecer el curso temporal de la generación de ER durante la ausencia de glucosa en neuronas cultivadas de hipocampo.
- Determinar el curso temporal del aumento de Ca^{2+} intracelular.
- Identificar si sistemas dependientes de Ca^{2+} participan en la producción de ER durante la ausencia de glucosa. Se estudiará la participación de: la NOS, la XaO, la cPLA₂ y la NOX.
- Determinar cuál es el papel de la activación de estas vías y la consiguiente formación de especies reactivas en la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa en neuronas cultivadas de hipocampo.

10. Metodología

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo preparados de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación, sembradas en medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27, L-glutamina (0.5 mM) y gentamicina (20 µg/ml) (Hernández-Fonseca y Massieu, 2005). A los 4 días in vitro (DIV) se agregó citosina arabinosa para inhibir la proliferación glial (10 µM). A los 7 DIV, al medio en el que están sembradas las células se le agregó medio Neurobasal sin antioxidantes fresco. Las células fueron utilizadas a los 10-12 DIV.

10.1 Tratamientos

A los 10-12 DIV las células se expusieron a medio sin glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM sin glucosa) durante diferentes tiempos desde 15 minutos hasta 4 horas.

Utilizando un enfoque farmacológico, se determinó la participación de las diferentes vías productoras de ER en la ausencia de glucosa. Para esto se utilizaron los siguientes inhibidores: alopurinol (250 µM) inhibidor de la enzima XaO, 7-nitroindazol (7-NI 10 µM) y 2-etil-2-tiopseudourea hidrobromuro (EPTU 500 µM) inhibidores de la NOS, araquidonilmetil cetona (AACOCF3 1 µM) inhibidor de la cPLA₂, apocinina (500 µM y 1 mM) inhibidor de la NOX y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA 50 µM) inhibidor de la lipooxigenasa y atrapador de algunas ER como O₂[•], el ONOO⁻ y el OH[•] (Floriano-Sánchez et al., 2006). Se probaron a distintas concentraciones con el fin de encontrar una concentración efectiva.

También se utilizaron diferentes antioxidantes, ebselen (10 µM), que es un mimético de la glutatión peroxidasa y atrapador de ONOO⁻ (Müller et al. 1984; Maiorino et al., 1988) y trolox (250 µM y 1 mM) que es un análogo de la vitamina E.

Los fármacos utilizados en el ensayo de viabilidad (inhibidores de las enzimas) se preincubaron 30 minutos y se agregaron durante la AG y el periodo de recuperación, o

sólo durante la AG. En el caso de los antagonistas de los receptores NMDA (MK-801, 10 μ M y memantina 5 μ M) y no-NMDA (NBQX, 50 μ M), éstos se incubaron durante la AG y el periodo de recuperación.

10.2 Determinación de ER

La producción de ER se monitoreó utilizando dos marcadores fluorescentes sensibles a la oxidación: el dihidroetidio (DHE) y la carboxy-dihidrodiclorofluoresceína diacetato (c-H₂DCFDA). El DHE es oxidado preferentemente por superóxido (O₂^{•-}) a etidio (Et) e hidroxietidio (Bindokas et al., 1996; Zhao et al., 2003); éste se transporta al núcleo y se intercala entre las bases del DNA emitiendo fluorescencia roja. La c-H₂DCFDA es deacetilada, oxidada por ER citosólicas y convertida al compuesto fluorescente carboxi diclorofluoresceína (c-DCF), emitiendo fluorescencia verde en el citoplasma (Hockenbery et al., 1993).

Las células expuestas a medio sin glucosa se incubaron con los marcadores fluorescentes durante 20 minutos. Después de la incubación con los fluoróforos, las células se lavaron con medio D-PBS que contiene: KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.46 mM, NaCl 136.8 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM. La fluorescencia se monitoreó en un lector de placas utilizando las longitudes de onda de excitación y emisión 510/590 nm para el Et y 480/510 nm para la c-DCF.

10.3 Determinación del Ca²⁺ intracelular

La determinación del aumento en el Ca²⁺ intracelular se llevó a cabo utilizando el marcador fluorescente fluo-4-AM (1 μ M). Las células, sembradas sobre cubreobjetos, se incubaron con este marcador durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente, el cubreobjetos se colocó en una cámara de reperfusión sobre un microscopio invertido. El medio Ringer de reperfusión contiene: NaCl 145 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂, 2 mM; NaH₂PO₄ 0.5 mM; NaH₂CO₃ 1 mM; HEPES-Na⁺ 5 mM y glucosa 25 mM o sin glucosa añadida. La fluorescencia se capturó utilizando un objetivo de

inmersión en agua con un filtro para fluo-4 en una cámara CCD. Las imágenes se colectaron en intervalos de 2.5 segundos durante 2 horas utilizando Image-Pro Express y la película resultante se analizó con el programa Image J. Se cuantificó la fluorescencia de un campo por condición, con alrededor de 40-60 células, de 4 experimentos independientes. Los cambios en la fluorescencia, ΔF se reportan como $F - F_0$ en unidades arbitrarias de fluorescencia (a.u.f.). Después del registro continuo durante dos horas, se registró el mismo campo durante 8 minutos y después de los primeros 2 minutos se añadió al medio de perfusión una solución que contiene KCl 100 mM, CaCl_2 2 mM y HEPES 10 mM. La exposición a alto K^+ despolarizó a todas las células del campo registrado y produjo un incremento transitorio en la fluorescencia que se atribuye al influjo de Ca^{2+} a través de los CCSV. Esto permitió verificar la viabilidad del cultivo al final del experimento.

10.4 Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo ya que esta es una enzima citoplásmica que en condiciones normales no se libera, sin embargo cuando ocurre un daño en la membrana, la LDH se libera al medio y se puede medir su actividad en éste.

Las neuronas se expusieron a medio sin glucosa durante 1-2 horas, después de este tiempo, el medio sin glucosa se retiró y se les añadió el medio en el que se siembran (neurobasal). El ensayo se llevó a cabo a las 22 horas aproximadamente después de iniciado el experimento. El medio de cultivo se colecta y se incuba en un amortiguador de fosfatos (1 mM, pH 7.5) que contiene NADH (9.4 mM). La reacción se inicia agregando piruvato y se monitorea la disminución en la densidad óptica a 340 nm que corresponde a la oxidación del NADH. Las células se raspan en un medio de lisis y se cuantifica el contenido de proteína por medio del método de Lowry. Los resultados se expresan como μmol de lactato/mg/hr (Bergmeyer y Bernt, 1968).

En algunos casos, la viabilidad celular se evaluó con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio)). 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.

10.4 Análisis estadístico

Los datos se compararon por medio de un análisis de varianza, ANOVA, de una sola vía seguida de una prueba post-hoc Fisher de comparación múltiple. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

11. Resultados

11.2 Producción de ER durante la ausencia de glucosa

Para establecer el curso temporal de producción de ER, las células se incubaron 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 horas en medio sin glucosa. La producción de ER que oxidan al DHE convirtiéndolo en Et comienza a aumentar desde los 15 minutos de AG. A la hora se observa un pico de producción que comienza a disminuir hacia las 2 y 4 horas. Sin embargo, a este último tiempo el aumento en la fluorescencia fue significativamente mayor con respecto al control. La fluorescencia emitida por la c-DCF en cambio, aumenta significativamente después de 1 hora de AG (Fig. 1).

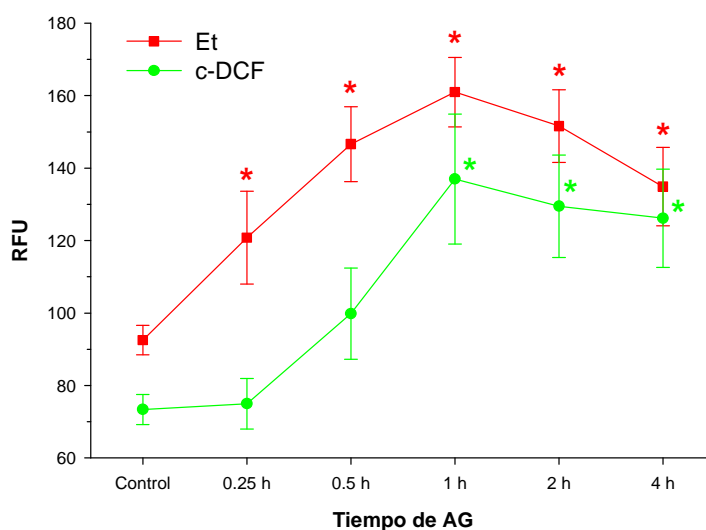


Figura 1. Curso temporal de la producción de especies reactivas durante la ausencia de glucosa. Las células se incubaron durante los tiempos señalados en medio sin glucosa. Los datos se expresan como la media \pm ES en unidades relativas de fluorescencia (RFU) de 5 experimentos independientes. Los datos se analizaron 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.

Como se puede observar en la figura 2, la AG causa un aumento en el número de células positivas a ambos fluoróforos. Después de 30 minutos a 1 hora, las células comienzan a hincharse (flechas negras en Fig 2) y se aprecian núcleos condensados (flechas blancas Fig. 2). A las 4 horas de AG, se puede apreciar un número menor de

células positivas a ambos marcadores, lo cual corresponde a la disminución en la fluorescencia (Fig. 1) que podría deberse a que las células están muertas o a que hay una disminución en la producción de ER.

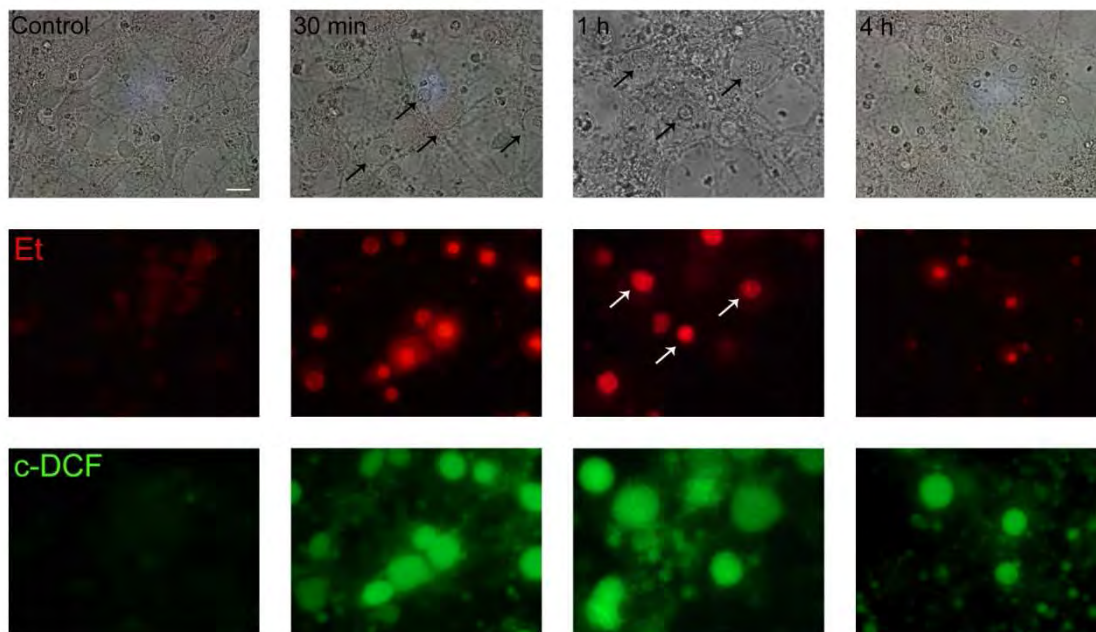


Figura 2. Curso temporal de producción de ER. Fotomicrografías de un experimento representativo en el que se muestran células positivas a Et y c-DCF a los tiempos de AG indicados. Las flechas negras señalan neuronas hinchadas mientras que las flechas blancas indican núcleos condensados. Barra de calibración= 10 μ m.

11.2 Vías de producción de ER durante la AG

Para evaluar la participación de las diferentes vías enzimáticas en la producción de ER durante la AG se evaluó el efecto de su inhibición sobre las ER a diferentes tiempos de AG.

Para determinar la concentración efectiva a la que estos fármacos inhiben la actividad de las enzimas se realizaron curvas dosis-respuesta. En la figura 3 se muestra el efecto dosis-respuesta de la inhibición de la XaO con alopurinol. A 5 μ M no se observó disminución en la producción de superóxido u otras ER, sin embargo a concentraciones de 100 μ M y 250 μ M se obtuvo un efecto significativo (Fig 3A).

Et

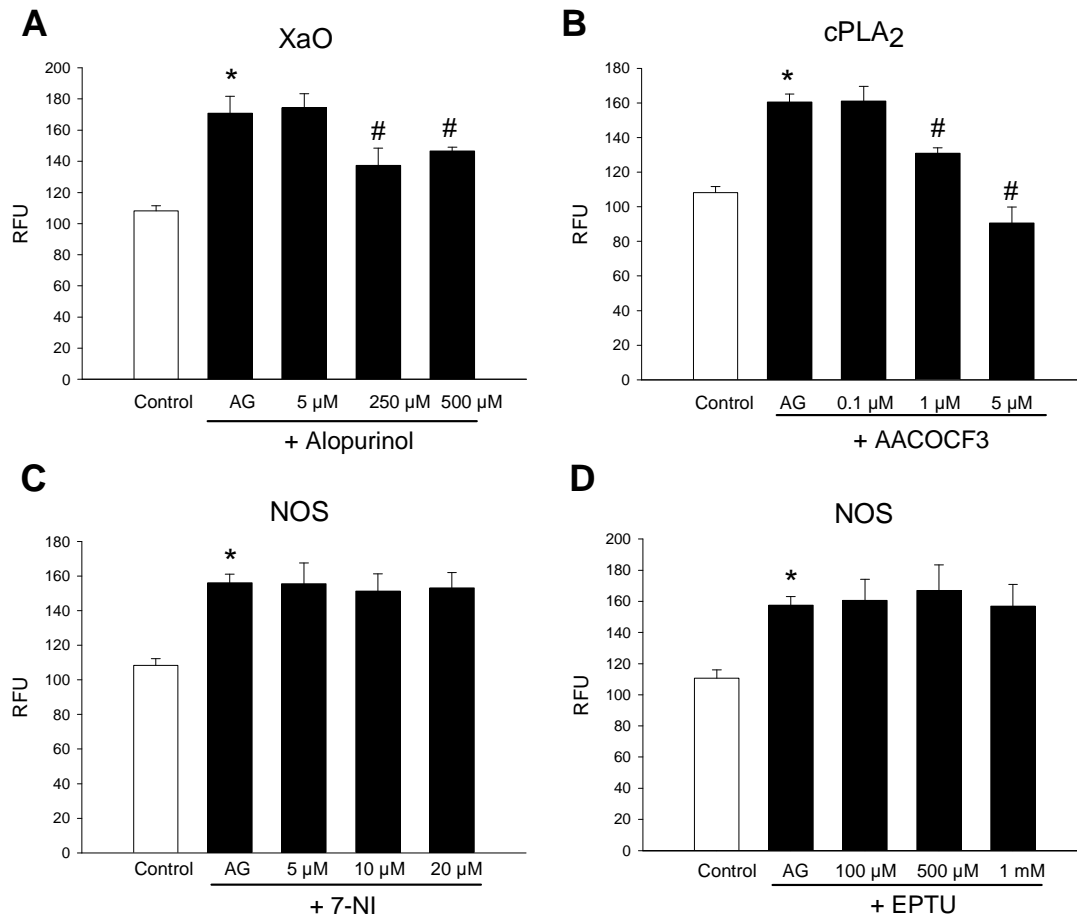


Figura 3. Curvas dosis-respuesta de los diferentes inhibidores enzimáticos. Las células se incubaron 1 hora en presencia o ausencia del fármaco indicado y la producción de ER se midió a través de la fluorescencia emitida por el DHE al ser oxidado a Et. Los datos se expresan como la media \pm ES de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron por medio de una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $p < 0.05$ con respecto a la ausencia de glucosa (AG).

El efecto dosis-respuesta del inhibidor de la cPLA₂, el AACOCF3 se muestra en la figura 3B. Como se puede observar, este compuesto fue ineficiente a concentraciones de 0.1 μ M; sin embargo, a 1 y 5 μ M disminuyó significativamente la producción de superóxido y otras ER monitoreadas por el Et. No obstante, a 5 μ M fue tóxico para las células (datos no mostrados).

La curva dosis-respuesta de los inhibidores de las tres diferentes isoformas de la NOS (7-NI y EPTU) se muestra en la figura 3C y 3D. A ninguna de las concentraciones usadas estos inhibidores tuvieron efecto alguno sobre las ER.

En el caso de la apocinina, inhibidor de la NOX, se utilizó una concentración previamente reportada, ya que en los experimentos dosis-respuesta encontramos que este compuesto al parecer es capaz de disminuir la producción de $O_2^{\bullet-}$ desde concentraciones menores a 10 μ M. En trabajos previos se ha observado que este compuesto inhibe a la enzima a concentraciones menores a 10 μ M (Taye et al., 2010; Stolk et al., 1994).

A continuación se evaluó el efecto de los diferentes inhibidores utilizando las concentraciones de acuerdo a las curvas dosis-respuesta. La inhibición de la XaO con alopurinol (250 μ M) previno eficientemente el aumento en las ER después de 1 y 2 horas de AG, sin embargo este efecto no fue significativo a tiempos más cortos, 15 y 30 minutos (Fig. 4A).

La inhibición de la cPLA₂, utilizando AACOCF₃ (1 μ M) previno la producción de ER desde los tiempo más cortos de AG, 15 y 30 minutos y después de 1 hora dejó de ser eficiente (Fig. 4B).

Por otra parte, la inhibición de la enzima NOX con apocinina (500 μ M) tuvo un efecto similar al de la inhibición de la cPLA₂ en la disminución de la producción de superóxido siendo eficiente desde los 15 minutos hasta 1 hora (Fig. 4C).

La inhibición de la lipooxigenasa, enzima que se activa río abajo de la cPLA₂ y que produce superóxido al metabolizar al ácido araquidónico, utilizando ácido nordihidroguaiarético (NDGA, 15 μ M), previno eficientemente la producción de ER desde tiempos cortos y hasta las 2 horas (Fig. 4D). Este compuesto también posee capacidad atrapadora, por lo que su efecto podría deberse tanto a su capacidad atrapadora, como a la inhibición de la lipooxigenasa. Sin embargo, a esta concentración, tiene un efecto tóxico para las células, por lo que su efecto se probó a una concentración menor (15 μ M) y solamente en el caso de DHE, y lo que se observó es que es prácticamente igual de eficiente al prevenir la generación de ER.

Et

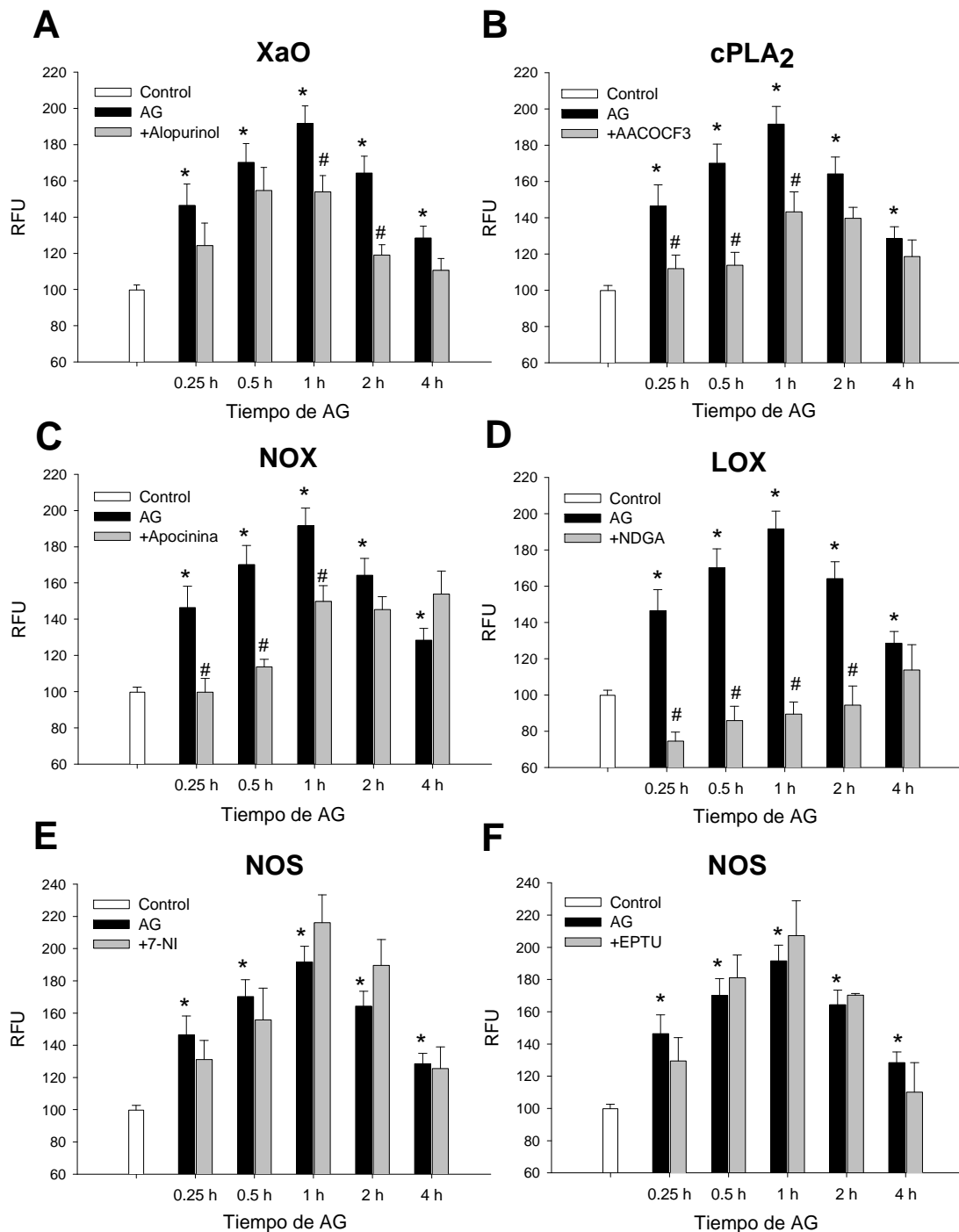


Figura 4. Vías de producción de ER durante la AG. Las células se expusieron a medio sin glucosa durante los tiempos indicados en presencia o ausencia del fármaco indicado. Los datos muestran la fluorescencia emitida por el Et. **A** Inhibición de la XaO con alopurinol (250 μ M). **B** Inhibición de la cPLA₂ con AACOCF3 (1 μ M). **C** Inhibición de la NOX con apocinina (500 μ M). **D**. Inhibición de la lipooxigenasa con NDGA (50 μ M). **E** Inhibición de la NOS con 7-NI (10 μ M). **F** Inhibición de la NOS con EPTU (500 μ M). Los datos se expresan como la media \pm ES de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de 6 experimentos independientes y se analizaron por medio de una 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 # con respecto a la ausencia de glucosa. AG, ausencia de glucosa.

La inhibición de la NOS utilizando dos diferentes compuestos que inhiben a las tres isoformas de esta enzima (eNOS, iNOS, nNOS) 7-NI (10 μ M) y EPTU, (500 μ M) no tuvo efecto en la producción de ER. Como se puede observar en la figura 2, a ninguno de los tiempos estudiados los inhibidores previnieron el aumento en la producción de ER (Fig. 4E y F).

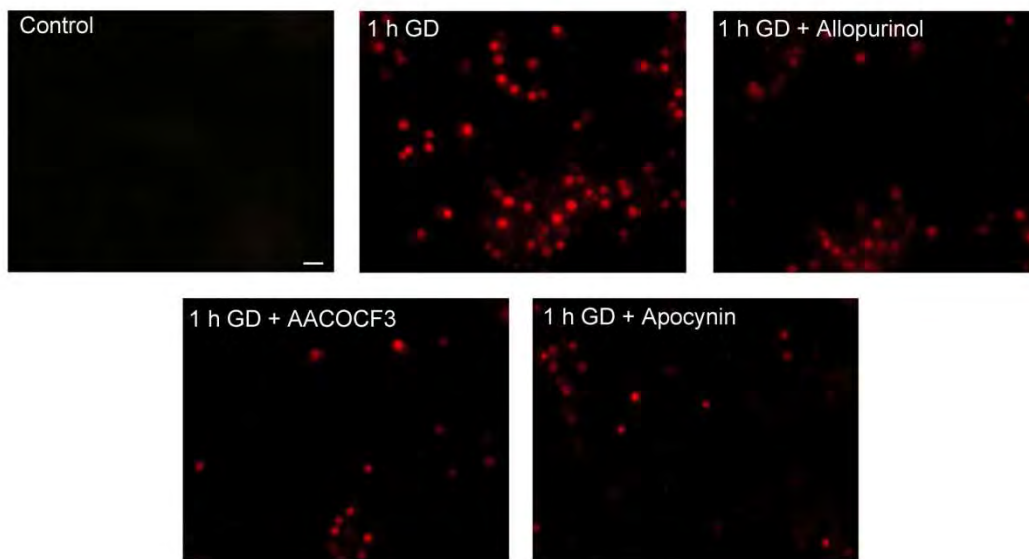
En el caso de la fluorescencia emitida por la c-DCF, no fue posible observar efecto significativo con los inhibidores, excepto en el caso del NDGA (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de diferentes fármacos en la producción de ER medida por c-DCF.

	AG	XaO	cPLA ₂	NOX	LOX	NOS	
		+Alop	+AACO	+Apo	+NDGA	+7-NI	+EPTU
CI	79.17±5.1						
15 min	79.43±3.9	85.47±9.9	72.6±6	72.8±8.4	52.9±5.3	80.1±4.5	74.4±5.9
30 min	101.67±7.4	97.23±14.2	102.2±15.6	110.9±33.3	59.8±4.5	87.7±6.6	96.3±9
1 h	129.2±10.7*	117.4±9.2	141.8±19.9	159.2±46	94.6±13.5 [#]	101.1±8.9	107.5±12.4
2 h	132.88±9.9*	114.97±8.5	152.8±18.4	201.1±54.6	83.1±4.7 [#]	117±10.9	122.5±25.4
4 h	144.39±14.5*	104.8±8.85	141.8±10.3	196.4±51.4	73.4±3.4 [#]	130.5±17.3	128.54±21.3

Los datos se expresan como la media \pm ES de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de 5 experimentos independientes y se analizaron por medio de una 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 # con respecto a la AG, ausencia de glucosa, (Alop: alopurinol, AACO: AACOCF3, Apo: apocinina).

A



B

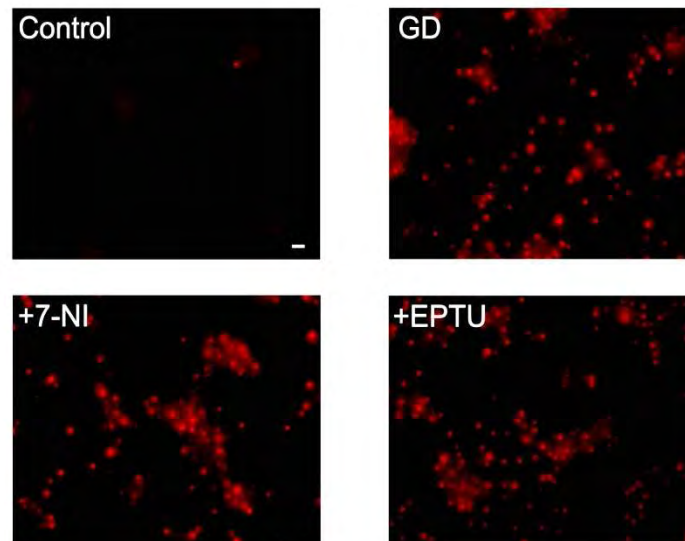


Figura 5. Fotomicrograffias de experimentos representativos en los que se muestra el efecto del (A) alopurinol, el AACOCF3 y de la apocinina y (B) 7-NI y EPTU en la producción de ER después de 1 hora de AG. Barra de calibración: A: 20 μm y B: 10 μm .

11.3 Antioxidantes en la producción de ER inducida por la AG

Por otra parte se utilizaron antioxidantes para evaluar su efecto en la producción de ER inducida por la AG. El ebselen, mimético de la glutatión peroxidasa y atrapador de peroxinitrito, disminuye la producción de ER medida por Et a las 0.25, 0.5 y 1 hora de AG (Fig. 6A), mientras que disminuye significativamente la marca de la c-DCF desde 1 y hasta 4 horas de AG (Figura 6B).

El análogo de la vitamina E, trolox, disminuyó significativamente la producción de ER medida por Et a tiempos cortos de AG, de 15 y 30 minutos (Fig. 6C) y fue eficiente en disminuir la marca de la c-DCF desde los 30 minutos, 1, 2 y hasta las 4 horas (Fig. 6D).

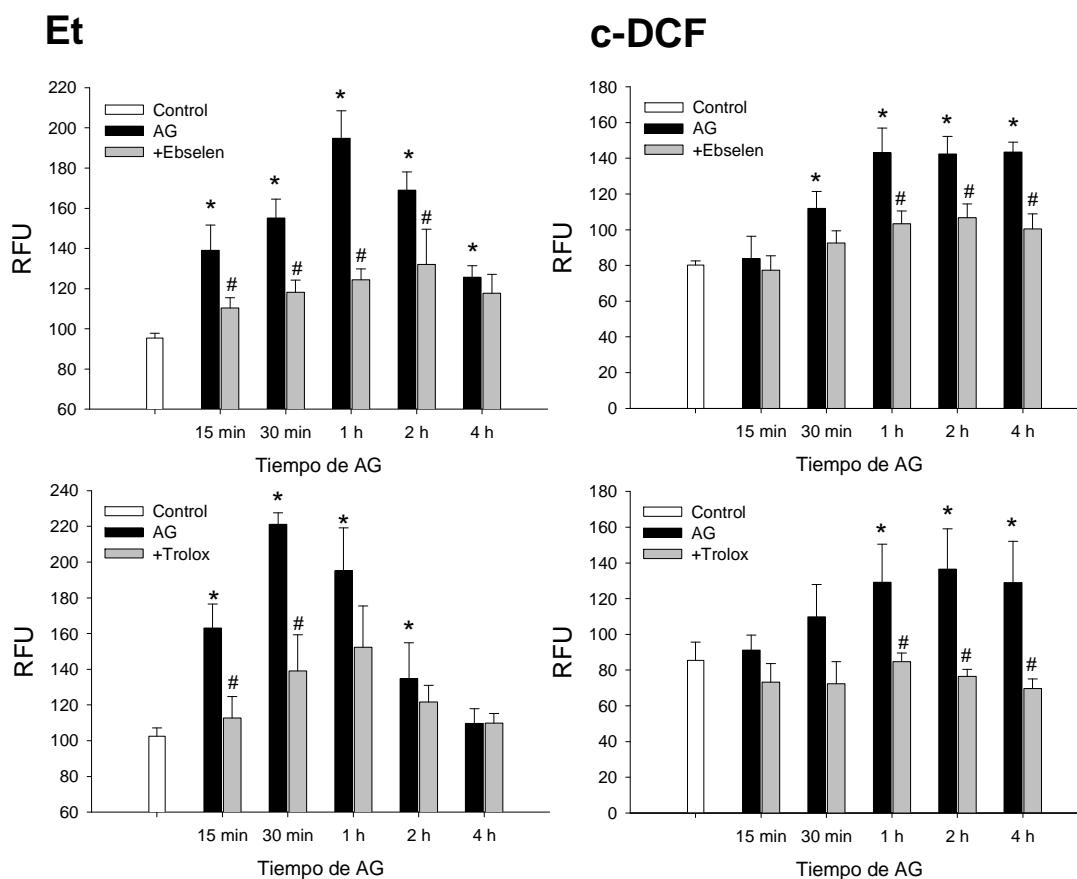


Figura 6. Efecto de moléculas antioxidantes en la producción de ER inducida por la AG. Las células se incubaron en medio sin glucosa durante los tiempos señalados en presencia o ausencia de los antioxidantes ebselen (10 μ M) y trolox (250 μ M). Los datos se expresan como la media \pm ES de unidades relativas de fluorescencia (RFU) de 4-9 experimentos independientes y fueron analizados por medio de una prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $p < 0.05$ con respecto al control y # con respecto a la ausencia de glucosa. AG, ausencia de glucosa.

11.4 La producción de ER depende de Ca^{2+}

De los experimentos anteriores se puede concluir que la producción de ER depende, al menos en parte, de vías enzimáticas activadas por Ca^{2+} . Por lo cual decidimos investigar si la AG causa un aumento en el calcio intracelular y si este aumento participa en la generación de ER.

Como se muestra en la figura 7, la AG causa un aumento en el Ca^{2+} intracelular medido como el aumento en la fluorescencia del fluo-4, desde los 15 minutos. En el panel A, se muestran los trazos de algunas células en la condición control, mientras que en el panel B se muestran los trazos de las células expuestas a medio sin glucosa. Como se puede observar en ambas gráficas, el aumento en la fluorescencia es mayor en las células sometidas a AG que en las células control. En el panel C se muestra la cuantificación de 271 neuronas control (barras blancas) y 326 neuronas sin glucosa (barras grises).

La ausencia de glucosa causa un aumento de 6.4, 4.7, 12.3, 24.6 y 47.7 veces sobre los niveles basales (tiempo cero) después de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente. Se observó también un aumento en el Ca^{2+} en las células que no fueron sometidas a AG, sin embargo, este aumento es más discreto y solamente es significativo después de 1 hora.

Al término del registro de 120 minutos, se agregó K^+ al medio de perfusión para observar la respuesta de las células (Insertos en panel A y B). En las células control, se puede observar que después de este estímulo, el Ca^{2+} aumenta rápidamente pero los niveles basales de éste se recuperan en poco tiempo, lo que sugiere que el aumento observado no causa deterioro en el amortiguamiento del Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, en las neuronas sometidas a AG, el aumento en el Ca^{2+} intracelular causado por el K^+ disminuye más lentamente o no se puede amortiguar o disminuir sugiriendo que estas células han perdido su capacidad de regular la concentración de Ca^{2+} intracelular (Inserto en panel B).

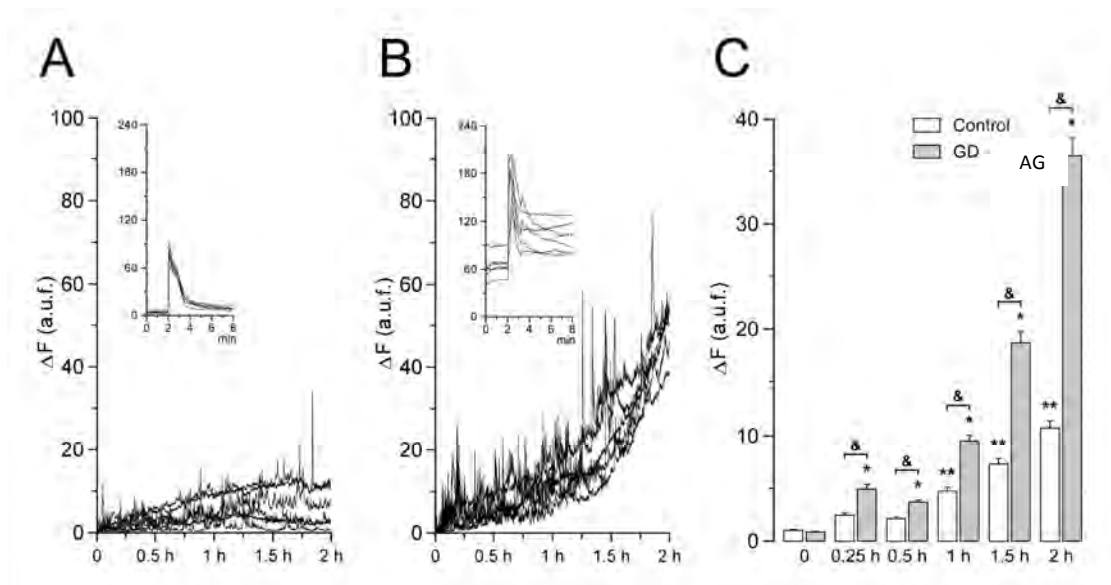


Figura 7. Curso temporal del aumento de Ca^{2+} intracelular en neuronas en presencia o ausencia de glucosa. A. Aumento en la fluorescencia del fluo-4 durante 2 horas de registro en 6 neuronas seleccionadas en un campo en condiciones control. B. Aumento en la fluorescencia del fluo-4 durante 2 horas de registro en 5 neuronas seleccionadas en un campo en condiciones de AG. Insertos en A y B: ejemplos de la respuesta de algunas de las neuronas registradas durante 2 horas a un estímulo despolarizante (K^+ , 100 mM). C. Cuantificación de las mediciones obtenidas de 271 neuronas en condiciones control y 326 neuronas en condiciones de AG. Los datos se analizaron por medio de una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $p < 0.05$ con respecto al tiempo cero AG, y ** $p < 0.05$ con respecto al tiempo cero en el caso control y & AG con respecto al control.

Para determinar si el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ participa en la producción de ER se midió la producción de éstas en presencia o ausencia de quelantes de Ca^{2+} utilizando BAPTA-AM (100 nM) como un quelante de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular y EGTA (1 mM) como un quelante de Ca^{2+} extracelular. En la figura 8 se muestra el efecto de estos fármacos en la producción de ER durante la AG. El BAPTA-AM disminuyó significativamente la producción de ER desde los 30 minutos y hasta las 2 horas en el caso del Et, y solamente a las 2 horas en el caso de la c-DCF (Fig. 8A). El EGTA, sólo tuvo efecto al disminuir las ER que oxidan al DHE, a tiempos más cortos, desde los 15 minutos y hasta 1 hora (Fig. 8B). Estos experimentos sugieren que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produce ER. Sin embargo, dado que el efecto de los quelantes y de los inhibidores

enzimáticos no es significativo en el caso de la c-DCF, podríamos sugerir que hay vías de producción de ER independientes de Ca^{2+} .

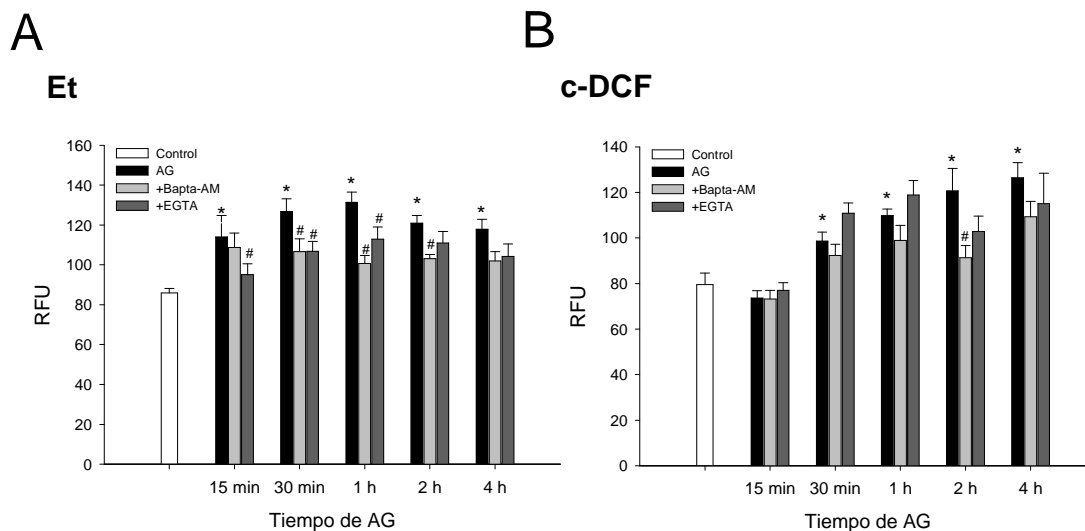


Figura 8. Ca^{2+} y producción de ER. Las células fueron expuestas a medio sin glucosa durante los tiempos señalados en presencia o ausencia de los quelantes de calcio intracelular BAPTA-AM (100 nM) o extracelular, EGTA (1 mM). Los datos se expresan como la media \pm ES en RFU de 4-6 experimentos independientes y fueron analizados 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 # con respecto a la AG.

11.5 Excitotoxicidad, estrés oxidativo y muerte neuronal en la AG

En experimentos previos de nuestro laboratorio hemos observado que la producción de ER durante la AG depende de la activación de los receptores NMDA, ya que al bloquear al receptor se evita el aumento en la producción de ER detectadas por la oxidación del DHE, que en nuestras condiciones parece estar siendo oxidado principalmente por superóxido. Lo anterior sugiere que el estrés oxidativo es un componente de las vías que se activan en la excitotoxicidad durante la AG. Sin embargo, la contribución del estrés oxidativo a la muerte neuronal en estas condiciones se ha explorado poco. Es por ello que en nuestro modelo estudiamos la participación del estrés oxidativo en la muerte neuronal, utilizando antioxidantes y comparando su efecto contra el de los antagonistas de los receptores glutamatérgicos. En la Fig. 9 se muestra el efecto sobre la viabilidad neuronal inducida por la AG de los antagonistas de los

receptores glutamatérgicos NMDA y no-NMDA. Ambos antagonistas previenen completamente la muerte neuronal.

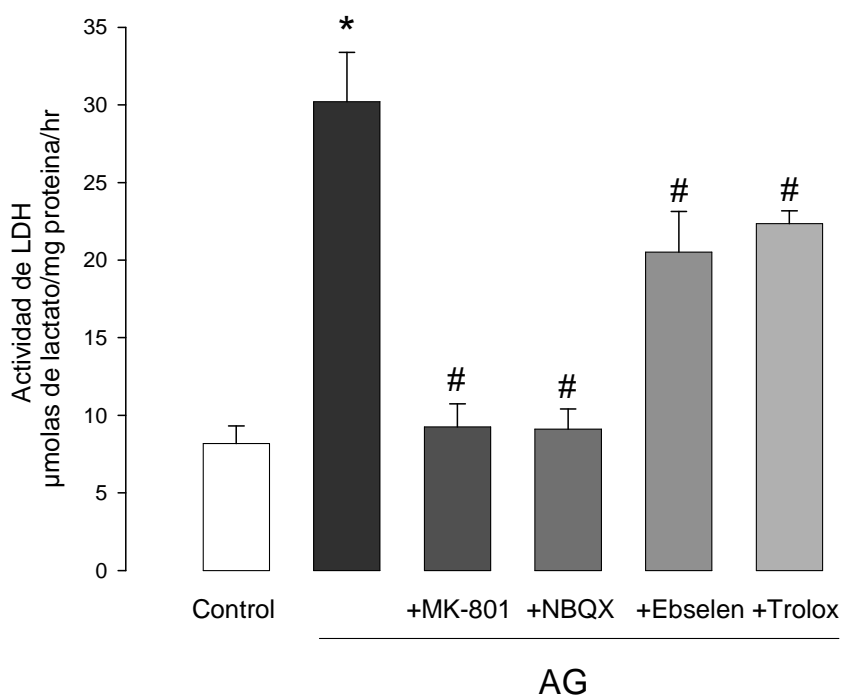


Figura 9. Excitotoxicidad y estrés oxidativo en la muerte neuronal inducida por AG. Las células fueron expuestas a medio sin glucosa durante 1-2 horas. Después de la exposición a medio sin glucosa, se mantuvieron durante 22 horas aproximadamente en su medio de cultivo anterior y después de este tiempo se llevó a cabo el ensayo. Los fármacos MK-801, antagonista de los receptores NMDA (10 μM), NBQX, antagonista de los receptores no-NMDA (50 μM), se incubaron durante y después de la AG, mientras que los antioxidantes ebselen (10 μM) y trolox (1 mM) sólo se incubaron durante la AG. Los datos se expresan como actividad de LDH de 3 experimentos independientes y se analizaron por medio de la prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $p < 0.05$ con respecto al control y # con respecto a la AG.

Los antioxidantes en cambio, tienen un efecto protector discreto, de aproximadamente el 30%, que es significativo con respecto al control en ambos casos, aunque el efecto del trolox, sólo resultó significativo cuando el análisis se realizó de manera independiente de los otros grupos. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo es un componente de la cascada de muerte inducida por la AG (Fig. 9).

Posteriormente evaluamos la participación de las diferentes vías de producción de ER en la muerte neuronal y comparamos el efecto de su inhibición únicamente durante la

AG o durante y después, ya que se ha sugerido que la reintroducción de glucosa ocasiona un aumento importante en la producción de ER a través de la NOX lo cual contribuye de manera importante en la muerte neuronal (Suh et al., 2007).

En la figura 10 se muestra el efecto de los diferentes inhibidores enzimáticos sobre la muerte neuronal.

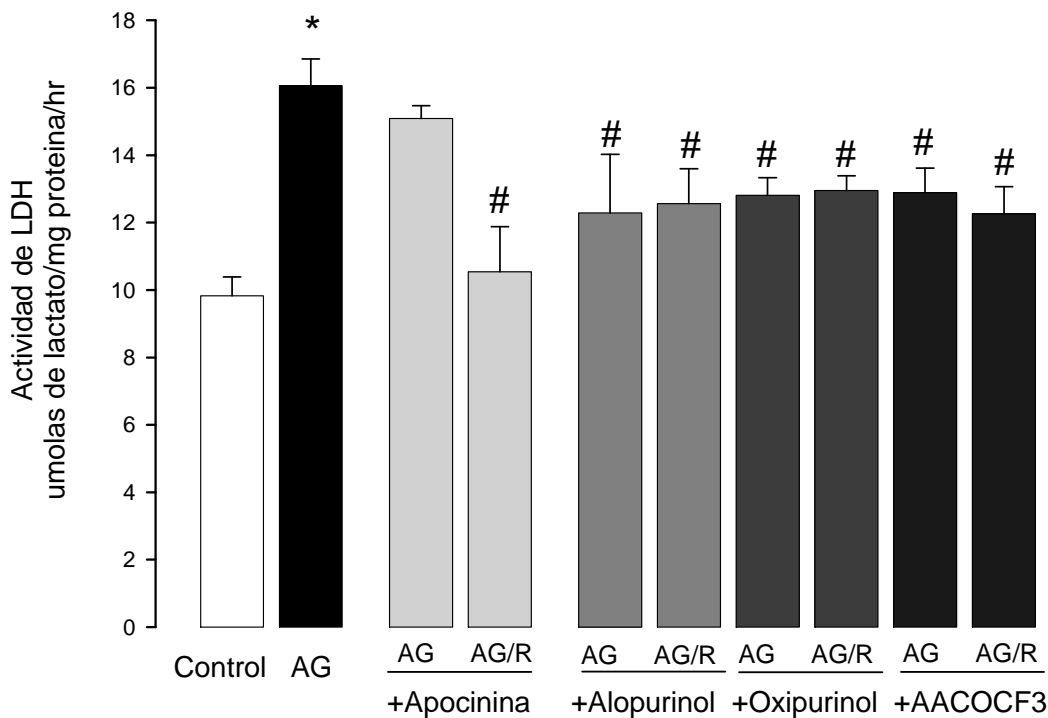


Figura 10. Vías de producción de ER y muerte neuronal. Las células se expusieron a medio sin glucosa durante 1-2 h. El ensayo se llevó a cabo 17 horas después de iniciado el experimento. Los fármacos, Apocinina (1 mM), Alopurinol (500 μ M), Oxipurinol (50 μ M) y AACOCF3 (1 μ M) se incubaron durante la AG o durante y después de la AG (AG/R). Los datos se expresan como la media \pm ES de μ mol de lactato/mg de proteína/hr de 3-5 experimentos independientes y fueron analizados por medio de la prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Fisher de comparación múltiple. * $p < 0.05$ con respecto al control y # con respecto a la ausencia de glucosa.

La inhibición de la NOX previene la muerte neuronal significativamente en un 35% aproximadamente, pero solamente cuando su inhibidor está presente durante y después de la AG (Fig. 10), de acuerdo a reportes previos (Suh et al., 2007). La inhibición de esta enzima únicamente durante el periodo de la AG no protege de la muerte.

La inhibición de la XaO con alopurinol y con su metabolito, el oxipurinol protege en un 25% aproximadamente de la muerte neuronal, y el efecto es el mismo si se inhibe a la enzima sólo durante la AG o durante y después de la AG.

La inhibición de la cPLA₂ tiene un efecto similar al de la inhibición de la XaO, ya que protege de la muerte neuronal en un 25% cuando se inhibe a la enzima sólo durante la AG o durante y después de la AG.

Por último, para comprobar que el componente principal en muerte neuronal inducida por la AG es la excitotoxicidad a través de la activación del RNMDA o excluir la posibilidad de que el fármaco (MK-801) tuviera otros efectos que contribuyeran a su efecto protector, decidimos utilizar otro antagonista de los receptores NMDA, la memantina. Junto con estos experimentos también se probó el efecto protector de los quelantes de Ca²⁺ en la muerte neuronal. Estos experimentos se hicieron usando el ensayo de supervivencia MTT.

En la figura 11 se puede observar que el efecto protector de la memantina es prácticamente el mismo que el del MK-801, lo cual quiere decir que la activación de este receptor desencadena las señales, entre ellas al estrés oxidativo que conllevan a la muerte neuronal.

En esta gráfica también se muestra el efecto del EGTA, quelante de Ca²⁺ extracelular. Este compuesto previno eficientemente la muerte neuronal, su efecto es similar al de los antagonistas del receptor NMDA. En el caso del BAPTA-AM, no pudimos encontrar efecto alguno a ninguna de las concentraciones probadas. Lo anterior está de acuerdo con los resultados encontrados hasta el momento, en los que mostramos que el estrés oxidativo es un componente de la excitotoxicidad durante la AG, y que la entrada de Ca²⁺ por el NMDAR activa señales que conllevan a la muerte neuronal.

En contraste, el NDGA no tuvo ningún efecto protector a pesar de abatir la producción de ER.

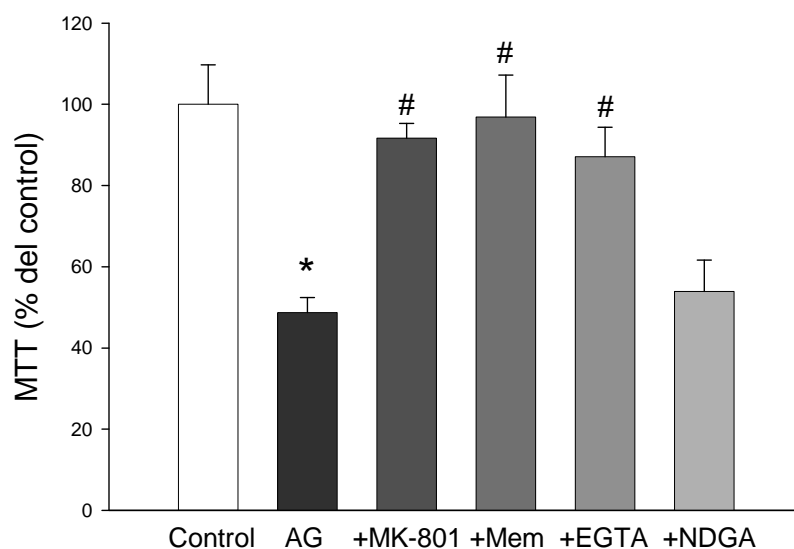


Figura 11. Excitotoxicidad y muerte neuronal durante la AG. Las células fueron expuestas a medio sin glucosa durante 1-2 h y posteriormente se regresaron al medio de cultivo anterior. El ensayo se llevó acabo 24 horas después de iniciado el experimento. Los resultados se expresan como la reducción de MTT con respecto al control de al menos 3 experimentos independientes que fueron analizados por medio de una 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 # con respecto a la ausencia de glucosa.

12. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la AG estimula rápidamente la producción de ER a través de vías dependientes de Ca^{2+} . Antecedentes de nuestro laboratorio sugieren que la producción de ER en estas condiciones depende de la activación de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos, principalmente del RNMDA, ya que cuando se bloquea este receptor se evita completamente la producción de ERO. Se utilizaron dos marcadores de producción de ER, el DHE y la c-DH₂DCF, y se observó que la inhibición de las enzimas productoras de $\text{O}_2^{\bullet-}$ así como los quelantes de Ca^{2+} disminuyeron eficientemente la oxidación del DHE, lo cual nos permite sugerir que la señal producida por el Et es dependiente del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es una de las ER importantes que se generan durante la AG. Por otra parte la oxidación de la c-DH₂DCF sólo se previno en presencia de antioxidantes.

Las vías involucradas en la producción de ER durante la AG se estudiaron a continuación. Se observó que durante la AG la cPLA2 es una de las enzimas que contribuye a la formación temprana de ER y radicales libres, ya que su inhibición previno el aumento en la generación de ER a tiempos cortos (15 minutos-1 hora). La activación de esta enzima genera el rompimiento de fosfolípidos en la membrana plasmática, y uno de sus productos es el ácido araquidónico, que al metabolizarse a través de lipooxigenasas y cicloxigenasas genera $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} , respectivamente (Nanda et al., 2007). La inhibición de la lipooxigenasa utilizando NDGA, también redujo importantemente la generación de ER. En reportes previos se ha observado que una de las isoformas de esta enzima participa en la generación de ER durante la reintroducción de glucosa después de un periodo de AG (Nagasawa et al., 2007), sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, participa en la generación de ER durante la AG.

Por otra parte, la XaO parece contribuir a la generación más tardía de especies reactivas, ya que su inhibición reduce las especies a tiempos más largos de AG (1-2h). La enzima xantina deshidrogenasa es convertida a XaO por proteólisis dependiente de Ca^{2+} y por oxidación de sus grupos $-\text{SH}$ causando la oxidación de la hipoxantina acumulada a xantina en condiciones de disminución de ATP, produciendo $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (McCord, 1985). Debido a que en nuestro modelo existe una disminución en los niveles de ATP y una activación de los RNMDA que aumentan el Ca^{2+} intracelular, la participación de esta enzima es de esperarse.

Estos resultados concuerdan con estudios que sugieren que la XaO y la cPLA2 contribuyen a la generación de ER en condiciones de isquemia cerebral (Lin and Phillis, 1991; Owada et al., 1994; Saluja et al., 1997; Arai et al., 2001; Abramov et al., 2007).

Por otro lado, la inhibición de la NOS, utilizando dos diferentes inhibidores, no redujo la oxidación de ninguno de los dos marcadores utilizados lo cual sugiere que esta enzima no está involucrada en la producción de NO en la AG. Esta enzima requiere NADPH para generar NO y citrulina a partir de L-arginina. En las presentes condiciones la síntesis de NADPH a través de la vía de las pentosas se vería disminuida por la falta de glucosa, lo cual posiblemente limite la participación de esta enzima. Lo anterior está de acuerdo con trabajos previos en condiciones de inhibición glucolítica en la retina o de AG en astrocitos, en los que se observó que esta enzima no participa en la generación de especies reactivas (Papadopoulus, 1997; Rego et al., 1999).

De acuerdo con la sugerencia de que los mecanismos dependientes de Ca^{2+} participan en la generación de ER, los quelantes de Ca^{2+} intracelular y extracelular disminuyen la oxidación de los marcadores aunque no completamente en el caso de la c-DCF, sugiriendo que hay vías de generación de ER que no se activan por Ca^{2+} .

Otra fuente de ERO es la NOX. La activación de esta enzima también es dependiente de Ca^{2+} , aunque indirectamente, ya que se activa, entre otros mecanismos, por la proteína cinasa C, cuya activación depende de Ca^{2+} . La PKC fosforila una de las subunidades de la NOX, lo cual hace que la subunidad se traslade a la membrana plasmática y se ensamble todo el complejo enzimático (Sorce y Krause, 2009). La inhibición de la NOX redujo la oxidación del DHE a Et desde los 15 minutos y hasta 1 hora de iniciada la AG. En las presentes condiciones experimentales, los niveles de glucosa no llegan a “cero” inmediatamente, dado que se retira la glucosa extracelular, pero la glucosa intracelular sigue estando disponible, esto permitiría la activación de esta enzima que requiere NADPH, a tiempos cortos. De acuerdo a nuestros experimentos, después de cierto tiempo la inhibición de esta enzima deja de tener efecto en la producción de ER.

Otra fuente de ER es la mitocondria. La participación de la mitocondria en la generación de ER se ha reportado en trabajos previos en condiciones de AG en neuronas granulares de cerebelo. Sin embargo, en ese trabajo se observó que la producción de ER por la mitocondria ocurre en condiciones no excitotóxicas, ya que al bloquear al RNMDA se siguen produciendo ER por este mecanismo (Isaev et. al., 2008).

La contribución del estrés oxidativo a la muerte neuronal inducida por la AG no se conoce del todo. Nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo es un componente

de la muerte neuronal excitotóxica que ocurre en condiciones de AG ya que los antioxidantes trolox y ebselen disminuyeron parcialmente la muerte neuronal. El ebselen, mimético de la glutatión peroxidasa podría prevenir la propagación en la lipoperoxidación membranal manteniendo la integridad de la membrana plasmática. Además, este compuesto a concentraciones bajas, inhibe a la NOX, lipooxigenasas y a la NOS (Schewe, 1995). En condiciones de inhibición glucolítica, se ha reportado protección en contra de la muerte neuronal con antioxidantes como la vitamina E (Rego et al., 1999; Massieu et al., 2003). Además, el trolox aumenta el efecto protector del dextroflano, un antagonista del RNMDA, en condiciones de AG (Chow et al., 1994).

Por otra parte, se exploró la participación de las diferentes vías de producción de ER en la muerte neuronal. En este sentido, encontramos que la producción de ER a través XaO y cPLA2 participa en la muerte neuronal, ya que su inhibición tuvo un efecto protector sobre la muerte. Además, encontramos que la participación de estas enzimas se debe a su activación durante la AG, y que ésta contribuye a la muerte ya el efecto protector de su inhibición fue el mismo cuando los inhibidores estuvieron presentes sólo durante la AG o durante y después de la AG. Lo anterior sugiere además que la posible participación de estas enzimas en la generación de ER que ocurre durante la reintroducción de glucosa no sería tan importante para la supervivencia neuronal (Suh et al 2007).

La participación de la activación de la NOX en la muerte neuronal inducida por la AG fue diferente a la de las otras enzimas. Observamos que de acuerdo a estudios previos (Suh et al., 2007) la inhibición de esta enzima protege solamente cuando ocurre tanto durante como después de la AG, ya que si su inhibidor sólo está presente durante la ausencia de glucosa, no se observa protección alguna; sin embargo si el inhibidor se agrega además en el periodo de recuperación se observa protección.

Los presentes resultados sugieren que el estrés oxidativo contribuye a la muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa. Sin embargo, no es el único mecanismo involucrado, ya que ninguno de los inhibidores enzimáticos ni los antioxidantes previnieron completamente la muerte neuronal. No obstante, los antagonista de los RNMDA, MK-801 y memantina protegieron casi completamente a las células en contra de la muerte neuronal, sugiriendo que otros mecanismos dependientes de Ca^{2+} iniciados por la excitotoxicidad están involucrados. Esto último está de acuerdo con la protección que observamos con el quelante Ca^{2+} extracelular EGTA.

13. Conclusiones

La ausencia de glucosa induce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} lo cual activa a la XaO, a la cPLA₂, a lipooxigenasas y a la NOX, pero no a la NOS. Las especies producidas por estas enzimas contribuyen a la muerte neuronal.

La identificación de estas vías contribuye al conocimiento de los mecanismos que conducen a la muerte neuronal inducida por la privación de glucosa. Esto es relevante en la patología humana ya que la ausencia de glucosa cerebral se asocia a condiciones patológicas como la hipoglucemia y la isquemia cerebral.

14. Perspectivas

En el presente estudio se determinó que hay un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y que enzimas productoras de ER se activan como consecuencia de dicho aumento, lo cual contribuye a la muerte neuronal inducida por la AG. Sin embargo, aún falta por conocer cuáles son los sistemas involucrados en el aumento de calcio intracelular. Los resultados sugieren que este aumento se debe a su entrada por el RNMDA, pero podrían participar otros sistemas como los CCSV, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o la falla en los sistemas de almacenamiento del retículo endoplásmico o en los mecanismos de extrusión de calcio, como la ATPasa de Ca^{2+} membranal. También falta por conocer la participación de la mitocondria en la generación de ER y de la reducción en los niveles de GSH, o de otros sistemas de defensa antioxidante.

Finalmente, falta por conocer otros componentes activados por el aumento en el Ca^{2+} intracelular, que contribuyen a la muerte, como proteasas dependientes de calcio, estrés reticular, daño mitocondrial y la generación de apoptosis.

PATHWAYS INVOLVED IN THE GENERATION OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES DURING GLUCOSE DEPRIVATION AND ITS ROLE ON THE DEATH OF CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

B. PÁRAMO,^a K. HERNÁNDEZ-FONSECA,^a
A. M. ESTRADA-SÁNCHEZ,^a N. JIMÉNEZ,^b
A. HERNÁNDEZ-CRUZ^b AND L. MASSIEU^{a*}

^aDivisión de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, CP 04510, AP 70-253

^bDepartamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, CP 04510, AP 70-253

Abstract—Oxidative stress has been suggested as a mechanism contributing to neuronal death induced by hypoglycemia, and an early production of reactive species (RS) during the hypoglycemic episode has been observed. However, the sources of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species have not been fully identified. In the present study we have examined the contribution of various enzymatic pathways to RS production and neuronal death induced by glucose deprivation (GD) in hippocampal cultures. We have observed a rapid increase in RS during GD, which depends on the activation of NMDA and non-NMDA receptors and on the influx of calcium from the extracellular space. Accordingly, intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$, progressively increases more than 30-fold during the GD period. It was observed that superoxide production through the activation of the calcium-dependent enzymes, phospholipase A₂ (cPLA₂) and xanthine oxidase (XaO), contributes to neuronal damage, while nitric oxide synthase (NOS) is apparently not involved. Inhibition of cPLA₂ decreased RS at early times of GD whereas inhibition of XaO diminished RS at more delayed times. The antioxidants trolox and ebselen also showed a protective effect against neuronal death and diminished RS generation. Inhibition of NADPH oxidase also contributed to the early generation of superoxide. Taking together, the present results suggest that the early activation of calcium-dependent ROS producing pathways is involved in neuronal death associated with glucose deprivation. © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel: +52-55/56-22-57-61; fax: +52-55/56-22-56-07.

E-mail address: lmassieu@ifc.unam.mx (L. Massieu).

Abbreviations: c-DCF, carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate; c-H₂DCFDA, 5-(and-6-)carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; cPLA₂, calcium-dependent cytosolic phospholipase A₂; DHE, dihydroethidium; DIV, days *in vitro*; EPTU, 2-ethyl-2-thioisopropylurea hydrobromide; Et, ethidium; GD, glucose deprivation; LDH, lactate dehydrogenase; LOX, lipoxygenase; MK-801, dizolciline(+)-5-methyl-10,11-dihydroxy-5H-dibenzo(a,d)-cyclohepten-5,10-imine maleate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NBQX, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; NOS, nitric oxide synthase; RFU, relative fluorescence units; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; RS, reactive species; XaO, xanthine oxidase; 7-NI, 7-nitroindazole.

0306-4522/10 \$ - see front matter © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.074

Key words: hypoglycemia, oxidative damage, excitotoxicity, xanthine oxidase, phospholipase A₂, NADPH oxidase.

Glucose is the main energy source in the brain, whenever blood glucose concentration decreases below 20 mg/dl, brain activity ceases and the hypoglycemic coma, also known as the isoelectric period, takes place. A 30–60 min period of isoelectricity induces selective brain damage in vulnerable brain regions, including the cerebral cortex, the hippocampus and the striatum (Auer et al., 1984a,b; Kalimo et al., 1985). The mechanisms underlying hypoglycemic neuronal damage are not completely understood but early studies suggested the participation of an excitotoxic mechanism triggered by the release of glutamate, and particularly aspartate, soon after the onset of the isoelectric period (Sandberg et al., 1986; Wieloch, 1984). In addition, recent investigations have suggested that oxidative stress is associated with hypoglycemic neuronal damage (Suh et al., 2007, 2008; Haces et al., 2008, 2010). Studies show that glucose reintroduction after the isoelectric period correlates with the presence of superoxide and nitrotyrosine immunoreactivity, and suggest that glucose reintroduction stimulates oxidative stress through the activity of NADPH oxidase (Suh et al., 2007, 2008). On the other hand, oxidative stress might be an early response to the hypoglycemic condition because a selective increase in lipoperoxidation is observed before the onset of the isoelectric period, in vulnerable brain regions (Haces et al., 2010). In agreement, other studies have shown increased lipoperoxidation in brains from hypoglycemic mice non-subjected to a coma period (Patočková et al., 2003). These observations suggest that the hypoglycemic condition favors the production of reactive oxygen and nitrogen (ROS/RNS) species, which might participate in the induction of the subsequent neuronal death. However, little is known about the pathways involved in the early generation of reactive species (RS) during the hypoglycemic condition. Recent studies have reported increased mitochondrial ROS production during hypoglycemia in newborn piglets (McGowan et al., 2006), as well as in cultured cerebellar granule neurons during glucose deprivation (GD) (Isaev et al., 2008). GD of cultured neurons can be used as an *in vitro* model to study the mechanisms of neuronal damage associated with the hypoglycemic condition. In previous studies we have shown that hippocampal cultured neurons are highly vulnerable to energy failure, and die after inhibition of the glycolytic pathway with iodoacetate, a potent inhibitor of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Neuronal death induced in this condition involves energy depletion, activation of glutamate receptors, elevation of the intracellular calcium concentration and RS production (Hernández-Fonseca et al., 2008). In the present study we aimed to identify through a pharmacological approach, the different pathways involved in the production of RS, and their contribution to cell death in hippocampal cultured neurons deprived from glucose. Results indicate that GD rapidly induces RS generation, involving the activity of several enzymatic pathways including xanthine oxidase (XaO), the calcium-dependent cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), lipoxygenase (LOX) and NADPH oxidase. Meanwhile, nitric oxide synthase (NOS) is apparently not involved. RS generation is dependent on the activation of glutamate receptors and on calcium influx from the external milieu. Results suggest that oxidative stress contributes to neuronal damage, since the antioxidants trolox and ebselen as well as the inhibitors of XaO, cPLA₂ and NADPH oxidase partially prevented neuronal death.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from Wistar rat embryos of 17–18 days of gestation as previously described (Hernández-Fonseca and Massieu, 2005). Cells were suspended in Neurobasal culture medium (Brewer et al., 1993) supplemented with B27 (Gibco, Rockville, MD, USA), 0.5 mM L-glutamine and 20 μg/ml gentamicin (Sigma RBI, St Louis, MO, USA), and plated at a density of 260–290 × 10³/cm² (1.5 × 10⁶ cells/ml/well) in Costar 24-well plates (Cambridge, MA, USA), precoated with poly-L-lysine (5 μg/ml, Sigma RBI, St Louis, MO, USA). Cells were cultured for 10–13 days *in vitro* (DIV) at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Four days after plating, glucose (5 mM) and cytosine arabinoside (10 μM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA) were added. After 7 DIV medium was changed to a mixture of 50% fresh Neurobasal medium and 50% of the original plating medium. Animals were handled and cared according to the NIH guide for care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 80-23, revised in 1996) and with the local Animal Care Committee approval. All efforts were made in order to minimize animal suffering.

After 10–13 DIV neurons were exposed to glucose-free medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, Rockville, MD, USA) for different periods of time. Then, aliquots of the medium were collected for quantification of glutamate and aspartate levels, or cultures were processed for ATP or RS determinations.

ROS and RNS determination

ROS and RNS production was determined at different times after the exposure to glucose-free medium (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 h) by means of the fluorescent markers dihydroethidium (DHE, 3.2 μM), and 5-(and-6-)carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (c-H₂DCFDA, 20 μM) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). DHE has been used as a marker of superoxide because of its relative specificity for this ROS, producing the fluorescent products ethidium (Et) and 2-hydroxyethidium (Bindokas et al., 1996; Zhao et al., 2003). DHE enters the cell and after its oxidation to Et in the cytosol it is retained within the cell nucleus because of its interaction with DNA, staining the nucleus with bright-red fluorescence (Bindokas et al., 1996). c-H₂DCFDA is deacetylated, oxidized by ROS and RNS and converted to the fluorescent compound 5-(and-6-)carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (c-DCF), stain-

ing the cell cytoplasm with bright-green fluorescence (Hockenbery et al., 1993). Cells were plated on 24-well plates and after the different GD times, they were loaded during 20 min with the fluorescent markers; washed with D-PBS medium containing (in mM): 2.68 KCl, 1.46 KH₂PO₄, 136.8 NaCl, 8.1 NaH₂PO₄, and the fluorescence signal was monitored and reported as relative fluorescence units (RFU) using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc. Vermont NE, USA) (488 nm excitation and 530 nm emission for c-DCF, and 530 nm excitation and 590 nm emission for Et). Cells were observed under an epifluorescence microscope Carl Zeiss Axiovert 200M (Germany) and representative images from each experimental condition were captured through the AxioVision AC 4.4 image analyzer (Carl Zeiss imaging Systems).

Glutamate receptor antagonists, antioxidants and inhibitors of the different RS producing enzymes, were incubated during the exposure to glucose-free medium. Different concentrations of enzyme inhibitors were used in order to find an effective dose (Fig. 1 supplemental material). The inhibitors used were: allopurinol (250 μM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA) for XaO; 7-nitroindazole (7-NI 10 μM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA) and 2-ethyl-2-thiopsedourea hydrobromide (EPTU 500 μM, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) for the three isoforms of NOS; apocynin (500 μM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for NADPH oxidase, and arachidonyltrifluoromethyl ketone (AACOCF₃ 1 μM, USBiological, Swampscott, MA, USA) for cPLA₂. Inhibitors were preincubated during 30 min before the exposure to glucose-free medium.

The glutathione peroxidase mimetic 2-phenyl-1,2-benziselenazol-3(2H)-one, ebselen (10 μM, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), the vitamin E analog, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, trolox (250 μM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and nordihydroguaiaretic acid (NDGA 15 and 50 μM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA), an inhibitor of LOX and a scavenger of several ROS and RNS (Floriano-Sánchez et al., 2006) were used as antioxidants and were incubated during the GD period.

The effects of the NMDA receptor blocker, dizolcipine(+)-5-methyl-10,11-dihydroxy-5H-dibenzo(a,d)-cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801, 10 μM, Tocris, Ellisville, MO, USA), the non-NMDA receptor antagonist, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[*g*]quinoxaline-2,3-dione (NBQX, 50 μM, Tocris, Ellisville, MO, USA), the intracellular calcium chelator BAPTA-AM (100 nM, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) and the extracellular calcium chelator EGTA (1 mM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA) were also tested. These compounds were added during the GD period.

Intracellular calcium measurements

Cultured hippocampal neurons were loaded with Fluo-4 by incubation for 1 h with 1 μM Fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at room temperature with no dispersing agents added. A coverslip containing hippocampal neurons was placed in a recording chamber (Mod. RC-25; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD), where they were continuously perfused (0.5 ml/min) with Ringer medium containing (in mM): 145 NaCl, 3 KCl, two CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5 HEPES-Na, and either 25 mM of glucose or no glucose was added. The pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Epifluorescence was collected with a water immersion objective (30x, 0.9 NA, LOMO, St. Petersburg, Russia) and a Fluo-4 filter set (Excitation: D480/30; DCLP 505; Emission: 535/40; Chroma Technology Corp.) mounted on the Nikon Diaphot TMD. A high-power light emitting diode (Luxeon V Star Lambertian Royal Blue LED; Lumileds Lighting LLC, San Jose, CA, USA) was attached to an aluminum holder placed in an epifluorescence illumination port of the microscope. The LED was controlled by a custom-built stroboscopic power supply that provided 3 A of DC current pulses of 6 ms duration, which were synchronously triggered by the exposure trigger signal of the CCD camera (Cool-

snap ES, Roper Scientific). Images were collected (6 ms exposure per image, 2.5 s interval) during 2 h with Image-Pro Express (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) and the resulting movies were analyzed with Image J software (version 1.42; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

Continuous recordings of Fluo-4 fluorescence were obtained for 2 h from a given field of view comprising approximately 40–60 hippocampal neurons. Raw fluorescence (F) was quantified from individual neurons in a given field, and the minimum fluorescence (F_0) of each recording was also determined. Fluorescence changes (ΔF) are reported as $F - F_0$. No attempts were made to extrapolate from these data intracellular Ca^{2+} concentrations. At the end of the 2 h recording, a new acquisition started for 8 min and after 2 min of recording 1 ml of a solution containing 100 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$ and 10 mM HEPES (pH: 7.4 with KOH) was added to the chamber, while bath perfusion with Ringer medium was maintained continuously. High K^+ exposure depolarized all neurons in the field and produced a transient fluorescence increase attributed to calcium influx through voltage-gated calcium channels. Numerical results were plotted with Origin 3.8 (Microsoft Software, Inc., Northampton, MA, USA)

ATP determination

ATP levels were determined at different times after the exposure to glucose-free medium (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 h), and at the end of a 3 h recovery period following 1 h of GD. ATP levels were determined by means of a luminometer through the luciferin-luciferase quimioluminescent kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), as previously described (Hernández-Fonseca and Mas-sieu, 2005) and ATP concentrations were calculated from readings obtained from an ATP standard curve (from 6.5 to 250 pmol). Aliquots of cell homogenates were kept for protein determination by the Bradford's method (Bradford, 1976) and data are expressed as pmol/ μ g of protein.

Determination of amino acid extracellular concentration

Amino acid concentration in the culture medium was measured by HPLC in control cultures not exposed to glucose-free medium, and in cultures exposed to GD for 1 and 4 h. Aliquots from cultured medium were deproteinized with perchloric acid (7%) and neutralized with KOH. Amino acid content was determined by HPLC as previously reported (Estrada-Sánchez et al., 2007). Briefly, samples were derivatized with the same volume of o-phthalaldehyde (Sigma RBI, St Louis, MO, USA) and injected into an HPLC system (Waters 600, Milford, MA, USA) equipped with an ODS column (25 cm \times 4 mm internal diameter, Supelco, Inc., Bellefonte, USA). The mobile phase consisted of 18% methanol: 22% acetonitrile: 14% isopropanol: 46% phosphate buffer (60 mM, pH=6.65) and a flux rate of 1 ml/min was used in a linear gradient of 33 min duration from 10 to 90% solvent mixture. Amino acid concentration was calculated by comparison with a standard mixture of amino acids equally processed. Results are expressed as amino acid concentration in μ M. When the effect of MK-801 and NBQX was tested, the antagonists were present during the GD period (1 or 4 h).

Cell survival

Cultures were exposed to glucose-free medium for different periods of time (1, 2, 4 and 8 h). Immediately after, medium was substituted for the medium previously withdrawn from each well, and cells were left to recover for 23, 22, 20 or 16 h, according to the GD period. Cell survival was monitored by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, Sigma RBI, St Louis, MO, USA) assay (Mosmann, 1983; Berridge and Tan, 1993) as previously described (Hernández-Fonseca et al., 2008)

or by the lactate dehydrogenase release (LDH) assay (see below). When MK-801 and NBQX were tested, they were added during the GD and the recovery periods.

LDH release

Cell survival was also monitored by the assessment of LDH release 17–24 h after 1 h of GD. LDH activity was assessed in the culture medium by measuring the decrease in optical density resulting from the oxidation of NADH at 340 nm using pyruvate as a substrate (Bergmeyer and Bernt, 1968). Briefly, after treatment, culture medium was incubated in phosphate buffer (1 mM, pH 7.5) with NADH (9.4 mM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA). The reaction was started with the addition of pyruvate (20 mM, Sigma RBI, St Louis, MO, USA) to the mixture, and the change in optical density was monitored during 180 s in a spectrophotometer. Cells were homogenized and protein content was measured by the Lowry's method using the BioRad kit (BioRad Laboratories CA, USA). Data are expressed as μ mol of lactate/mg/hour. In this case, MK-801 (10 μ M) and NBQX (50 μ M) were added during and after the GD periods. The antioxidants ebselen (10 μ M), trolox (1 mM) and NDGA (15 and 50 μ M) were incubated only during GD, while the enzyme inhibitors, allopurinol (250 μ M), oxipurinol (50 μ M), 7-NI (10 μ M), EPTU (500 μ M), apocynin (1 mM) and AACOCF3 (1 μ M) were either added only during GD or during and after GD. The concentrations used of enzyme inhibitors were chosen according to dose-response curves showing a significant reduction in ROS production (Fig. 1 supplemental material).

Statistics

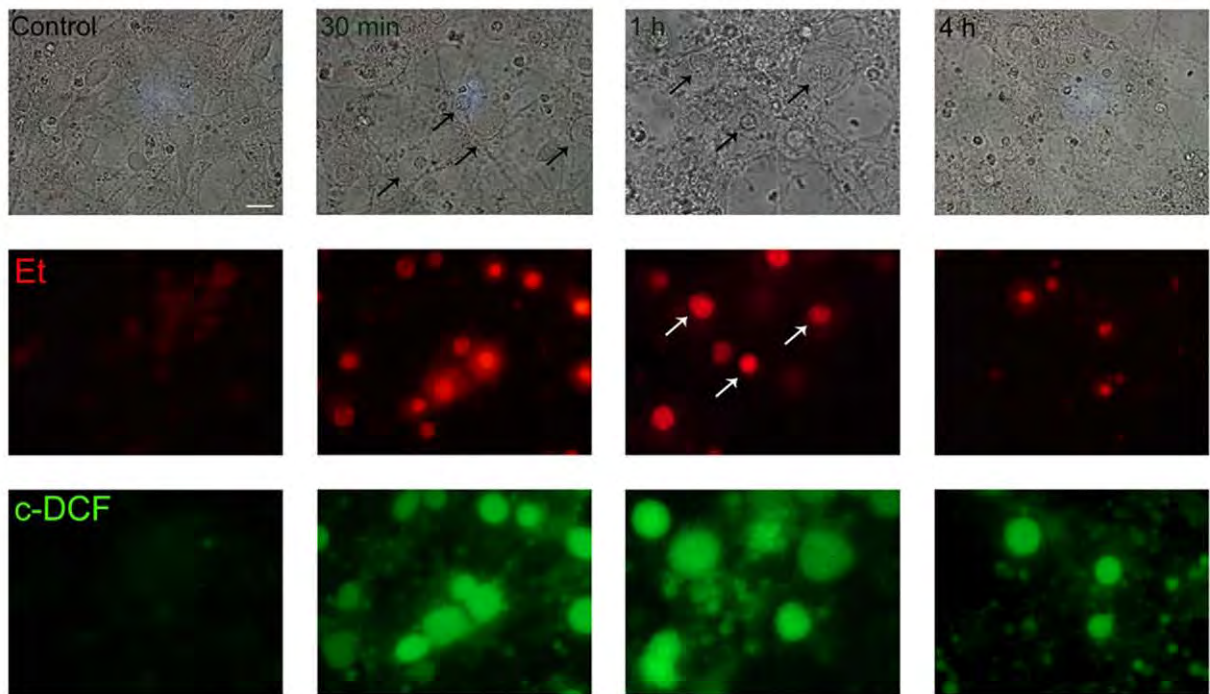
In all cases data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's multiple comparison test and are expressed as mean \pm SEM. Significant differences between data were considered when $P < 0.05$.

RESULTS

RS production during GD

The production of ROS and RNS was determined by means of the fluorescent markers Et and c-DCF at different times after the exposure to glucose-free medium. Results in Fig. 1B show that GD induces a rapid and significant increase in RS from 15 min, reaching a maximum after 1 h. When cells were exposed to GD during 4 h a lower Et fluorescent signal was observed, suggesting that at this time, the production of ROS diminishes or that neurons start to die. Nonetheless, Et fluorescence remained elevated relative to the control condition (Fig. 1B). In the case of c-DCF, a significant increase in the fluorescent signal was detected at later times (1–4 h of GD). A representative experiment showing Et- and c-DCF-positive cells after different exposure times to GD is depicted in Fig. 1A. As can be observed 30 min after GD many cells are positive to both fluorescent markers. At 1 h many cells are still positive to the fluorescent markers, look swollen (arrows in top panel) and nuclei appear shrunken and condensed (arrows in middle panel). At 4 h cultures look damaged, many cell somata are no longer visible and nuclei appear shrunken. From these experiments it can be concluded that 4 h after the continuous exposure to GD many cells are damaged (Fig. 1A).

A



B

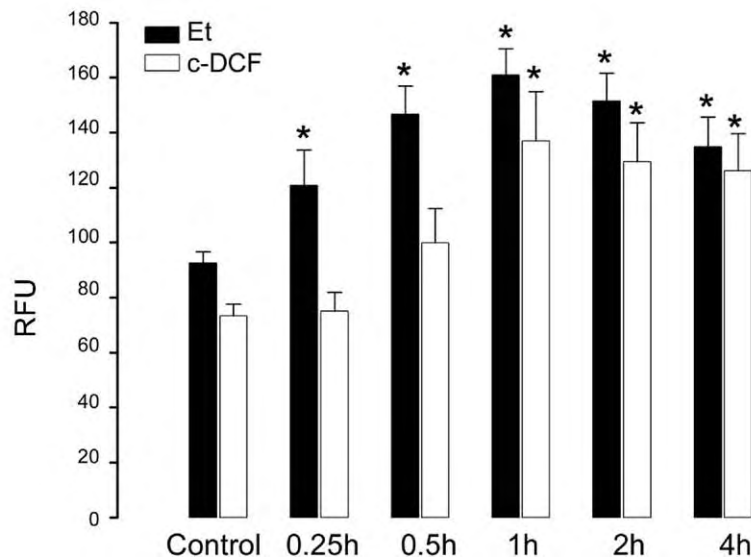


Fig. 1. RS production during the exposure of cultured cells to GD. (A) Photomicrographs from a representative experiment showing positive cells to Et and c-DCF at the indicated times of GD. Scale bar=10 μ m, black arrows show swollen cells and white arrows indicate condensed nuclei. (B) Quantification of RS produced at different times of GD; data are expressed as means \pm SEM of relative fluorescence units (RFU) from six independent experiments * $P < 0.005$ relative to control. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

Antioxidant and enzyme inhibitors reduce ROS production

Subsequently, we studied the effect of antioxidants on the oxidation of DHE to Et and of c-H₂DCFDA to c-DCF during GD. As shown in Fig. 2A, the glutathione peroxidase analogue, ebselen (10 μ M), partially reduced Et and c-DCF

fluorescence. A significant reduction in Et fluorescence was observed from 15 min to 2 h, while in the case of c-DCF ebselen caused a reduction in the fluorescent intensity only at more delayed times (1–4 h). NDGA (50 μ M), a potent scavenger of several ROS and RNS efficiently reduced both Et and c-DCF fluorescent signals even at 4 h

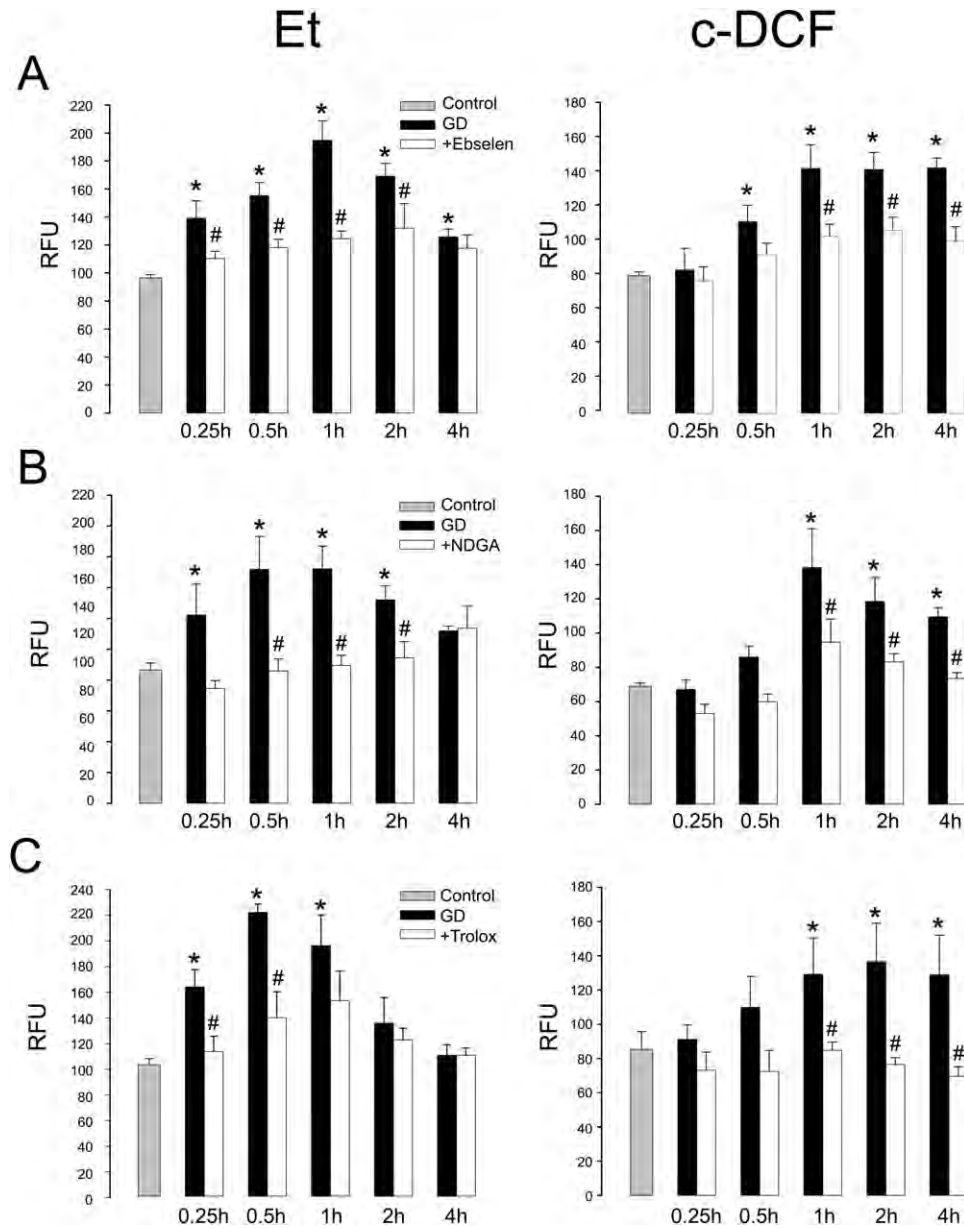


Fig. 2. Effect of antioxidants against GD-induced RS generation. Neurons were incubated during the indicated times in the presence or the absence of 10 μM ebselen (A), 50 μM NDGA (B) and 250 μM trolox (C). Data are expressed in means \pm SEM in relative fluorescence units (RFU) from four to six independent experiments. * $P < 0.005$ relative to control and # $P < 0.05$ relative to GD.

in the case of c-DCF (Fig. 2B). The vitamin E analog, trolox (250 μM) partially reduced the increase in Et fluorescence and this effect was statistically significant only at 15 and 30 min of GD. In contrast, it effectively reduced the increase in c-DCF intensity at later times (Fig. 2C).

Using a pharmacological approach, we attempted to identify the sources of RS generation, through the inhibition of various ROS and RNS producing pathways. In this case, we only show the results for Et fluorescence, because none of the enzymatic inhibitors decreased significantly the c-DCF fluorescent signal. The XaO inhibitor, allopurinol (250 μM), prevented the increase in Et fluorescence induced by 1–2 h exposure to glucose-free medium,

but not that induced by short exposure times (15–30 min) (Fig. 3A). At 100 μM , allopurinol was also effective but not at lower concentrations (Fig. 1 supplemental material). The cPLA₂ inhibitor AACOCF3 (1 μM) efficiently prevented the increase in the Et fluorescent signal at early times, but was less effective in reducing ROS at 2 and 4 h (Fig. 3A). A higher concentration of AACOCF3 (5 μM) also reduced ROS production, while doses lower than 1 μM showed no effect (Fig. 1 supplemental material). Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, showed a very similar effect to that of AACOCF3. At a 500 μM concentration apocynin reduced ROS produced at early times (15 min to 1 h) but not those generated at longer times. Lower concentrations of this

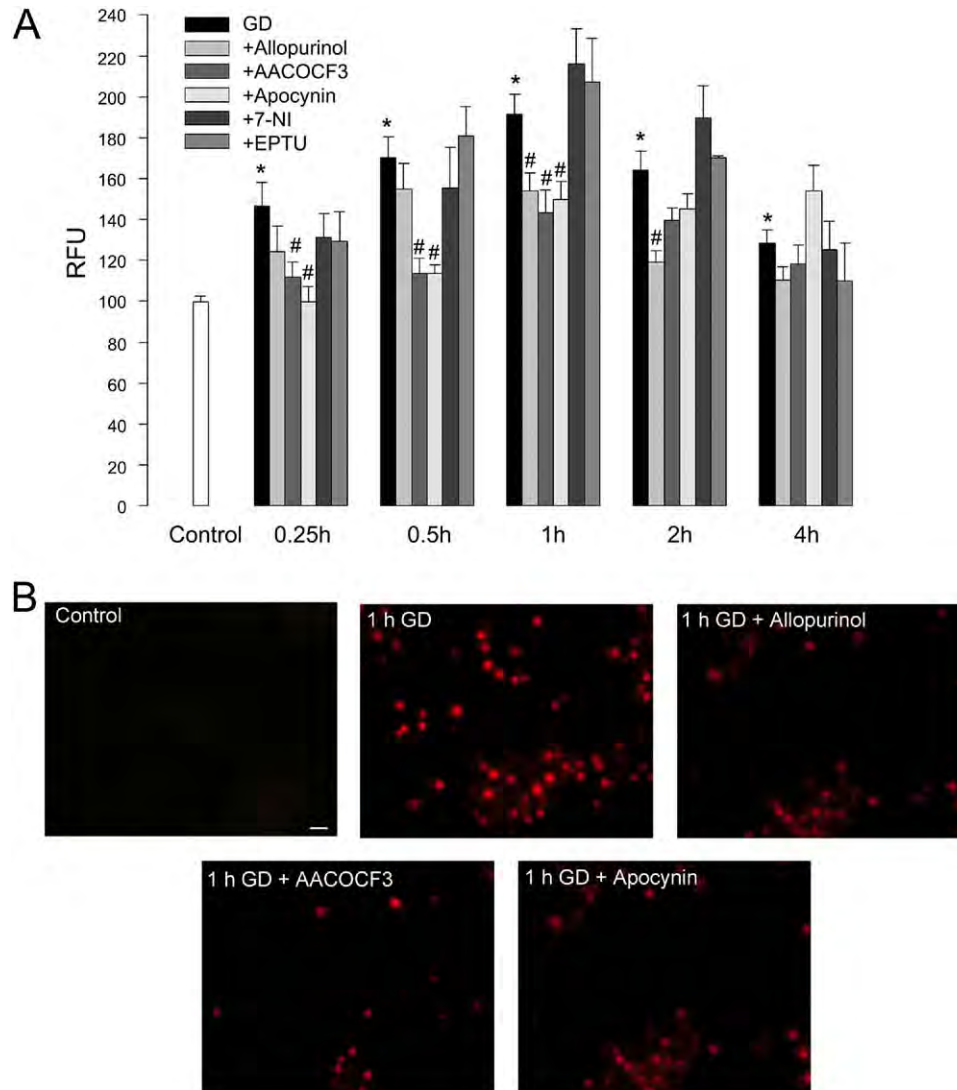


Fig. 3. Effect of different enzyme inhibitors on the increase in Et fluorescence induced by GD. (A) Cells were incubated at indicated times in glucose free medium in the presence or the absence of 250 μ M allopurinol, 1 μ M AACOCF3, 500 μ M apocynin, 10 μ M 7-NI and 500 μ M EPTU. Data are expressed in means \pm SEM in RFU from four to six independent experiments. * $P < 0.005$ relative to control and # $P < 0.05$ relative to GD. (B) Photomicrographs showing the effect of allopurinol, AACOCF and apocynin on the number of Et-positive cells 1 h after GD. Scale bar = 20 μ m.

inhibitor (100 and 250 μ M) showed similar effects (data not shown).

In contrast to these findings, the inhibitors of NOS, 7-NI and EPTU did not reduce the fluorescent signals at any of the times or concentrations tested (Fig. 3A and Fig. 1 supplemental material). Images from representative experiments showing the effect of the different enzyme inhibitors on Et-positive nucleus are shown in Fig. 3B. As can be observed, the number of Et-positive cells is lower in cultures incubated in the presence of allopurinol, AACOCF3 and apocynin. The lack of effect of 7-NI and EPTU is shown in Fig. 1 from the supplemental material.

RS production is calcium-dependent

The effect of the NMDA and non-NMDA receptor antagonists, MK-801 (10 μ M) and NBQX (50 μ M), respectively,

on RS production was also tested. As observed in Fig. 4A, the NMDA receptor blocker, MK-801, completely prevented the increase in the Et signal while that of c-DCF was less sensitive. NBQX significantly reduced the Et signal only at short exposure times (15 min–1 h) and it had no effect on c-DCF fluorescence (Fig. 4A). The incubation with the calcium chelators, BAPTA-AM (100 nM) and EGTA (1 mM) also reduced the fluorescence intensity increase (Fig. 4B) mainly that of Et, suggesting that an early increase in the intracellular calcium concentration might be involved in ROS production.

Based on these findings we aimed to investigate whether GD does induce an increase in the intracellular concentration of calcium. According to the results shown in Fig. 5, cells exposed to glucose-free medium showed a progressive and significant increase in the intracellular

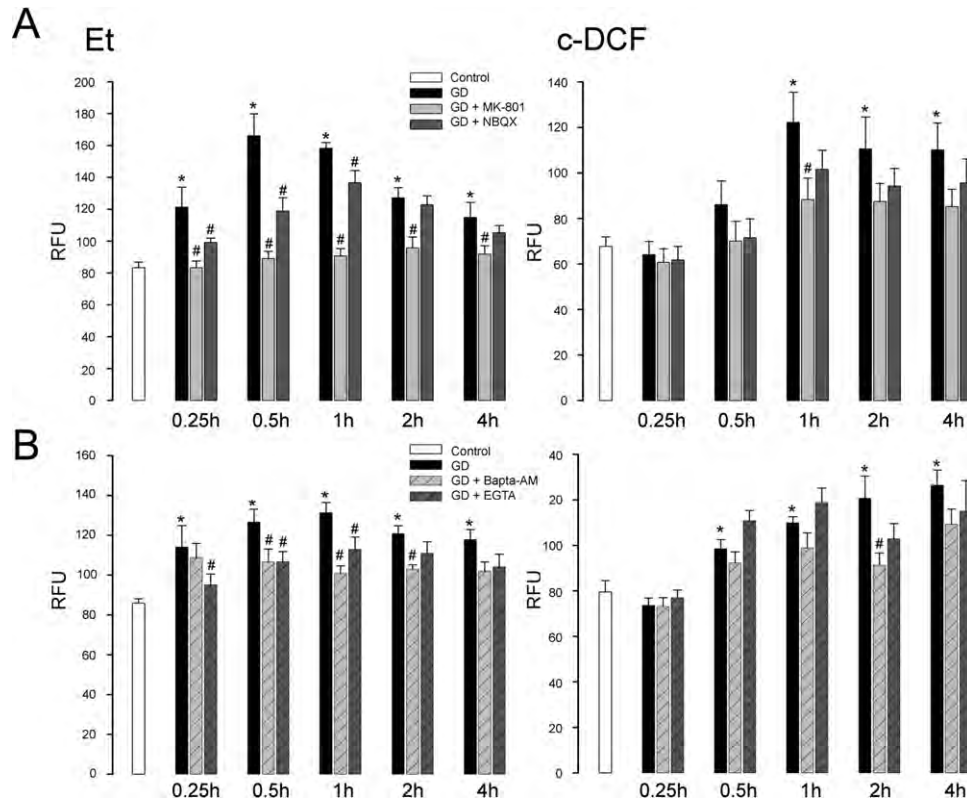


Fig. 4. Effect of glutamate receptor antagonists and calcium chelators on RS production. Neurons were incubated in glucose-free medium for the indicated times in the presence or the absence of the NMDA receptor antagonist MK-801 (10 μ M), the non-NMDA receptor antagonist NBQX (50 μ M) (A), and the calcium chelators EGTA (1 mM) and BAPTA-AM (100 nM) (B). Data are expressed as means \pm SEM in RFU from four to six independent experiments. * $P < 0.005$ relative to control and # $P < 0.05$ relative to GD treatment.

concentration of calcium (Fig. 5B). Increases of 6.4, 4.7, 12.3, 24.6 and 47.7-fold above resting levels were observed after 30, 60, 90 and 120 min of GD, respectively (Fig. 5C). The intracellular concentration of calcium also increased progressively in control cultures maintained in glucose-containing medium (Fig. 5A); however, this increase was significantly smaller than that observed in cultures incubated in the absence of glucose (Fig. 5C). In this case, the maximum change in fluorescence after 2 h was 10-fold. The fluo-4 fluorescence increase in the GD condition was significantly different from the glucose-containing condition as early as 15 min, and it remained significantly different afterwards. The increase in cell resting Fluo-4 fluorescence in glucose containing medium became significant only after 1 h of recording. This increase in resting fluorescence could be due to a number of reasons including photodamage, free radical production and mild calcium homeostasis deterioration. Also, recording conditions, including bath temperature (~ 22 $^{\circ}$ C) and solution composition (HEPES buffered medium) are not optimal for long-time preservation of cellular functions.

After 2 h of GD the transient increase in calcium fluorescence resulting from the depolarization with a high potassium solution was examined in cells from the GD condition and compared to that of control cells (see insets in Fig. 5A, B). As these records show, the calcium rise returned very slowly or did not return to basal levels in cells

deprived from glucose, while the basal levels of calcium were recovered rapidly in most of cells of the control cultures.

The results described above suggest that the intracellular calcium homeostasis is compromised in hippocampal neurons after 2 h of GD. This effect might result from the fall in energy levels and the subsequent failure of energy-dependent calcium-sequestration and calcium-extrusion mechanisms. As expected, we observed that ATP levels progressively decline during the exposure to glucose-free medium. After 15 min of GD ATP levels are significantly lower than control values, and remain low during the next 2 hour (Fig. 6A). After 4 h exposure, ATP levels diminish even further and this effect is statistically different from that observed 1 h after GD. When cells were exposed during 1 h to glucose-free medium and left to recover during 3 h in glucose-containing medium (1 h+3 hR), ATP levels did not recover and remained low (Fig. 6A).

Excitotoxicity is involved in GD-induced neuronal death

The extracellular concentration of glutamate and aspartate was determined 1 and 4 h after the continuous exposure to glucose-free medium. It was observed that after 1 h of GD glutamate concentration significantly increased 2.6-fold relative to control levels, while aspartate concentration did

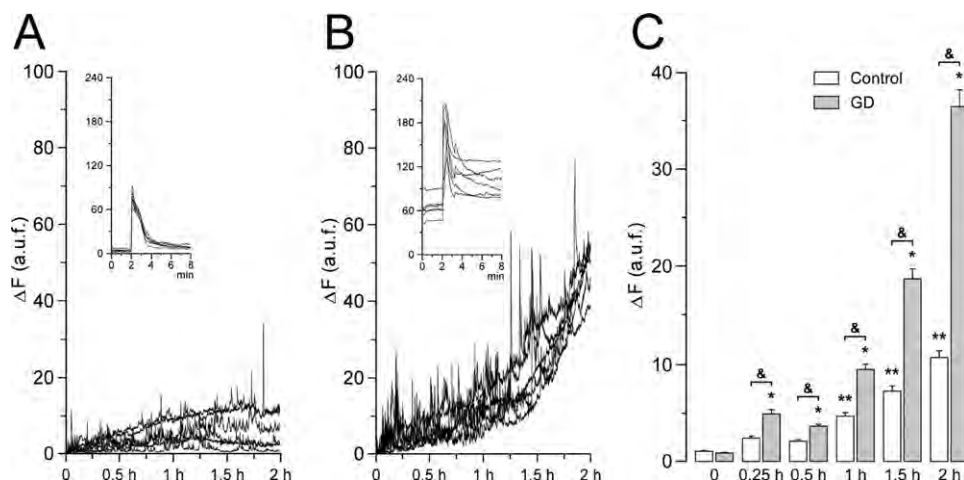


Fig. 5. Time-dependent increase of intracellular calcium concentration in hippocampal neurons in the presence and in the absence of glucose. (A) Fluo-4 net fluorescence increase of six selected neurons from the field of view of a control culture over a 2 h recording period. Spontaneous brief fluorescence increases are visible; perhaps reflecting bursts of electrical activity. A small sustained rise in resting fluorescence is seen in most cells. (B) Fluorescence increase of five selected neurons from the field of view of another culture over a 2 h recording period in glucose-free medium. Spontaneous transient fluorescence increases are larger and more frequent in this case. The sustained rise in resting fluorescence is more conspicuous in this condition. Insets in (A) and (B): examples of calcium transients recorded from the same neurons in response to bath application to High- K^+ medium after 2 h of recording (see Methods). These transient raises decay considerably more slowly in neurons subjected to the glucose-deprived condition. (C) Summary of measurements obtained from 271 neurons in the control condition, and 326 neurons in the glucose deprived condition. $n=4$ independent hippocampal cultures. * $P<0.005$ relative to $T=0$, ** $P<0.005$ relative to $T=0$, & $P<0.005$ relative to cultures recorded in glucose-containing medium.

not change (Fig. 6B). Four hours after the exposure to glucose-free medium glutamate increased further, about 12-fold over control levels, while aspartate levels were also significantly augmented but to a lesser extent (Fig. 6C). This increase was prevented by MK-801, suggesting that amino acid release at this time results from leakage from damaged cells. In contrast, MK-801 had no effect on the increase of glutamate at 1 h, suggesting that the extracellular accumulation of this amino acid at this time results from its release or its reduced removal from the extracellular space. Failure of glutamate clearance is expected because glutamate transporters are energy-dependent and ATP levels are already low after 1 h of GD. In contrast to MK-801, the non-NMDA receptor antagonist, NBQX, did not reduce the accumulation of excitatory amino acids at 4 h, suggesting a major role of NMDA receptors in the induction of neuronal damage and subsequent amino acid leakage.

Based on these observations, we tested the effect of the NMDA and non-NMDA glutamate receptor blockers on neuronal survival. For this purpose cultures were exposed to glucose-free medium during different periods of time (1, 2, 4 and 8 h) in the presence or the absence of MK-801 or NBQX, and cell survival was evaluated by the MTT assay after recovery in glucose-containing medium for periods of 23, 22, 20 and 16 h, respectively. Glutamate receptor antagonists were added during and after GD. As indicated in Fig. 7A, cell survival diminished significantly in 60% when exposed to GD during 1 h. Cell death was prevented by MK-801, and to a lesser extent by NBQX. Longer exposure times (2, 4 and 8 h) to glucose-free medium further increased cell death. This was significantly prevented by both MK-801 and NBQX, although MK-801 showed better

protection. Thus, an excitotoxic mechanism is involved in neuronal damage triggered by energy failure and the accumulation of excitatory amino acids in the extracellular space. As shown in Fig. 7B, 23 h after 1 h exposure to GD, the number of dark cells with a normal morphology is reduced while neurites look thinner and fragmented. When MK-801 and NBQX were present many dark normal-appearing cells can be observed, as in control cultures. In agreement with MTT data, cultures incubated with MK-801 are better preserved.

The protective effect of MK-801 and NBQX was corroborated by monitoring LDH release and was compared to that of antioxidants. As observed in Fig. 8A, both antagonists of ionotropic glutamate receptors completely prevented neuronal damage induced by 1 h GD. The antioxidants ebselen and trolox, also partially reduced LDH release in about 30%, although the effect of trolox was only significant when analyzed against the GD condition separately from the other compounds. On the other hand, neuronal death induced by 1 h GD was partially reduced in about 25% in the presence of allopurinol, AACOCF3 and apocynin (Fig. 8B). The allopurinol metabolite oxypurinol, reduced cell death to the same extent as allopurinol. All these inhibitors, with the exception of apocynin, were equally effective in reducing neuronal death either when incubated only during GD, or during and after GD. In contrast, 1 mM apocynin prevented neuronal death only when present during both the GD and the recovery periods (Fig. 8B).

NDGA showed no protection against neuronal death despite it prevented ROS production; in fact it exerted some toxicity at 50 μM as monitored by the MTT assay (data not shown). At 15 μM NDGA elicited no toxicity and

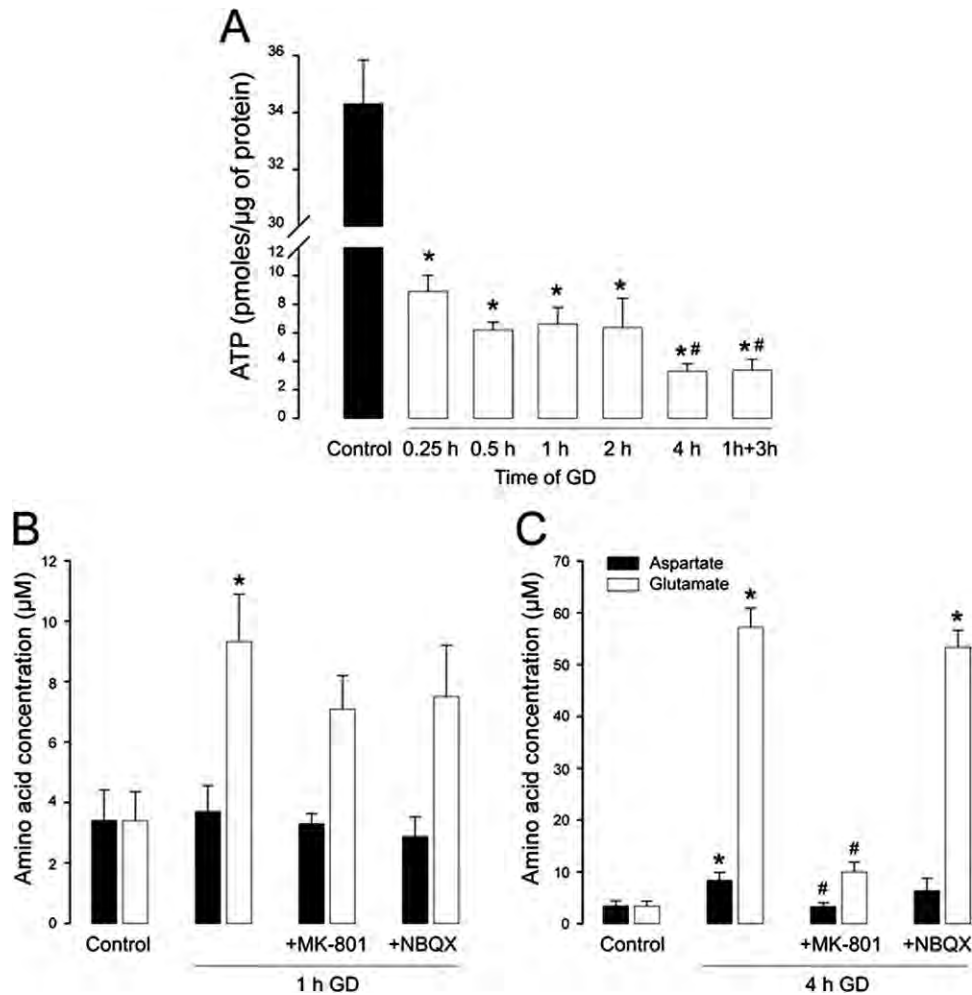


Fig. 6. ATP and amino acid levels after culture exposure to GD. (A) ATP levels were determined by the luciferin–luciferase assay after exposing cells to glucose-free medium during the indicated times. Data are expressed as means±SEM from four independent experiments. * $P<0.0001$ relative to control, # $P<0.05$ relative to 1 h GD. (B, C) Amino acid concentration as determined 1 and 4 h after GD. Culture medium was collected at the indicated times after GD and glutamate and aspartate levels were measured by HPLC. Data are expressed as means±SEM from three independent experiments. * $P<0.05$ relative to control and # $P<0.05$ relative to GD treatment.

significantly reduced Et fluorescence (Control=89.5±4.3; GD=156.7±7.4; GD+NDGA=102.5±12.9 $P=0.0014$, $n=4$, data from 1 h exposure to GD), however no significant protection was observed at this concentration, according to the MTT assay (control=0.410±0.046; GD 0.193±0.022; GD+NDGA 0.26±0.060, $n=3$). The NOS inhibitors 7-NI and EPTU showed no protection (data not shown).

DISCUSSION

The present study demonstrates that GD rapidly stimulates RS production, by a mechanism involving the activation of NMDA receptors. In particular, the Et fluorescence increase was reduced by NMDA receptor blockade and the calcium chelators, EGTA and BAPTA-AM. Since DHE is mainly oxidized by superoxide, although it is also a target of other RS (Gomes et al., 2005; Zhao et al., 2003; Robinson et al., 2006), this observation suggests that superoxide is produced during the early stages of GD, and that

its generation involves calcium-dependent pathways. Accordingly, we measured a progressive increase in the intracellular concentration of calcium during the GD period. This increase was significantly different from the control condition as soon as 15 min of GD, in agreement with the early increase in RS production. Therefore, the increase in intracellular calcium can lead to the activation of RS generating enzymes early during GD.

Results show that XaO and cPLA₂ inhibitors, two calcium-dependent enzymes, reduced the fluorescent signal produced by DHE oxidation. Xanthine dehydrogenase is converted to XaO by Ca²⁺-dependent proteolysis and oxidation of –SH groups, driving the oxidation of accumulated hypoxanthine to xanthine during ATP depletion, causing the generation of superoxide and H₂O₂. The participation of this enzyme in the present conditions was expected because ATP levels rapidly decline and NMDA receptors are activated, leading to calcium influx. According to the results, XaO activity will participate in superoxide

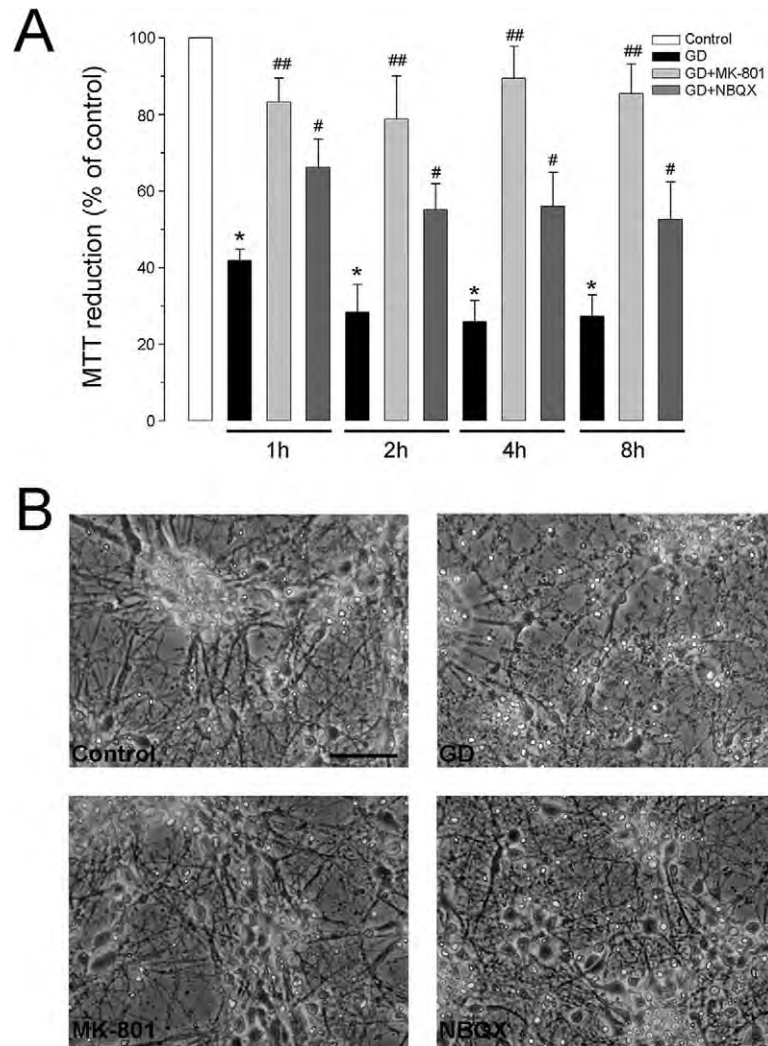


Fig. 7. Protective effect of glutamate receptor antagonists against GD-induced neuronal death. (A) Neurons were exposed during the indicated times to glucose-free medium and MTT reduction was measured 16–24 h later. Data are expressed as means \pm SEM in percent of control values from five independent experiments. * $P < 0.001$ relative to control and ## $P < 0.0001$ and # $P < 0.05$ relative to GD treatment. (B) Photomicrographs of a representative experiment taken 24 h after 1 h exposure of cultured cells to GD. Scale bar = 50 μ m.

production after 1 and 2 h of GD but not at earlier times. On the other hand, cPLA₂ activity is stimulated by calcium and its activation leads to the breakdown of phospholipids releasing arachidonic acid for the synthesis of prostaglandins and leukotrienes. The metabolism of arachidonic acid through cyclooxygenases and lipoxygenases leads to the generation of OH[•] and superoxide (Nanda et al., 2007). Inhibition of cPLA₂ by AACOCF₃ reduced the Et fluorescence signal, suggesting superoxide production through this pathway. Results also suggest that this pathway is activated during the early phases of GD since AACOCF₃ abolished the increase in Et fluorescence during short exposure times to GD. In agreement, NDGA also importantly reduced Et and c-DCF fluorescent signals. Besides its scavenging action (Floriano-Sánchez et al., 2006), NDGA is an inhibitor of lipoxygenases, potentially reducing the production of superoxide during arachidonic acid metabolism (Nanda et al., 2007). In agreement with these observations, a role of 12-LOX on neuronal death induced by

GD and glucose reperfusion has been recently demonstrated (Nagasawa et al., 2007). The present results agree with previous observations supporting the role of cPLA₂ and XaO on ROS generation and neuronal death during ischemia/reperfusion (Owada et al., 1994; Saluja et al., 1997; Arai et al., 2001; Lin and Phillis, 1991; Abramov et al., 2007), and suggests that the activation of these enzymes is related to the hypoglycemic component of the ischemic episode. In the present experimental conditions activation of these Ca²⁺-dependent enzymes would result from the increase in the intracellular concentration of calcium recorded during the GD episode.

In contrast to XaO and cPLA₂, the activity of NOS, which is also calcium-dependent, does not appear to have an important contribution to RS production in our cell model, since neither 7-NI nor EPTU, two inhibitors of the three isoforms of NOS (endothelial, inducible and neuronal) (Babbedge et al., 1993; Garvey et al., 1994; Nakane et al., 1995; Southan et al., 1995) reduced the fluorescence

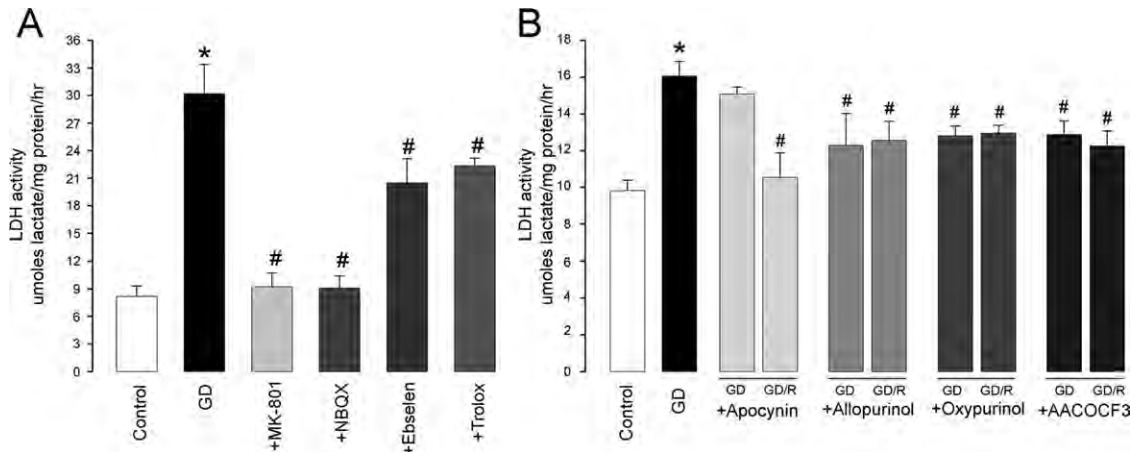


Fig. 8. (A, B) Effect of glutamate receptor antagonists, antioxidants and different enzyme inhibitors on neuronal death induced by GD as assessed by LDH release. Neurons were incubated in glucose-free medium during 1 h in the presence or the absence of MK-801 (10 μ M), NBQX (50 μ M), apocynin (1 mM), allopurinol (250 μ M), oxypurinol (50 μ M), AACOCF3 (1 μ M), trolox (1 mM) or ebselen (10 μ M). LDH activity was measured 17–24 h after GD treatment. Results are expressed as means \pm SEM from three to five independent experiments. GD and GD/R indicate that inhibitors were present either only during the GD period, or during the GD and the recovery period. * $P < 0.05$ relative to control and # $P < 0.05$ relative to GD. The effect of trolox was significant only when analyzed against the GD condition separately from the other compounds.

increase nor cell death. In agreement with this observation, other studies have previously shown no effect of NOS inhibition on the production of RS during ischemic/hypoglycemic conditions *in vitro* (Rego et al., 1999; Papadopoulos et al., 1997).

In addition to Ca^{2+} -dependent enzymatic pathways, the present data predict that other routes, not activated by calcium, might contribute to RS generation, because neither EGTA nor BAPTA-AM reduced completely Et or c-DCF fluorescent signals, and glutamate receptor antagonists reduced only partially the c-DCF signal. We observed that the Et fluorescence was very effectively inhibited by apocynin, suggesting that superoxide production by NADPH oxidase also plays a role in the present experimental conditions. The activity of this enzyme contributes mainly to the early production of superoxide, since apocynin diminished ROS production at early times (15 min–1 h). The activation of this enzyme might result from the stimulation of NMDA receptors and the subsequent activation of protein kinase C (Kishida et al., 2005; Shelat et al., 2008; Brennan et al., 2009). Another RS producing pathway possibly involved in the present experimental conditions, is the mitochondria. In a previous study, a calcium-dependent superoxide production by mitochondria was observed in cerebellar granule neurons exposed to GD (Isaev et al., 2008).

Based on the present data, we suggest that superoxide production resulting from the activation of XaO and cPLA₂ during the GD period, contribute to neuronal death since the inhibitors of these enzymes prevented neuronal damage, at least partially. In contrast, superoxide produced by NADPH oxidase during the recovery period, when glucose concentrations are restituted, seems to contribute more importantly to neuronal damage than superoxide generated by this enzyme during GD, since apocynin prevented neuronal death only when it was present during and after the GD period. These observations are in agreement with

recent data suggesting that NADPH oxidase is mainly activated during the glucose reintroduction period, when NADPH is produced by glucose oxidation through the pentose pathway (Suh et al., 2007, 2008).

The antioxidants trolox and ebselen were also able to reduce the production of RS and showed partial protection against neuronal death. Increased cell survival by antioxidants such as vitamin E has been previously reported in conditions of glycolysis inhibition (Rego et al., 1999; Hernández-Fonseca et al., 2008). In addition, trolox is able to enhance the protective effect of the NMDA receptor antagonist dextorphan, against neuronal death induced by GD (Chow et al., 1994). Ebselen mimics the action of glutathione peroxidase (Müller et al., 1984; Maiorino et al., 1988) preventing the propagation of lipid peroxidation. Moreover, ebselen at low concentrations inhibits lipoxygenases, NADPH oxidase and NOS (Schewe, 1995). In contrast, NDGA exerted only a slight non-significant protective against neuronal death, even when a non-toxic concentration was used. This result is controversial because NDGA inhibited RS production as effectively as other antioxidants showing protection. More experiments are needed in order to elucidate the lack of effect of NDGA against neuronal death in the present conditions.

Altogether, our present observations suggest that oxidative stress contributes to neuronal death induced by GD. However, this is not the only mechanism involved, because none of the enzyme inhibitors or the antioxidant tested prevented completely the death of neurons. In contrast, glutamate receptor antagonists, particularly, MK-801 effectively prevented neuronal death, suggesting that other calcium-dependent processes initiated by excitotoxicity are involved.

Most *in vivo* studies on hypoglycemic damage have been performed in animals subjected to a 30–60 min period of coma (Auer et al., 1984a; Suh et al., 2003, 2007), and studies demonstrate that RS production contributes to

the subsequent death of neurons (Suh et al., 2007, 2008). On the other hand, recent investigations have shown that the hypoglycemic condition, even in the absence of iso-electricity, might induce discrete neuronal damage in vulnerable regions, such as the cerebral cortex, when it is sustained for prolonged periods of time (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008; Haces et al., 2010). Furthermore, increased lipoperoxidation has been observed in the hippocampus, cerebral cortex and the striatum of hypoglycemic animals not subjected to a coma period (Patočková et al., 2003; Haces et al., 2010). These observations together with the present results support the hypothesis that the hypoglycemic condition is sufficient to stimulate RS production, and that XaO, cPLA₂, LOX and NADPH oxidase are involved in ROS production early after glucose withdrawal. Whether these enzymes contribute to the early production of RS during *in vivo* hypoglycemia, remains to be studied.

Acknowledgments—The authors thank Ms. Teresa Montiel for her technical assistance. This work was supported by CONACyT 48645-Q grant to L.M. and 221021 and 194940 CONACyT fellowships to B.P. and A.M.E-S.

REFERENCES

- Abramov AY, Scorziello A, Duchon MR (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27:1129–1138.
- Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, Kudo I, Nishiyama N, Matsuki N (2001) Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur J Neurosci* 13:2319–2323.
- Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK (1984a) Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 33:1090–1098.
- Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK (1984b) The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 64:177–191.
- Babbidge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK (1993) Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol* 110:225–228.
- Bergmeyer HU, Bernt EH (1968) *Methods of enzymatic analysis*, pp 736–741. New York: Academic Press.
- Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474–482.
- Bindokas V, Jordan J, Lee C, Miller R (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16:1324–1336.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12:857–863.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum free medium combination. *J Neurosci Res* 35:567–576.
- 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.
- Ennis K, Tran PV, Seaquist ER, Rao R (2008) Postnatal age influences hypoglycemia-induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res* 1224:119–126.
- Estrada-Sánchez AM, Camacho A, Montiel T, Massieu L (2007) Cerebellar granule neurons are more vulnerable to transient transport-mediated glutamate release than to glutamate uptake blockade. Correlation with excitatory amino acids levels. *Neurochem Res* 32:423–432.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-Gonzalez DJ, Cardenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J (2006) Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40:523–533.
- Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Fowler M, Marshall S, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES (1994) Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* 269:26669–26676.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JL (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 65:45–80.
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211:85–96.
- Haces ML, Montiel T, Massieu L (2010) Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165:28–38.
- Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008) Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86:1768–1780.
- Hernández-Fonseca K, Massieu L (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 82:196–205.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241–251.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Plotnikov EY, Kuvshinova EA, Zorov DB (2008) Mitochondrial free radical production induced by glucose deprivation in cerebellar granule neurons. *Biochemistry Mosc* 73:149–155.
- Kalimo H, Auer RN, Siesjö BK (1985) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. III. Light and electron microscopic findings in the rat caudoputamen. *Acta Neuropathol* 67:37–50.
- Kishida KT, Pao M, Holland SM, Klann E (2005) NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 94:299–306.
- Lin Y, Phillis JW (1991) Oxypurinol reduces focal ischemic brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 126:187–190.
- Maiorino M, Roveri A, Ursini F (1988) Antioxidant effect of ebselen (PZ 51): peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. *Arch Biochem Biophys* 295:404–409.
- 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.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- Müller A, Cadenas E, Graf P, Sies H (1984) A novel biologically active seleno-organic compound. I. Glutathione peroxidase-like activity *in-vitro* and antioxidant capacity of PZ 51 (ebselen). *Biochem Pharmacol* 33:3235–3239.

- Nagasawa K, Kakuda T, Higashi Y, Fujimoto S (2007) Possible involvement of 12-lipoxygenase activation in glucose-deprivation/reload-treated neurons. *Neurosci Lett* 429:120–125.
- Nakane M, Klinghofer V, Kuk JE, Donnelly JL, Budzik GP, Pollock JS, Basha F, Carter GW (1995) Novel potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase. *Mol Pharmacol* 47:831–834.
- Nanda BL, Nataraju A, Rajesh R, Rangappa KS, Shekar MA, Vishwanath BS (2007) PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants—a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem* 7:765–777.
- Okada Y, Tominaga T, Yoshimoto T, Kondo H (1994) Molecular cloning of rat cDNA for cytosolic phospholipase A2 and the increased gene expression in the dentate gyrus following transient forebrain ischemia. *Mol Brain Res* 25:364–368.
- Papadopoulos MC, Koumenis IL, Dugan LL, Giffard RG (1997) Vulnerability of glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res* 748:151–156.
- Patočková 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.
- 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 Radic Biol Med* 26:1405–1407.
- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15038–15043.
- Saluja I, Song D, Oregan MH, Phillis JW (1997) Role of phospholipase A2 in the release of free fatty acids during ischemia-reperfusion in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 233:97–100.
- Sandberg M, Butcher ST, Hagberg H (1986) Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47:178–184.
- Schewe T (1995) Molecular actions of ebselen—an anti-inflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 26:1153–1169.
- Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2008) Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106:45–55.
- Southan GJ, Szabó C, Thiernemann C (1995) Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br J Pharmacol* 114:510–516.
- 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.
- Suh SW, Gum E, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117:910–918.
- Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, Chan PH, Swanson RA (2008) Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1697–1706.
- Tkacs NC, Pan Y, Raghupathi R, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2005) Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1645–1655.
- Wieloch T (1984) Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34:1359–1368.

APPENDIX

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.074](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.074).

(Accepted 28 February 2010)
(Available online 10 March 2010)

15. Referencias

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006), Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53.
- Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007), Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27:1129–1138.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001), Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615.
- Alt A, Weiss B, Ogden AM, Knauss JL, Oler J, Ho K, Large TH, Bleakman D (2004), Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 46:793–806.
- Alvarez B, Radi R (2003), Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25:295–311.
- Anwyl R (1999), Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 29:83–120.
- Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, Kudo I, Nishiyama N, Matsuki N (2001), Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur J Neurosci* 13:2319–2323.
- Attwell D, Laughlin SB (2001), An energy budget for signaling in the gray matter of the brain. *J Cereb Blood Flow and Metab* 10:1133–1145.
- Attwell D, Gibb A (2005), Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Review Neuro* 6:841–849.
- Auer RN, Olsson Y, Siesjo BK (1984a) Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 33:1090–1098.
- Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjo BK (1984b), The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 64:177–191.
- Auer RN (2004), Hypoglycemic brain damage. *Metab Brain Dis* 19:169–175.
- Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL (2002), Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med*. 32:841–859.
- Baker AB (1938), Cerebral lesions in hypoglycemia. II. Some possibilities of irrevocable damage from insulin shock. *Arch Pathol* 26:765–776.
- Ballesteros JR, Mishra OP, McGowan JE (2003), Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol Neonate* 84:159–163.
- Barret EJ (2009), The endocrine pancreas. En “Medical Physiology: Cellular and Molecular approach” editado por Baron WF y Boulpaep EL Capitulo 51 pp. 1074:1093, Saunders, PA.
- Beal MF, Shults CW (2003), Effects of Coenzyme Q10 in Huntington’s disease and early Parkinson’s disease. *Biofactors* 18:153–161.
- Beart PM, O’Shea RD (2007), Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Brit J Pharmacol* 105:5–17.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996), NO[•], O₂^{•-} and ONOO⁻ the good, the bad and the ugly- *Am J Physiol* 271:C1424–1437.
- Berridge MJ (1993), Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315–325.
- Berridge, MJ, Bootman MD, Lipp P (1998), Calcium—a life and death signal. *Nature* 395:645–648.
- Bindokas V, Jordan J, Lee C, Miller R (1996), Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16:1324–1336.
- Bird GS, Putney Jr JW (2006), Calcium. En “Basic Neurochemistry” editado por Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST y Price MD Capitulo 22 pp. 379–390, Academic Press, NY.
- Boudker O, Ryan RM, Yernool D, Shimamoto K, Gouraux E (2007), Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* 445:387–393
- Braitenberg V, Schuz A, Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity, 2da edición. Berlin, Springer, 1998.
- Bergmeyer HU, Bernt EH (1968), Methods of enzymatic analysis, pp. 736–741. New York: Academic Press.
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA (2009), NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12:857–863.
- Brigelius-Flohe R (1999), Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27:951–965.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004), Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817–C833.
- Carafoli E (1991), The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu Rev Physiol* 53:531–547.
- Carafoli E (1997), Regulation of calcium signaling in cells. En “Calcium and cellular metabolism: Transport and regulation” editado por Sotelo JR y Benech JC. Capitulo 1 pp 1–15, Plenum Press, NY.
- Carafoli E (2002), Calcium signaling: A tale for all seasons. *PNAS* 99:1115–1122.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979), Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527–605.
- Choi DW, (1987), Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369–379.

- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987), Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368.
- Choi DW, Koh JY, Peters S (1988), Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8:185-196.
- Choi DW (1988), Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.
- 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.
- Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson SB (1994), Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediate. *PNAS* 91: 3680-3684.
- Conn PJ (2003), Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann NY Acad Sci* 1003: 12-21.
- Conn PJ, Pin JP (1997), Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Cooper AJL (1997), Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. En: *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* editado por: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Kunk LM pp. 1195-1230, Butterworth Heinemann, Boston.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993), Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Crompton M (1999), The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341:233-249.
- Cryer PE (2003), Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes care* 26:1902-1912.
- Cryer PE (2006), Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 116:1470-1473.
- Cryer PE (2007), Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J Clin Invest* 117:868-870.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1959), Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* 183:611-612.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992), An $[Na^{++}/K^{+}]$ -coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295-310.
- Danbolt NC (2001), Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Davidson MB (2009), Hypoglycemia in adults. En "Manual of Endocrinology and metabolism" editado por: Lavin N. Capítulo 35 pp. 526-544, Lippincott Williams y Wilkins.
- Dawson VL, Dawson TM (2004), Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 36:287-294.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991), Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *PNAS* 88:6368-6371.
- Dykens JA, Stern A, Trenkner E (1987), Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J Neurochem* 49:1222-1228.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999), The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dringen R (2000), Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J (1988), NMDA receptors activate the arachidonic release cascade system in striatal neurons. *Nature* 336:68-70.
- Dumuis A, Sebben M, Fagni L, Prézeau L, Manzoni O, Cragoe EJ Jr, Bockaert J (1993), Stimulation by glutamate receptors of arachidonic acid release depends on the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger in neuronal cells. *Mol Pharmacol* 43:976-981.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin T-S, Goldberg MP, Choi DW (1995), Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15:6377-6388.
- Dykens JA (1994), Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 63:584-591.
- Dwyer DS, Vannucci SJ, Simpson IA (2002), Expression, regulation and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. *Int Rev Neurobiol* 51:159-188.
- Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Haganir RL (1996), Inactivation of NMDA receptor by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745-755.
- Fazekas JF, Alman RW, Parrish AE (1951), Irreversible posthypoglycemic coma. *Am J Med Sci* 222:640-643.
- Fisher SK, Agranof BW (1987), Receptor activation and inositol lipid hydrolysis in neuronal tissues. *J Neurochem* 48:999-1017.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sanchez-Gonzalez DJ, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J (2006), Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40:523-533.

- Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T (1998), Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 18:5151-5159.
- Fridovich I (1989), Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264:7761-7764.
- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997), Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363-8375.
- Goudet C, Magnaghi V, Landry M, Nagy F, Gereau RW IV, Pin JP (2009), Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Res Rev* 60:43-56.
- Haces ML, Montiel T, Massieu L (2010), Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165:28-38.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1992), Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307:108-112.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999), *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edition, Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell B (2001), Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716.
- Halliwell B (2006), Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
- Hamilton SL (2005), Ryanodine receptors. *Cell Calcium* 38:253-260.
- Hart PE, Lodi R, Rajagopalan B, Bradley JL, Crilley JG, Turner C, Blamire AM, Manners D, Styles P, Schapira AH, Cooper JM (2005), Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch Neurol* 62:621-626.
- Hassel B, Dingledine R (2006), Glutamate. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel GJ, Albers RW, Brady ST y Price MD Capítulo 15 pp. 267-290, Academic Press, NY.
- Hayashi T (1954), Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* 3:183-192.
- Hayton SM, Muller DP (2004), Vitamin E in neural and visual function. *Ann NY Acad Sci* 1031:263-270.
- Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008), Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86: 1768-1780.
- Hernández-Fonseca K, Massieu L (2005), Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 82:196-205.
- Hille R, Nishino T (1995), Flavoprotein structure and mechanism. Part IV: xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 9: 995-1003.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993), Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994), Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-1885.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Plotnikov EY, Kuvshinova EA, Zorov DB (2008), Mitochondrial free radical production induced by glucose deprivation in cerebellar granule neurons. *Biochemistry Mosc* 73:149-155.
- Kew JNC, Kemp JA (2005), Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179:4-29.
- Kim CH, Lee J-Y, Roche KW (2008), Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J Neurosci Res* 86:1-10.
- Kishida KT, Pao M, Holland SM, Klann E (2005), NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 94: 299-306.
- Kostyuka P, Verkhratsky A (1994), Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience* 63:381-404.
- Leist M, Nicotera P (1999), Calcium and cell death. En "Cell death and Diseases of the Nervous System" editado por Koliatsos VE y Ratan RR. Capítulo 4 pp. 69-90, Human Press Inc., Totowa NJ.
- Lin Y, Phillis JW (1991), Oxypurinol reduces focal ischemic brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 126:187-190.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994), Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X (1996), Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157.
- 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.
- Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, and Revillard JP (1995) Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21: 275-283.
- Lodge D (1997), Subtypes of glutamate receptors. En "The ionotropic glutamate receptors", editado por Monaghan DT y Wenthold RJ. Capítulo 1 pp. 1-38. Human Press Inc Totowa, NJ.
- Lucas, DR, Newhouse, JP (1957), The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* 58:193-2.

- Maier CM, Pak HC (2002), Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8:323-334.
- Maiorino M, Roveri A, Ursini F (1988), Antioxidant effect of ebselen (PZ 51): Peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. *Arch Biochem Biophys* 295:404-409.
- Maiorino M Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L (1995), Probing the presumed catalytic triad of Se-containing peroxidases by mutational analysis *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:651-660.
- Massieu L, Montiel T, del Rífo 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.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (1997), A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid b-peptide. *J. Neurochem.* 68:255-264.
- Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG (1992), NMR determination of the TCA cycle rate and alpha-ketoglutarate/glutamate exchange rate in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:434-47.
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S (1991), Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for calcium-binding protein Calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 6:41-51.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M. (2002), Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100: 43-52.
- Mayer M.L., Westbrook GL, Guthrie PB (1984), Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature (Lond.)* 309: 261-263.
- Mayes PA (1984) Regulación del metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos. En *Bioquímica de Harper*. DW Martin Jr, PA Mayes y VW Rodwell editores. Capítulo 19 pp 249-265. El Manual Moderno México DF.
- McCord JM (1985), Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-163.
- 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.
- McKenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe S (2006), Energy metabolism of the brain. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST y Price MD. Capítulo 31 pp. 531-557, Academic Press, NY.
- Miljanich GP, Ramachandran J (1995), Antagonists of Neuronal Calcium Channels: Structure, Function, and Therapeutic Implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 35:707-734.
- Mitchell P (1966), Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, Glynn Research, Bodmin.
- Moley KH, Mueckler MM (2000), Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 5:99-105.
- Moncada S, Higgs EA (1995), Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9:1319-30.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992), Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-21.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Müller A, Cadenas E, Graf P, Sies H (1984), A novel biologically active seleno-organic compound. I. Glutathione peroxidase-like activity in-vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (ebselen). *Biochem Pharmacol* 33:3235-3239.
- Murphy S (2000), Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1-13.
- Nagasawa K, Kakuda T, Higashi Y, Fujimoto S (2007), Possible involvement of 12-lipoxygenase activation in glucose-deprivation/reload-treated neurons. *Neurosci Lett* 429:120-125.
- Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P (1996), Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience*.73:185-200.
- Nanda BL, Nataraju A, Rajesh R, Rangappa KS, Shekar MA, Vishwanath BS (2007), PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants- a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem* 7:765-777.
- Nehlig A, de Vasconcelos AP (1993), Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 40:163-221.
- 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.
- Nelson DL, Cox MM (2000), *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 15 Glycolysis and the metabolism of hexoses. 3rd edition Worth Publishers pp 527-566.
- Nelson DL, Cox MM (2000), *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 23 Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism. 3rd edition Worth Publishers pp 527-566.
- Nestler EJ, Duman RS (2006), G proteins. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST y Price MD Capítulo 19 páginas 335-345. Academic Press, New York.

- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001), Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988), Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451:205–212.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984), Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 307: 462–465.
- Olney JW (1969), Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719–721.
- Ong WY, Lu XR, Hu CY, Halliwell B (2000), Distribution of hydroxynonenal-modified proteins in the kainate-lesioned rat hippocampus: evidence that hydroxynonenal formation precedes neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 28: 1214–1221.
- Owada Y, Tominaga T, Yoshimoto T, Kondo H (1994), Molecular cloning of rat cDNA for cytosolic phospholipase A2 and the increased gene expression in the dentate gyrus following transient forebrain ischemia. *Mol Brain Res* 25:364–368.
- Palmada M, Centelles JJ (1998), Excitatory amino acid neurotransmission pathways for metabolism and reuptake of glutamate in brain. *Frontiers in Bioscience* 701–718.
- 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.
- 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.
- Páramo B (2008), Muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa: participación de la excitotoxicidad y el estrés oxidativo. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias.
- Parks E, Traber MG (2000), Mechanisms of vitamin E regulation: research over the past decade and focus on the future. *Antioxid. Redox Signal* 2:405–412.
- Patockova J, Marhol P, Tumova E, Kršiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkowska J, Anđel M (2003), Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res* 52:131–135.
- Pierre K, Pellerin L (2005), Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94:1–14.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeburg E, Kanner BI (1992), Cloning expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464–467.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A (1996), NO inhibits electron transfer and increases $O_2^{\cdot -}$ production in rat heart mitochondria and submitochondria particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85–92.
- Pryor WA, Squadrito GL (1995), The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of NO with $O_2^{\cdot -}$. *Am J Physiol* 268:L699–L722.
- 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.
- Reynolds IJ, Hastings TG (1995), Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15:3318–3327.
- Rothman SM, Olney JW (1995), Excitotoxicity and the NMDA receptor—still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 18:57–58.
- Roy S, Lado BH, Khanna S, Sen CK (2002), Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis. *FEBS Lett* 530:17–23.
- Saez GT, Bannister WH, Bannister JV (1990), Free radicals and thiol compounds --the role of glutathione against free radical toxicity. In: Vina, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 237–254.
- Sakel M (1937), The methodical use of hypoglycemia in the treatment of psychoses. *Am J Psychiatry*. 94:111–129.
- Saluja I, Song D, Oregan MH, Phillis JW (1997), Role of phospholipase A2 in the release of free fatty acids during ischemia-reperfusion in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 233:97–100.
- Salt TE, Herrling PL (1991) Excitatory amino acid transmitter function in mammalian central pathways. En *Excitatory amino acid synaptic transmission* editado por Howard Wheal y Alex Thompson capítulo 10 pp 155–170.
- Sandberg M, Butcher ST, Hagberg H (1986), Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem* 47:178–184.
- Sawyer DT, Valentine JS (1981), How super is superoxide? *Acc Chem Res* 14: 393–400.
- Schewe T (1995), Molecular actions of ebselen—an anti-inflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 26:1153–1169.
- Seeburg PH, Hartner J (2003), Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr Opin Neurobiol* 13:279–283
- Shashidharan P, Plaitakis A (1993), Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human cerebellum. *Biochim Biophys Acta* 1216:161–164.
- Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2008), Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106:45–55.

- Sheu KF, Blass JP (1999), The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *Ann. N Y Acad Sci* 893:61–78.
- Shigemoto R, Mizuno N (2000), Metabotropic glutamate receptors immunocytochemical and in situ hybridisation analysis. En: "Handbook of chemical neuroanatomy" Editado por Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Capítulo 18 páginas 63-98. Elsevier, Amsterdam.
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007), Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:176-91.
- Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, Tannenbaum SR (1996), The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14428-14433.
- 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.
- Sorce S, Krause KH (2009), NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 10:2481-2504.
- Spector R (2009), Nutrient transport systems in brain: 40 years of progress. *J Neurochem* 315-320.
- Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B (1998), Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem* 71:2112–2122.
- Stamler JS (1994), Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of NO. *Cell* 78:931-396.
- Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ (1994), Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 95-102.
- Suchy FJ (2009), Hepatobiliary function. En "Medical Physiology: Cellular and Molecular approach" Capítulo 46 pp 981:1007 Saunders. PA.
- 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.
- 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.
- Sutton HC, Winterbourn CC (1989), On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad Biol Med* 6:53-60.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274: 594–597.
- Taye A, Saad AH, Kumar HS, Morawietz H (2010), Effect of apocynin on NADPH oxidase-mediated oxidative stress-LOX-1-eNOS pathway in human endothelial cells exposed to high glucose. *Eur J Pharmacol* 627:42-48.
- Tong G, Shepard D, Jahr CE (1995), Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* 267:1510-1512.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995), Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA slicing and polyamines. *Science* 268:873-876.
- Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC (1991), Oxygen radical mechanism of brain injury following ischemia reperfusion. *J Apply Physiol* 71:1185:1195.
- Turrens JF (2003), Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–344.
- Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, Maher F, Simpson IA (1998), Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci* 20:369-379.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997), Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21: 2–21.
- Vannucci SJ, Simpson IA (2003), Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1127–E1134.
- Volterra A, Trotti D, Cassutti P, Tromba C, Salvaggio A, Melcangi RC, Racagni G (1992), High sensitivity of glutamate uptake to extracellular free arachidonic acid levels in rat cortical synaptosomes and astrocytes. *J Neurochem* 59(2):600-606.
- von Sonntag C (1987), The chemical basis of radiation in biology. Taylor and Francis, London, NY.
- Waxham MN (2003), Neurotransmitter receptors. En *Fundamental Neuroscience*, Larry R Squire Ed Capítulo 9 pp 225-258 2da edición Elsevier USA.
- White RJ, Reynolds IJ (1995), Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 15:1318-1328.
- Wieloch T (1985), Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683.
- Wieloch T, Engelsens 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.
- Winterbourn CC, Metodiewa, D (1994), The reactions of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 314:284-290.

- Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Pérez-Otaño I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002), Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J Comp Neurol* 450:303–317.
- Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lin ZP, Nelson D, Pleasure D, Erecinska M (1993), Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Dev Neurosci*. 15: 343–50.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003), Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34:1359–1368.