



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**FUNCIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR  
LA AUSENCIA DE GLUCOSA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
**CRISTIAN GERÓNIMO OLVERA**

TUTOR PRINCIPAL  
**DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
**DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ (IBT-UNAM)**  
**DR. JULIO MORÁN ANDRADE (IFC-UNAM)**

MÉXICO, D. F. mayo, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Lourdes por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto

Se agradece ampliamente la asesoría técnica que me brindó la Bióloga Teresa Montiel Montes para la realización de este trabajo.

Este estudio fue apoyado por el proyecto PAPPIT IN211710

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1. HIPOGLUCEMIA	5
2. NEUROQUÍMICA DE LA HIPOGLUCEMIA	6
3. MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR HIPOGLUCEMIA	7
4. MECANISMOS DE MUERTE NEURONAL	9
5. AUTOFAGIA	10
6. PROCESO DE AUTOFAGIA	14
7. AUTOFAGIA Y SU REGULACIÓN POR LA GLUCOSA	15
8. AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR EXCITOTÓXICA	16
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>V. OBJETIVO</b>	<b>17</b>
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>17</b>
<b>VII. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
1. CULTIVO NEURONAL	18
2. TRATAMIENTOS	18
3. INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)	18
4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CATEPSINA B	20
5. INMUNOCITOQUÍMICA	20
6. VIABILIDAD CELULAR	20
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
1. LA AUTOFAGIA ES ACTIVADA RÁPIDAMENTE DURANTE LA AUSENCIA DE GLUCOSA	21
2. ACTIVACIÓN DE LA VÍA AUTOFAGICA/LISOSOMAL	24
3. CONTRIBUCIÓN DEL MECANISMO DE AUTOFAGIA A LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR LA AG	24
<b>IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>34</b>

## I. RESUMEN

La hipoglucemia ocurre como una complicación del tratamiento con insulina en los pacientes diabéticos. La disminución de la glucosa en sangre repercute directamente en los niveles de este sustrato energético en el cerebro causando un estado hipoglucémico. Episodios prolongados de hipoglucemia que alcanzan el estado de coma inducen daño neuronal principalmente en regiones vulnerables como la corteza, el hipocampo y el estriado, mientras que otras regiones son menos vulnerables. Inicialmente se creía que el daño neuronal ocurría por la falla energética, sin embargo estudios posteriores demostraron la participación del mecanismo excitotóxico iniciado por la liberación de glutamato y aspartato. Estudios pioneros consideraron que la muerte neuronal resultante de la hipoglucemia ocurría a través de la necrosis, no obstante estudios recientes han mostrado evidencias morfológicas y bioquímicas de la apoptosis sugiriendo la participación de mecanismos de muerte celular programada. La autofagia es un mecanismo catabólico intracelular mediado por los lisosomas, encargado de la degradación y el reciclamiento de componentes citoplasmáticos dañados. Se caracteriza por la aparición de vesículas de doble o multi membrana y la redistribución de la proteína citoplasmática LC3 hacia la membrana vesicular. La autofagia tiene una función en la homeostasis celular y en la adaptación a la ausencia de nutrientes, sin embargo una excesiva actividad puede llevar al colapso de las funciones celulares contribuyendo a la muerte celular, conocida como muerte celular autofágica o muerte celular programada de tipo II. Diversos estudios in vivo e in vitro de isquemia cerebral han mostrado la activación de la autofagia después del daño, no obstante su participación en la sobrevivencia o muerte neuronal es controversial. El objetivo del presente estudio fue determinar la inducción de la autofagia como respuesta a la ausencia de glucosa (AG), así como su posible participación en la muerte de neuronas corticales expuestas a la AG.

Cultivos corticales de 7 días in vitro fueron expuestos a diferentes tiempos de AG y reintroducción de glucosa RG, para monitorear las características morfológicas y bioquímicas de la autofagia a través de inmunoblots de proteínas relacionadas con la autofagia (LC3 y Beclina 1), inmunocitoquímica de LC3 y actividad enzimática de la catepsina B. Se utilizaron distintos inhibidores de la vía autofágica/lisosomal para evaluar la función de la autofagia en la muerte neuronal de los cultivos expuestos a 2 h de AG.

Los resultados muestran una rápida formación y acumulación de autofagosomas observada mediante la lipidación de LC3, también observamos la activación transitoria pero significativa de la catepsina B durante el periodo de AG, demostrando la participación de la vía autofágica/lisosomal en nuestras condiciones experimentales. Por otro lado, la 3-metiladenina (3-MA) un inhibidor de la cinasa de fosfatidil inositol de tipo 3 (PI3K III), que inhibe la formación de autofagosomas, y la pepstatina, que es un inhibidor de la catepsina D, protegieron a los cultivos en contra la muerte inducida por la AG, sugiriendo que la autofagia contribuye a la muerte neuronal durante la AG.

## II. INTRODUCCIÓN

El cerebro es un órgano “costoso” en términos de uso de energía, ya que solo equivale aproximadamente al 2% del peso corporal pero requiere del 20% de la energía total de un individuo para mantener su tasa metabólica basal. Siendo la glucosa el sustrato energético más importante para el cerebro adulto y esencial para su desarrollo, y debido a que no puede sintetizar glucosa o almacenar cantidades importantes de glucógeno, el cerebro requiere de un continuo aporte de oxígeno y glucosa de la circulación (McKenna et al., Energy metabolism of the brain).

El transporte de glucosa hacia el cerebro excede el metabolismo cerebral de la glucosa por ello cuando los niveles de glucosa disminuyen en la circulación se limita el aporte de glucosa hacia el cerebro, si esta condición persiste puede provocar un evento hipoglucémico y causar alteraciones en la función cerebral (Cryer, 2007).

### 1. Hipoglucemia

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 que requieren un control estricto de la glucemia y los pacientes con diabetes tipo 2 en etapas avanzadas, presentan episodios recurrentes de hipoglucemia, debido a la administración excesiva de insulina y a la falla de la respuesta contra-reguladora simpato-adrenal (Cryer, 2007). De aquí que es importante conocer los eventos que se desencadenan en el cerebro durante la hipoglucemia que puedan conducir al daño cerebral.

Otro estado patológico asociado a la interrupción del suministro de glucosa sanguínea cerebral, es la isquemia cerebral subsecuente a un trauma, una hemorragia ó a la presencia de un coágulo ó embolo en alguna arteria cerebral. De aquí que la hipoglucemia cerebral es un componente importante de la neuropatología isquémica (Haces et al., 2010).

Los niveles de glucosa en plasma normalmente se encuentran dentro del intervalo de 70-110 mg/dl (3.9-6.1 mmol/l) cuando los niveles de glucosa disminuyen se activan las defensas fisiológicas como el decremento de la secreción de insulina que comienza cuando los niveles de glucosa alcanzan aproximadamente los 81 mg/dl (4.5 mmol/l). Si los niveles de glucosa continúan bajando hasta 68 mg/dl (3.8 mmol/l) se incrementa la secreción de glucagon y adrenalina. Si estas defensas fallan en corregir el episodio hipoglucémico los niveles bajos de glucosa, 54 mg/dl (3 mmol/l), provocan una respuesta mas intensa dando lugar a síntomas; neurogénicos (sudor, mareos, nausea, temblores) provocados por la liberación de noradrenalina y adrenalina, síntomas neuroglucopénicos causados por la AG cerebral (debilidad, visión borrosa, confusión) que inducen a la ingesta de alimento. Si estas defensas tanto fisiológicas como conductuales no son capaces de corregir la caída de los niveles de glucosa y se alcanzan niveles de 50 mg/dl (2.8 mmol/l) se observa la disminución de la cognición, conductas erráticas y pueden presentarse convulsiones. El coma hipoglucémico ocurre cuando los niveles de glucosa en plasma alcanzan un intervalo de 41-49 mg/dl (2.3-2.7 mmol/l) y coincide con el cese de actividad cerebral por lo que también se conoce como periodo

isoeléctrico. Cuando se administra glucosa y se recupera la glucemia la actividad eléctrica cerebral se normaliza (Auer, 2004; Cryer, 2007).

Episodios prolongados de hipoglucemia pueden causar falla cerebral y muerte neuronal (Cryer, 2007). Tras 30-60 minutos de un periodo isoelectrico, el cerebro sufre daño principalmente en áreas vulnerables como la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado, mientras que otras áreas como el tallo cerebral y el cerebelo son menos vulnerables, probablemente debido a la gran eficiencia del transportador de glucosa en estas dos ultimas regiones, entre otros factores (Auer et al., 1985; Suh et al., 2003).

Por otra parte, la corteza cerebral es una de las áreas más vulnerables ya que algunos estudios recientes han mostrado muerte neuronal en esta región tras largos periodos de hipoglucemia moderada en ausencia de coma hipoglucémico (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008; Haces et al. 2010).

## **2. Neuroquímica de la hipoglucemia**

Inicialmente se propuso que el daño hipoglucémico se debía a la AG y al fallo energético. Sin embargo estudios in vivo muestran que la administración de iodoacetato, un inhibidor glicolítico (Sandberg et al., 1985) y la hipoglucemia inducida por insulina resultan en el incremento de los niveles extracelulares de aspartato y glutamato (Sandberg et al., 1986). El aumento en la concentración extracelular de estos aminoácidos se presenta durante el periodo isoelectrico en el modelo de hipoglucemia inducido con insulina, restaurándose a niveles normales cuando la concentración de glucosa sanguínea se normaliza (Sandberg et al., 1986). Esto sugiere que la muerte neuronal ocurre a través de una ruta indirecta: la liberación aumentada de aminoácidos excitadores vesiculares, una deficiencia en su recaptura y la activación inversa de los transportadores (Ogata et al., 1995).

Durante el coma hipoglucémico el metabolismo energético decae pero el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) continua a través de la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutamato y del oxaloacetato por la reacción catalizada por la aspartato aminotransferasa. La reacción resulta en la formación de aspartato lo cual correlaciona con la disminución de la concentración de glutamato y glutamina. Estos resultados sugieren la presencia de un del ciclo de Krebs truncado ó incompleto que mantiene la homeostasis metabólica en condiciones de hipoglucemia. Conforme la glucosa comienza a agotarse la fuente de acetato es limitada y el mantenimiento del citrato a través de la condensación del acetato y el oxaloacetato se reduce. Por tanto, una posible fuente de carbono es la poza de glutamato producido por la desaminación de la glutamina (Auer et al., 2008) (Figura 1).

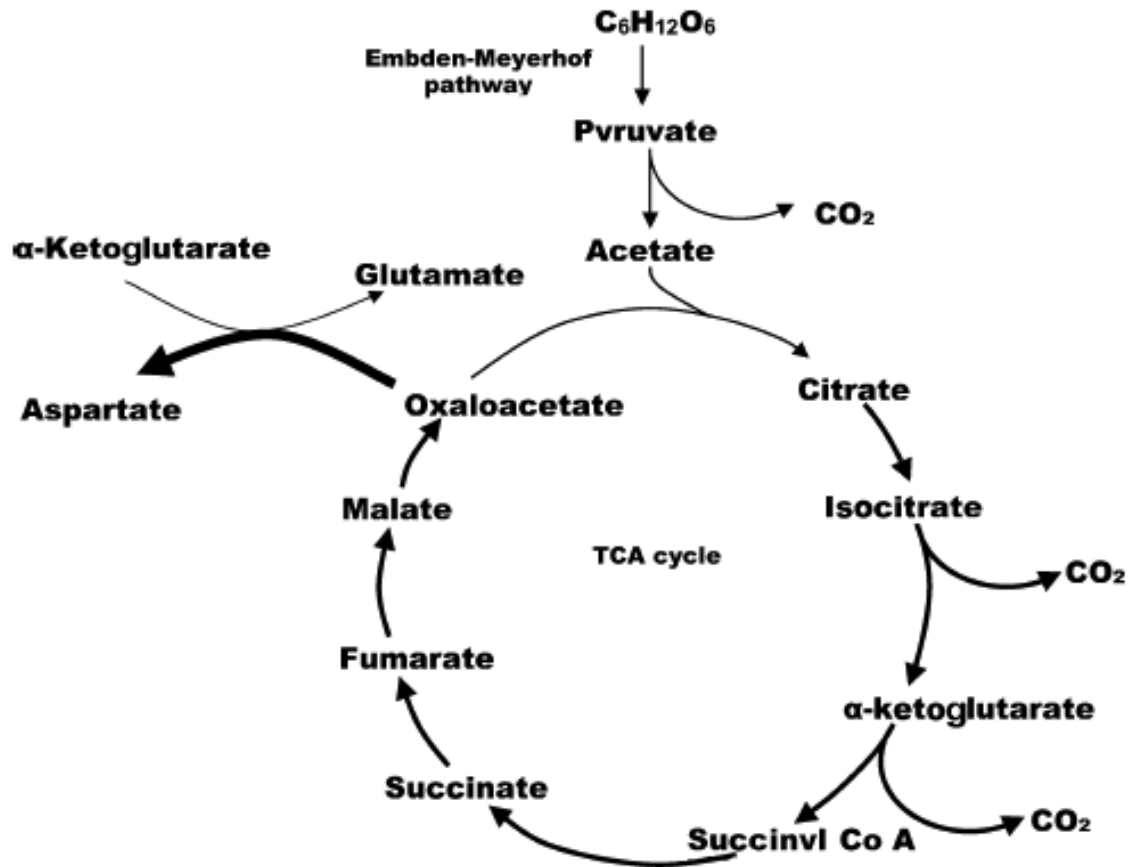


Figura 1. Alteraciones en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos ocasionado por la hipoglucemia (Auer 2004)

A diferencia de la isquemia, durante la hipoglucemia el metabolismo energético no decae completamente, solamente un 25-30%. La hipoglucemia genera una falla energética donde la fosforilación oxidativa disminuye, y por tanto los fosfatos de alta energía como el ATP. El metabolismo energético del cerebro es mantenido por el consumo de ácidos grasos; su oxidación produce  $FADH_2$  y  $NADH$ , así como fuentes de carbón que finalmente entran al ATC, como el acetato (Auer et al., 2008). Por otra parte moléculas exógenas que circulan por el torrente sanguíneo como glicerol, lactato y cuerpos cetónicos, también son capaces de mantener el metabolismo cerebral durante un corto tiempo (Auer 2004).

### 3. Muerte neuronal inducida por hipoglucemia

Aunque los mecanismos de daño neuronal provocados tras un evento hipoglucémico no son comprendidos del todo, las evidencias sugieren al mecanismo excitotóxico inducido por la liberación de aminoácidos excitadores y la activación de receptores a glutamato como el evento iniciador (Cryer 2007). La administración de un antagonista de los receptores a NMDA antes



del coma hipoglucémico reduce 90% la muerte neuronal (Wieloch 1985). Además cultivos corticales e hipocampales tratados con MK-801, un antagonista de los receptores NMDA previene la muerte neuronal inducida por la AG (Páramo et al., 2010).

El aumento en los niveles extracelulares de glutamato y aspartato inducido por la hipoglucemia provoca la activación de los receptores a glutamato (AMPA, NMDA, Kainato y mGlu) siendo el receptor de tipo NMDA el mas asociado con la muerte por ser el mas permeable a calcio. La sobre-activación de los receptores a NMDA permite la entrada excesiva de calcio ( $Ca^{2+}$ ) a la célula, el cual desencadena un serie de eventos como: la activación de sistemas productores de radicales libres; vías de señalización y activación de proteasas dependientes de calcio, contribuyendo a la muerte neuronal (Szydlowska & Tymianski, 2010).

La entrada de calcio extracelular es uno de los eventos iniciales en el daño neuronal, sin embargo se observó la participación de los almacenes intracelulares de  $Ca^{2+}$  en la muerte excitotóxica. La administración de dantroleno, antagonista de los receptores a rianodina tiene un efecto protector ante la ausencia de oxígeno y glucosa (OGD) (Wang et al., 2002). Acorde con estos resultados la presencia de un quelante del calcio intracelular, BAPTA-AM o la ausencia de calcio extracelular durante la inhibición de la glucólisis ó la AG previene la muerte en los cultivos hipocampales (Hernández-Fonseca & Massieu 2005; Páramo et al. 2010). El desbalance de la homeostasis de calcio debido al fallo en el almacén del retículo endoplásmico (ER) y la sobrecarga de calcio en la mitocondria provoca la despolarización de la membrana mitocondrial, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), apertura del poro transición mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y eventualmente la liberación de citocromo C y activación de caspasas (Schinder et al., 1996).

El daño hipoglucémico involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies de nitrógeno (NOS) y el aumento de glutatión oxidado, particularmente durante la reperfusión de glucosa (Suh et al., 2007). Sin embargo, en ratas sujetas a hipoglucémia moderada en ausencia de coma, se ha observado daño oxidativo a lípidos en regiones cerebrales vulnerables, sugiriendo que éste ocurre a consecuencia de la reducción de los niveles de glucosa aún antes de que se alcance el estado de coma (Haces et al., 2010).

La producción de ROS inicialmente es dependiente de la presencia de calcio y activación de los receptores NMDA, sin embargo durante una severa disminución energética la entrada de calcio a través de los receptores a NMDA no participa en la generación de ROS, indicando que el calcio intracelular juega una función en la generación de estrés oxidativo. Los sistemas dependientes de ATP responsables de la captura y extrusión de calcio intracelular se ven afectados durante una fuerte inhibición de la glucólisis contribuyendo al aumento de calcio intracelular (Hernández-Fonseca et al., 2005: 2008).

Otro mecanismo asociado a la muerte neuronal por hipoglucemia y desencadenado por el desbalance del calcio intracelular es el estrés reticular. Distintos estudios in vitro e in vivo de isquemia han demostrado el aumento de marcadores de estrés reticular y de la actividad de la caspasa 12 (Mouw et al.,

2003; Badiola et al., 2011). Particularmente cultivos hipocampales sometidos a AG mostraron el aumento de marcadores de estrés reticular particularmente de la vía de PERK (García de la Cadena en preparación) indicando la participación de esta vía en el daño neuronal.

La liberación de zinc al espacio extracelular y su translocación post-sináptica es una condición que contribuye a la muerte neuronal en patologías como la isquemia, trauma cerebral e hipoglucemia, dependiendo en parte de la entrada de calcio intracelular (Suh et al., 2004). Está establecido que el zinc induce la formación de especies reactivas de oxígeno a través de acciones en la mitocondria, la sobreactivación de la NADPH oxidasa y de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Kim et al., 1999). También se ha observado la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) como un evento posterior a la translocación de zinc, ya que los quelantes de este metal mostraron una disminución de su actividad y por tanto de la muerte neuronal en el modelo de hipoglucemia (Suh et al. 2003: 2004)

#### **4. Mecanismos de muerte neuronal**

Existen distintos tipos de muerte neuronal y éste depende tanto de la naturaleza del estímulo tóxico como de su intensidad. Además, pueden presentarse distintos tipos de muerte a lo largo de las distintas etapas del daño. Inicialmente se consideraba que la muerte neuronal causada por excitotoxicidad ocurría por un proceso necrótico (Sims & Muyderman 2010). Sin embargo, existen evidencias bioquímicas y morfológicas de la presencia de apoptosis (Li et al., 1995) sugiriendo su participación en el daño neuronal (Gotttron et al., 1997). Además de la participación de la necrosis y la apoptosis en la excitotoxicidad, en los últimos años se han establecido formas alternativas de muerte celular como la “necrosis programada” y la autofagia (Rami & Kögel 2008), lo que sugiere que distintos mecanismos de muerte neuronal son activados simultáneamente durante un daño excitotóxico (Sims & Muyderman 2010).

La muerte celular puede ocurrir a través de distintos mecanismos, cada uno con características morfológicas y bioquímicas definidas.

I. La apoptosis es considerada como la muerte celular de tipo I definida por cambios morfológicos resultantes de la activación de cascadas de señalización (Gill & Pérez-Polo 2008). Es caracterizada por el encogimiento de la célula, la condensación de la cromatina, la degradación nucleosomal del DNA y fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos. La apoptosis es un proceso dependiente de ATP que involucra dos vías principalmente (extrínseca e intrínseca) que culminan en la activación de proteasas de cisteína denominadas caspasas (Gozuacik & Kimchi 2004; Gill & Pérez-Polo 2008).

II. La necrosis es un evento pasivo resultante de la falla energética y de la aumento de la concentración de calcio es por ello que se le considera como independiente de ATP. Se caracteriza por la ruptura de la membrana plasmática, hinchamiento de los organelos intracelulares y la reacción de inflamación resultante de la liberación del contenido citosólico hacia la matriz extracelular (Gill Pérez-Polo 2008). La calpaínas, proteasas de cisteína

dependientes de  $Ca^{2+}$ , han sido involucradas como las principales orquestadoras de la muerte necrótica.

III. La autofagia o muerte celular de tipo II es un mecanismo catabólico intracelular mediado por los lisosomas; responsable de la degradación o reciclamiento de grandes porciones de componentes citoplasmáticos, proteínas u organelos dañados y disfuncionales (Lee 2009; Quin et al., 2010). Existen al menos 3 principales vías de autofagia por las cuales los componentes celulares son transportados a los lisosomas para su degradación.

Macro-autofagia (refiriéndonos como autofagia en este escrito): Se caracteriza por la captura de los componentes del citoplasma en vesículas de doble o multi-membrana, denominadas autofagosomas y por la lipidación y redistribución de la proteína LC3 hacia éstos (Gozuacik & Kimchi 2004). Las vesículas autofágicas y su contenido son destruidos por proteasas del sistema lisosomal como las catepsinas (Gozuacik & Kimchi 2004; Qin et al., 2010).

Micro-autofagia: es un proceso poco estudiado y entendido en mamíferos, donde las porciones de citoplasma son capturadas mediante la invaginación de la membrana lisosomal (Kaminsky & Zhivotovsky 2012).

Autofagia mediada por chaperonas (CMA): es la única vía selectiva donde proteínas citosólicas específicas son transportadas una por una hacia los lisosomas para su degradación (Orenstein & Cuervo 2010). Se caracteriza por la presencia de un motivo consenso similar al del pentapeptido KFERQ en los sustratos (Arias & Cuervo 2011). Este motivo es reconocido por un conjunto de chaperonas entre ellas hsc70 (heat shock-cognate chaperone 70 kDa) que acarrear a los sustratos hasta unirlos con LAMP2A (proteína de membrana lisosomal de tipo 2A) presente en el lisosoma. A esta vía de la autofagia se le ha relacionado con la macro-autofagia, observándose que actúan de manera secuencial o simultánea.

## **5. Autofagia**

La autofagia tiene una función importante en la homeostasis celular y es un mecanismo central para la adaptación ante la falta de sustratos energéticos durante el crecimiento, también representa una estrategia para la sobrevivencia celular ante un estrés bioenergético (Balduini et al., 2009). Aunque la autofagia es considerada una respuesta homeostática, la presencia de estructuras autofágicas en células durante el proceso de muerte ha implicado a este proceso en la muerte celular, siendo que un exceso de actividad autofágica podría destruir grandes porciones del citosol y organelos, llevando al colapso total de las funciones celulares (Ravikumar et al., 2010; Tanida, 2011). Tal es así que existe una compleja maquinaria proteica encargada de regular el proceso de autofagia y evitar un descontrol. mTOR es uno de los principales reguladores negativos de la vía canónica de la autofagia, sin embargo se han caracterizados dos cascadas de señalización que conducen a la modulación de la autofagia: i) Vía dependiente e ii) Independiente de mTOR.

## 5.1 Vía dependiente de mTOR

Bajo condiciones normales el receptor de insulina es transfosforilado y señala fosforilando los sustratos del receptor de insulina (IRS). Estos sustratos interactúan con la PI3K de clase I para formar fosfatidil inositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>) el cual promueve el reclutamiento de Akt y su subsecuente fosforilación por parte de la PDK1 (cinasa dependiente de fosfatidil inositol). La fosforilación de Akt previene la formación del complejo TSC1/2 permitiendo que la proteína Rheb (homologo de Ras enriquecido en el cerebro) se mantenga unida a GTP y sea capaz de fosforilar a mTOR y activarlo. El complejo mTOR en su forma activa se encuentra asociado al complejo ULK1 inactivándolo por fosforilación y de esta forma suprimiendo a la autofagia (Baek et al., 2012) (Figura 2a). Por otra parte la captura de aminoácidos provoca la activación de mTOR a través de la proteína Rag inhibiendo la autofagia (Baek et al., 2012).

Cuando los niveles de ATP descenden y aumentan los niveles de AMP se promueve la activación de la autofagia a través de la AMPcinasa (AMPK). Esta fosforila a TSC2 promoviendo la formación del complejo TSC1/2 activando a Rheb. Esta serie de eventos lleva a la inhibición de mTOR lo cual promueve la activación de la autofagia (Figura 2a) (Baek et al., 2012).

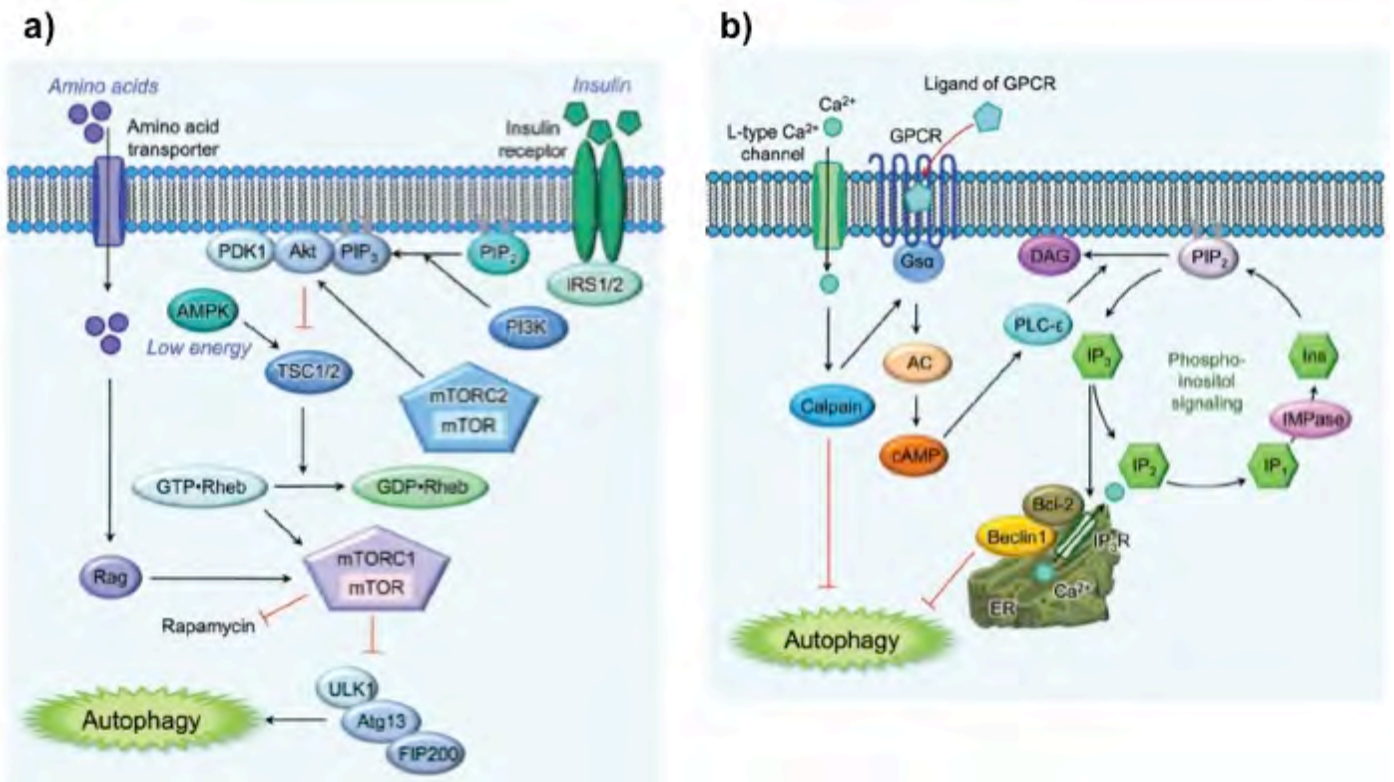


Figura 2. a) Activación de la vía dependiente de mTOR por falta de nutrientes y energía. b) activación de la vía independiente de mTOR por el receptor de calcio de tipo L o unión del ligando al GPCR (Tomado de Baek et al., 2012).

## 5.2 Vía independiente de mTOR

Esta vía es regulada por los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  o receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Bajo condiciones normales el  $Ca^{2+}$  entra a la célula a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L el cual es capaz de activar a la calpaína, esta proteasa a su vez corta y activa a la subunidad  $G_{\alpha}$  de los GPCR. De igual forma la subunidad  $G_{\alpha}$  puede ser activada por la unión del ligando al GPCR. La activación de la subunidad  $G_{\alpha}$  incrementa la actividad de la AC (adenilato ciclasa) produciendo un incremento en el AMPc el cual activará a la  $PLC_{\epsilon}$ , enzima que hidroliza al PIP2 (fosfatidil inositol trifosfato) en IP3 (inositol trifosfato) y DAG (diacil glicerol). Cuando existen niveles elevados de IP3 éste se une a su receptor en el retículo endoplasmico el IP3R, resultando en la salida de  $Ca^{2+}$  que a su vez activará a la calpaína. Por otra parte el IP3R activo promueve la formación del complejo anti-autofagico Bcl-2-Beclina 1, el cual disminuye los niveles de Beclina 1 libres impidiendo de esta forma la inducción de la autofagia (Baek et al., 2012) (Figura 2b).

El sistema de degradación de la autofagia es un proceso dinámico que comúnmente es dividido en seis pasos: 1) formación del omegasoma, 2) aislamiento de las membranas, 3) elongación de las membranas aisladas, 4) formación del autofagosoma, 5) fusión del autofagosoma-lisosoma y 6) degradación del contenido intra-autofagosomal por las hidrolasas lisosomales (Ravikumar et al., 2010; Tanida, 2011).

En los mamíferos el complejo de proteínas Atg esta dividido en 5 subgrupos: 1) complejo ULK1 cinasa, 2) Vps34-beclin1 PI3K de tipo III, 3) Atg9-WIPI-1, 4) sistema de conjugación Atg12 y 5) el sistema de conjugación LC3. La ausencia de cualquiera de estos complejos genera la interrupción de la autofagia sugiriendo una reacción secuencial (Tanida, 2011) (Figura 3).

### 1) Complejo ULK1 cinasa

Este complejo está formado por 4 proteínas: ULK1 (Unc-51-tipo cinasa 1), Atg13, FIP200 (Proteína de interacción con cinasas de adhesión focal) y Atg101. La fosforilación de Atg13 por parte de mTOR regula negativamente la autofagia. Es probable que el complejo formado por estas 4 proteínas interactúe con el complejo Atg14-Vps34 PI3K tipo III (He & Klionsky, 2009; Tanida, 2011).

### 2) Vps34-Beclina 1 PI3K cinasa tipo III

Esta conformado por al menos 3 tipos de cinasas. El complejo Atg14-Vps34-Vps15-beclina1 que es esencial para la formación del autofagosoma, el complejo UVRAG-Vps34-Vps15-beclina1 indispensable para la maduración del autofagosoma y el trafico endocítico, y el complejo Rubicon-UVRAG-Vps34-Vps15-Beclina1 que regula negativamente la maduración del autofagosoma (Tanida, 2011).

### 3) Complejo Atg9-WIPI-1

Normalmente se encuentra localizado en la red trans-Golgi pero bajo condiciones de inanición se localiza en los autofagosomas por un proceso dependiente de ULK1 (Tanida, 2011).

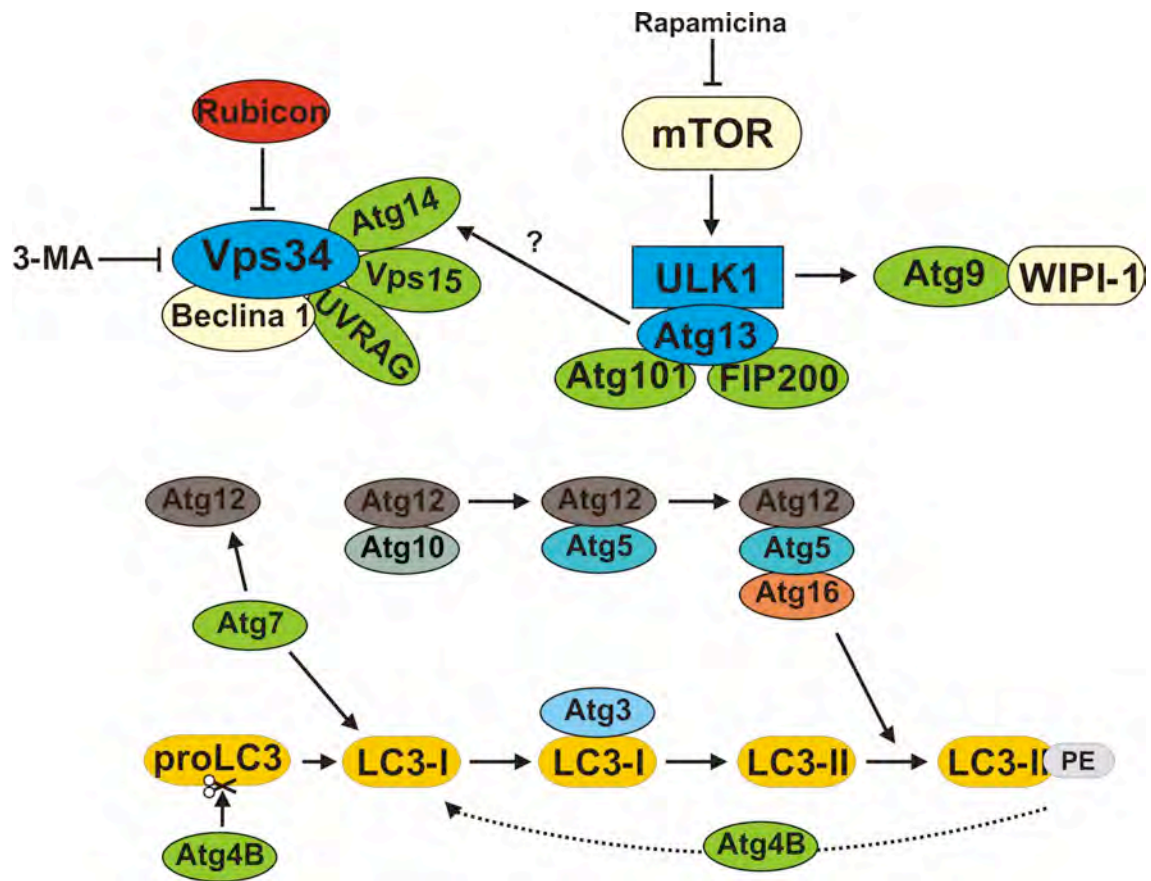


Figura 3. Complejos de proteínas Atg de mamíferos. Complejo ULK1 cinasa, Vps34-beclina1 PI3K de tipo III, Atg9-WIPI-1, sistema de conjugación Atg12 y el sistema de conjugación LC3.

### 3) Sistema de conjugación Atg12: primera reacción de tipo ubiquitinación

Este complejo es esencial para la formación y elongación de la membrana. Atg12 es activado por Atg7 (enzima de tipo E1) que la transfiere a Atg10 (enzima de tipo E2) para conjugarla con Atg5 y formar el conjugado Atg12-Atg5. Posteriormente Atg16 interactúa con el conjugado Atg12-Atg5 para formar un complejo multimerico (Tanida, 2011).

### 5) Lipidación de LC3: segunda reacción de tipo ubiquitinación

LC3 (proteína de cadena ligera tipo 3 asociada a microtúbulos) es sintetizada como proLC3, la cual es cortada por Atg4B para formar LC3-I. LC3-I es activada por Atg7 y transferida a Atg3 y finalmente conjugada con PE (fosfatidil etanolamina). LC3-II de la superficie citoplasmática de los autofagosomas es cortado por Atg4B para reciclarlo a LC3-I para su uso posterior en la formación de los autofagosomas (Tanida, 2011).

Existe una estrecha relación entre el complejo Atg12-Atg5-Atg16 y la lipidación de LC3, ya que este complejo funciona como ligasa E3 facilitando la lipidación de LC3 (Ravikumar et al., 2010). Por otra parte se ha observado que la deficiencia de Atg3 genera la disminución del conjugado Atg12-Atg5 así como la incapacidad de lipidar a LC3 produciendo una inadecuada formación de los autofagosomas (Tanida, 2011).

## 6. Proceso de autofagia

El proceso comienza con la cinasa mTOR siendo el principal regulador negativo de la autofagia. Bajo condiciones de estrés o falta de nutrientes mTOR es inactivado permitiendo la formación de complejo ULK1 que propicia la formación del omegasoma, denominado así por tener forma de la letra griega ( $\Omega$ ), a partir del ER o de los endosomas tardíos del aparato de Golgi (Giansanti et al., 2011). La proteína de unión a PI3P, DFCP1 es relocalizada a partir del ER o Golgi hacia el omegasoma donde el complejo Atg14-Vps34-beclin1 PI3K regula positivamente a DCFP1 para la formación del omegasoma. Después de la formación del omegasoma comienza el aislamiento de la membrana (denominado pre-autofosoma o fagoforo) en el interior del omegasoma donde el complejo Atg12-Atg5-Atg16 se localiza para la elongación. De igual manera los complejos Atg9, WIPI-1, ULK1 y Atg14-Vps34-beclin1 PI3K se localizan en la membrana en aislamiento. Por otra parte las proteínas Jumpy (MTMR14) y MTMR3 regulan negativamente el proceso de formación del omegasoma y el aislamiento de la membrana (He & Klionsky, 2009; Ravikumar et al., 2010; Tanida, 2011) (Figura 4).

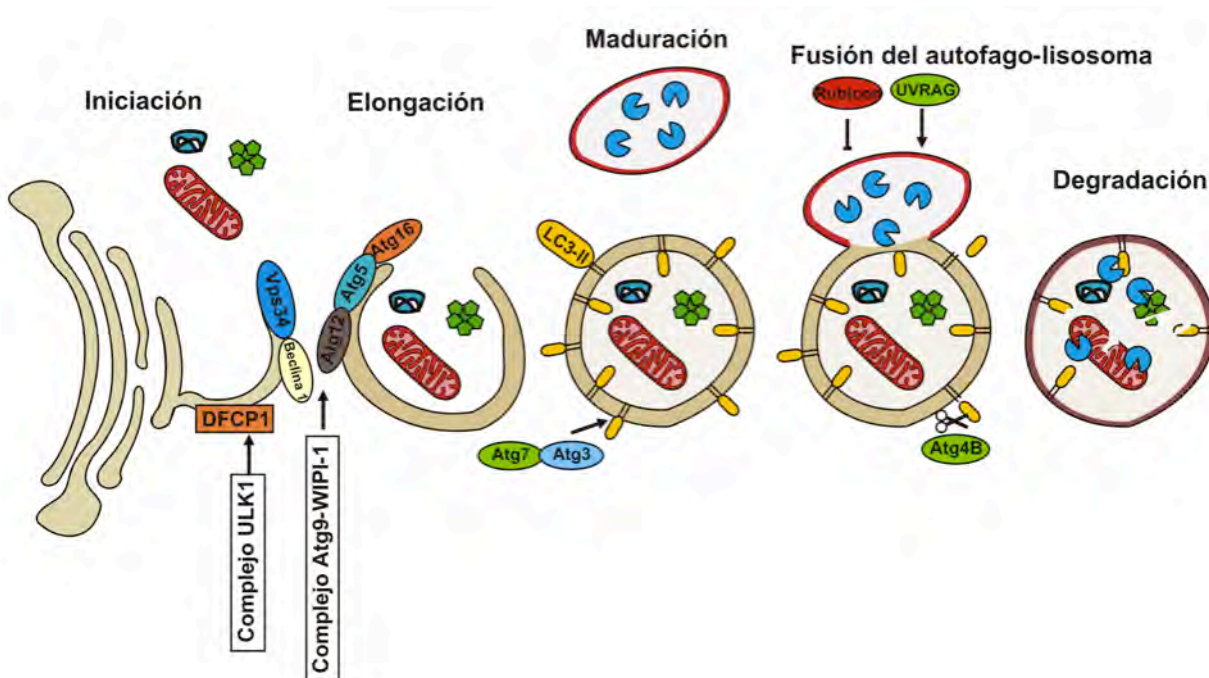


Figura 4. Mecanismo de degradación de la autofagia, dividido en 5 etapas: Iniciación, elongación, maduración, fusión del autofago-lisosoma y degradación.

El complejo Atg12-Atg5-Atg16 localizado en la membrana en aislamiento propicia la elongación de la membrana para la captura de los componentes citoplasmáticos. En estadios tardíos de la elongación de la membrana el complejo Atg12-Atg5-Atg16 se comienza a disociar, mientras que LC3-II comienza a localizarse en ambos lados de esta membrana. Finalmente la membrana en aislamiento se cierra para formar el autofagosoma (Figura 4).

Poco después de la formación del autofagosoma, éste se fusiona con los lisosomas para formar el autolisosoma, proceso donde Rab7 se une a sus efectores FYCO1 y FYVE, proteínas que se unen a LC3-II y a PI3P y al extremo positivo de los microtúbulos para mediar el transporte vesicular. Posterior a la formación del autolisosoma Atg4B libera a LC3-II de la superficie citosólica (Figura 4).

En el autolisosoma las enzimas hidrolíticas, catepsinas, enzimas glicolíticas y lipasas se encargan de la degradación del contenido incluyendo la degradación de LC3-II de la parte interna. Después de la digestión del contenido del autolisosoma se forma una estructura tubular denominada protolisosoma que es positiva para la proteína LAMP1 (proteína de membrana asociada a lisosomas 1), finalmente el protolisosoma madurará para formar un lisosoma (Figura 4).

## **7. Autofagia y su regulación por la glucosa**

La autofagia es un proceso catabólico comúnmente activado para suministrar sustratos a la célula ante la falta de energía. A pesar de ello se ha establecido que este proceso requiere de energía en forma de ATP en al menos dos pasos: 1) secuestro del material citosólico en los autofagosomas y 2) mantenimiento de la actividad de la bomba de protones de tipo vacuolar (V-ATPasa), esencial para la acidificación de los lisosomas (Plomp et al., 1987). Siendo que la mayoría del ATP en las células proviene del metabolismo de la glucosa, se postula que este metabolito es importante para el funcionamiento y regulación de la autofagia (Moruno et al., 2012).

Diversos estudios muestran la activación de la autofagia inducida por glucosa sin embargo existen datos contrarios donde este metabolito tiene el efecto opuesto (Kobayashi et al., 2012; Moruno et al., 2012). Por otra parte hormonas relacionadas con los niveles de glucosa como el glucagón han mostrado activar la autofagia mientras que la insulina la inhibe. No obstante la glucosa presente en el ambiente también es capaz de generar una respuesta en el mecanismo de autofagia, debido a su importante función en la determinación del estado energético celular o a través de otros efectos como el estado oxidativo (Moruno et al., 2012).

En células de mamífero al igual que en la levadura la disponibilidad de glucosa promueve la actividad de la V-ATPasa favoreciendo la acidificación de los lisosomas requeridos para la actividad óptima de las hidrolasas (Sautin et al., 2005). La mayoría de los resultados indican que la glucosa induce la inhibición de la autofagia, aunque la falla energética de células sometidas a la AG provocan la activación de la autofagia como mecanismo necesario para



restaurar los niveles de ATP a partir de la degradación de componentes celulares (Singh & Cuervo 2011). Sin embargo se propone que la falta de ATP no es necesaria para inducir la autofagia por AG, ya que otros estímulos como la formación de ROS o el estrés reticular pueden activarla (Marambio et al., 2010; Haibin et al., 2011).

Proteínas como la AMPK, p53 y p27K1P1 están implicadas en la señalización hacia la activación de la autofagia cuando el ATP disminuye en las células expuestas a la AG. Otras como p38, ERK y JNK responden a la producción de ROS inducidas por niveles bajos o excesivos de glucosa activando la autofagia. Por otra parte se ha sugerido la participación de IKK (I $\kappa$ B cinasa) y FOXO (forkhead class O) en la inducción de la autofagia por glucosa sin relación alguna con los niveles de ATP o la producción de ROS (Moruno et al., 2012).

## **8. Autofagia en la muerte celular excitotóxica**

La excitotoxicidad es el principal mecanismo que desencadena la muerte en distintos tipos de daño como: isquemia cerebral, trauma cerebral, epilepsia e hipoglucemia además de contribuir al daño en distintas enfermedades neurodegenerativas. Como resultado del daño excitotóxico se ha establecido la muerte neuronal por necrosis, apoptosis o una combinación de ambas dependiendo del tipo de estímulo, duración y tipo celular, sin embargo diversos son los estudios que muestran evidencias morfológicas y bioquímicas de la participación de la autofagia en la muerte neuronal inducida por un estímulo excitotóxico.

La exposición de cultivos organotípicos de hipocampo a NMDA resulta en la muerte neuronal principalmente en las regiones CA1 y CA3, en las cuales existen evidencias morfológicas de muerte autofágica dependiente de la activación de JNK (Borsello et al., 2003). Observaciones de microscopía electrónica y de fluorescencia demostraron la activación de la autofagia en el tejido cerebral de ratones sometidos a hipoxia/isquemia (Adhami et al., 2006). Por su parte Koike et al., 2008 mostraron la inducción de la autofagia en neuronas del hipocampo de ratones adultos y neonatos en el mismo modelo.

La inducción del fenómeno de excitotóxico en ratas a través de la inyección intraestriatal de ácido kaínico mostró la participación del mecanismo autofágico/lisosomal en la muerte neuronal (Wang et al., 2008). En el mismo sentido la exposición de células granulares de cerebelo (Sadasivan et al., 2010) y células corticales (Pérez-Carrión et al., 2012) a NMDA provoca la rápida acumulación de autofagosomas en respuesta al daño excitotóxico. En distintos modelos in vivo de isquemia cerebral se realizó el análisis de marcadores relacionados con la autofagia (Beclina, LC3 y Catepsina B activa) indicando la participación de dicho mecanismo en la muerte neuronal (Rami et al., 2008; Wen et al., 2008; Carloni et al., 2008). Adicionalmente Qin et al., 2008 demostraron la activación de la autofagia en astrocitos.

Comúnmente la autofagia actúa como mecanismo de sobrevivencia en contra de la muerte ante el daño celular o la falta de nutrientes, sin embargo puede tener el efecto inverso promoviendo la muerte celular a través de la excesiva degradación de material citoplasmático o por la activación de la vía apoptótica.

La activación de la autofagia inducida por el preconditionamiento isquémico tiene un efecto protector en contra de la isquemia focal permanente mediante la modulación del estrés reticular (Sheng et al., 2012). Resultados similares a los obtenidos por Carloni et al., 2008 donde la autofagia confiere un efecto protector en contra de la hipoxia/isquemia. No obstante la inhibición del proceso de autofagia tiene un efecto neuroprotector ante el daño celular, tal es así que los ratones knock-out de Atg7 muestran una disminución en la muerte de células hipocampales posiblemente disminuyendo la activación de la apoptosis (Koike et al., 2008). Por su parte la inhibición farmacológica con 3-MA de la PI3K cinasa tipo III, complejo esencial para el inicio de la autofagia ha mostrado disminuir la muerte neuronal en distintos modelos (Sadasivan et al., 2010; Qin et al., 2010) posiblemente por la modulación de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Wang et al., 2008; Wen et al., 2008).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La interrupción del suministro de glucosa al cerebro subsecuente a la disminución de los niveles de glucosa en sangre, genera daño neuronal a través del mecanismo de excitotoxicidad, desencadenado por la liberación de aminoácidos excitadores durante el coma hipoglucémico. El daño producido por la activación de los receptores a glutamato de tipo NMDA desencadena una serie de eventos que culminarán en la muerte celular. En un principio se propuso que la muerte excitotóxica asociada a la hipoglucemia era de tipo necrótico, sin embargo estudios posteriores implicaron a la muerte celular programada en el daño hipoglucémico. A la fecha no se conoce si la autofagia se induce durante la hipoglucemia, y si este mecanismo contribuye a la muerte o a la sobrevivencia de las neuronas.

En el presente trabajo se analizó la inducción de la autofagia durante la AG en neuronas corticales en cultivo, así como su posible contribución al mecanismo de muerte neuronal.

### **IV. HIPÓTESIS**

La autofagia se activará en respuesta a la AG y contribuirá a la muerte neuronal.

### **V. OBJETIVO**

Determinar la inducción de la autofagia como respuesta a la AG, así como su posible participación en la muerte de neuronas corticales expuestas a la AG.

### **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar la presencia de marcadores relacionados con las distintas etapas del mecanismo de autofagia durante la AG y durante el periodo de RG.

Determinar la contribución de la autofagia al daño neuronal inducido por la AG.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **1. Cultivo Neuronal**

A partir de tejido fetal de ratas Wistar de 17 días de gestación se realiza la disección de la corteza cerebral. El tejido es cortado utilizando un rebanador de tejido (McIlwan laboratory Engineering Co.) y disociado con Tripsina-EDTA en solución Ringer Krebs (KRB) durante 3 minutos a 37°C. La reacción de disociación se detiene utilizando inhibidor de tripsina al 0.08% y DNasa al 0.52%. Para asegurar una disociación completa las células son disgregadas mecánicamente pasándolas por una malla. Finalmente las células se resuspenden en medio Neurobasal (25 mM Glucosa) suplementado con 2 % de B27 mixto (50% con antioxidantes y 50 % sin antioxidantes), 0.5 mM L-glutamina y 0.02 mg/ml gentamicina. Las células son sembradas en cajas precubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml) a una densidad de  $8.34 \times 10^5$  células/ml para evaluar la viabilidad celular por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) o por la reducción del bromuro 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT). Se utilizaron células sembradas en cajas de 35 mm de diámetro ( $8.3 \times 10^6$  células/ml) para la obtención de homogenizados celulares y realización de ensayos de Western-blot y de actividad enzimática (catepsina B). Las células se mantienen por 7 días in vitro (DIV) a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>-95 % O<sub>2</sub>; a los 4 DIV se añade medio Neurobasal fresco (200 µl a las cajas de 12 y 24 pozos y 500 µl a las de 35 mm), suplementado con 2 % B27 sin antioxidantes y 0.54 µM de citosina arabinosa.

### **2. Tratamientos**

A los 7 DIV los cultivos son expuestos a un medio libre de glucosa DMEM (dulbecco's modified eagle medium) por diferentes periodos de tiempo (periodo de AG); finalizado este periodo el medio libre de glucosa es sustituido por el medio en el que inicialmente fueron sembradas las células (periodo de reintroducción de glucosa, RG). Los niveles de los distintos marcadores de autofagia y las determinaciones de actividad enzimática (catepsina B), se realizaron a diferentes tiempos de AG (0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 h) y de RG (1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 h) después de exponer a las células durante 2 h a la AG. Para los ensayos de sobrevivencia neuronal los cultivos fueron expuestos a la AG durante 2 h y después de 17 (LDH) o 22 h (MTT) de RG, se evaluó la sobrevivencia neuronal. Se evaluó el efecto protector de distintos fármacos sobre la sobrevivencia neuronal; éstos fueron pre-incubados 30 min antes del inicio de la AG y estuvieron presentes durante el periodo de AG. Los fármacos probados son: 3-metil adenina (3-MA 10 mM) inhibidor de la PI3K tipo III, ZFA-fmk (100 µM) y CA074 (65 µM) inhibidores de la catepsina B, pepstatina A (1µM) inhibidor de la catepsina D, Rapamicina (200 nM) inhibidor de mTOR (inductor de autofagia). El antagonista del receptor a glutamato de tipo NMDA, MK-801 (10 µM), fue incubado sólo durante el periodo de AG.

### **3. Inmunodetección (Western blot)**

Después del periodo de exposición a la AG, las células se lavaron con 1 ml de D-PBS y se homogenizaron en un buffer de lisis que contiene (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, SDS 0.2% y 2 mg/ml de inhibidores de proteasas

(Complete, Roche), pH 7.4). Se utilizaron treinta microgramos de muestra para los ensayos de electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Los geles fueron transferidos utilizando membranas de PVDF de acuerdo a la tabla 1. Las membranas se bloquearon con TTBS (Trizma 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 0.1 %) en leche Carnation en distintos porcentajes de acuerdo a cada caso (ver tabla) durante 1 hora. Se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Se realizaron 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo en TTBS 5 % leche carnation. Las membranas se revelaron con un sistema de quimioluminiscencia (Millipore) y fueron expuestas en placas Kodak.

Tabla 1. Condiciones para la detección por inmunoblot de los distintos marcadores asociados al proceso de autofagia

Marcador	[ ] Gel	Corrida	Transferencia	Bloqueo	Anticuerpo 1ro.	Anticuerpo 2ro.	
LC3	20X	16 h	Húmeda	10 %	1:1000	Conejo 1:5000	
MBL		35-40 V	3.5 h a 200 mA y 0.5 h a 350 mA				
Beclina	10X	2 h 100 V	Húmeda 2.5 h	5 %	1:250	Conejo 1:1000	
Sigma- aldrich				10 %			
Catepsina B				5 %	1:500	Conejo 1:3000	
Santa Cruz							
LAMP1					1:200		Ratón 1:3000
Santa Cruz							
LAMP2	1:7000	1:5000					
Santa Cruz							
P62							
Santa Cruz							
Actina							

#### **4. Actividad enzimática de catepsina B**

La actividad enzimática de catepsina B, se determinó utilizando un ensayo fluorescente en el cual los sustratos son di ó tripeptidos acoplados a un grupo reportero en el carboxilo terminal comúnmente 7-amino-4-metilcoumarina (AMC). Después del rompimiento por las proteasas, el grupo AMC es liberado emitiendo fluorescencia. La determinación de la actividad se llevó a cabo en placa negra de 96 pozos midiendo la fluorescencia con un detector de placa Bio-tek a 370-380 nm de excitación y 460 nm de emisión.

80 µg de proteína se incuban con 25 µM de sustrato para catepsina B, Z-Arg-Arg-AMC (concentración final) disueltos en buffer de ensayo que contiene (HEPES 25 mM pH 4.5, EDTA 1 mM, CHAPS 0.1%, sacarosa 10%, DTT 3 mM). La fluorescencia es determinada durante 45 minutos con agitación constante a 37°C.

#### **5. Inmunocitoquímica**

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos y sometidas a la AG. Al finalizar el tratamiento se realizaron 3 lavados con PBS 0.1 M por 3 minutos; posteriormente se fijaron con metanol 100% durante 20 minutos sobre hielo. El bloqueo se realizó con PBS-Albúmina 5 % Tritón X100 0.03 % durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (anti-LC3) se incubó durante toda la noche en la misma solución que la del bloqueo. El anticuerpo secundario se incubó durante 12 horas en PBS-Albúmina 5% protegido de la luz.

#### **6. Viabilidad Celular**

##### **6.1 MTT**

Las células fueron expuestas a 2 h de AG y 22 h después se evaluó la sobrevivencia a través de la reducción del bromuro 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT), que es un índice de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. Se añadieron 54 µg/ml de MTT y se incubó durante 1 hora a 37°C; al término se observa la formación de cristales de color azul-morado los cuales son solubilizados con 800 µl de isopropanol-HCl. Se determinó la absorbancia con un espectrómetro de luz visible a 570 nm.

##### **6.2 Liberación de LDH**

Como índice de sobrevivencia también se cuantificó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), empleado para valorar principalmente el componente de la muerte necrótica. Las células fueron expuestas a la AG durante 2 h y 15 h después, se colectó el medio para determinar la actividad de la LDH. El ensayo consiste en determinar la oxidación de NADH a NAD por la actividad de la LDH en presencia de piruvato utilizado como sustrato. Al cabo de 15 horas de RG se remueven 200 µl de medio, se mezclan con 760 µl de buffer de fosfatos 1 mM y 20 µl de NADH 18.8 mM en el mismo buffer. Las muestras se incuban durante 5 min a temperatura ambiente. La reacción se inicia añadiendo 20 µl de piruvato 1 M. Los cambios en la absorbancia son cuantificados a 340 nm en un espectrofotómetro durante 5 minutos.

## VIII. RESULTADOS

Los cultivos corticales de embriones de rata de 17 días de gestación, se mantuvieron durante 7 días in vitro (DIV), al séptimo días fueron expuestos a condiciones de AG. Las condiciones establecidas para el periodo de AG fueron estandarizadas logrando la mayor reproducibilidad en los resultados entre los distintos experimentos realizados.

El periodo de AG se indujo cambiando el medio en el cual las células fueron sembradas por un medio mínimo libre de glucosa DMEM. Simultáneamente se realizaron experimentos para determinar si el cambio de medio per se provoca alguna respuesta en los cultivos neuronales, en esta condición se añadió glucosa a una concentración final 20 mM (CM) al medio DMEM.

### 1. La autofagia es activada rápidamente durante la ausencia de glucosa

Para determinar si la autofagia esta presente en los cultivos corticales sometidos a la AG es importante evaluar distintos marcadores asociados a las diferentes etapas de este mecanismo. Primero evaluamos la conversión de la proteína LC3; bajo condiciones de no inducción de autofagia LC3-I se encuentra distribuida a lo largo del citosol y es requerida para la formación de los autofagosomas. Durante la etapa de maduración de la autofagia esta proteína es lipidada (LC3-II) al formar un enlace covalente con la fosfatidil etanolamina y es reclutada hacia las estructuras de doble o multi membrana considerándose como el principal marcador de la formación de autofagosomas. La conversión de LC3-I a LC3-II es analizada mediante inmunoblot donde estas dos proteínas poseen una movilidad electroforética diferencial.

El índice LC3-II/LC3-I aumentó gradual y significativamente desde 0.5 h hasta las 2 h de AG. Entre 1 y 4 h de RG se mantuvo elevado pero a niveles menores que los observados durante la AG. Entre las 6 y 8 h de RG disminuyó a niveles similares a los de la condición control. Finalmente el cociente LC3-II/LC3-I se elevó nuevamente entre las 12 y 24 h de RG (Figura 5a y b).

Una de las proteínas involucradas en la iniciación del proceso de autofagia es la Beclina 1, que forma parte del complejo PI3K de tipo III y es esencial para la formación de los autofagosomas mediando la localización de otras proteínas de la maquinaria de autofagia en la membrana del pre-autofagosoma (Kihara et al., 2001). Comúnmente esta proteína disminuye sus niveles conforme progresa la autofagia debido a que es degradada. Los niveles de Beclina 1 disminuyeron significativamente a partir de 1.5 h de AG y permanecieron igual hasta las 2 h de RG. A las 4 h de RG los niveles de esta proteína volvieron a la normalidad manteniéndose así hasta las 12 h de RG (Figura 5a y b). Sin embargo después de 16 h de RG los niveles de Beclina 1 incrementaron significativamente con respecto al control manteniéndose elevados hasta las 24 h de RG.

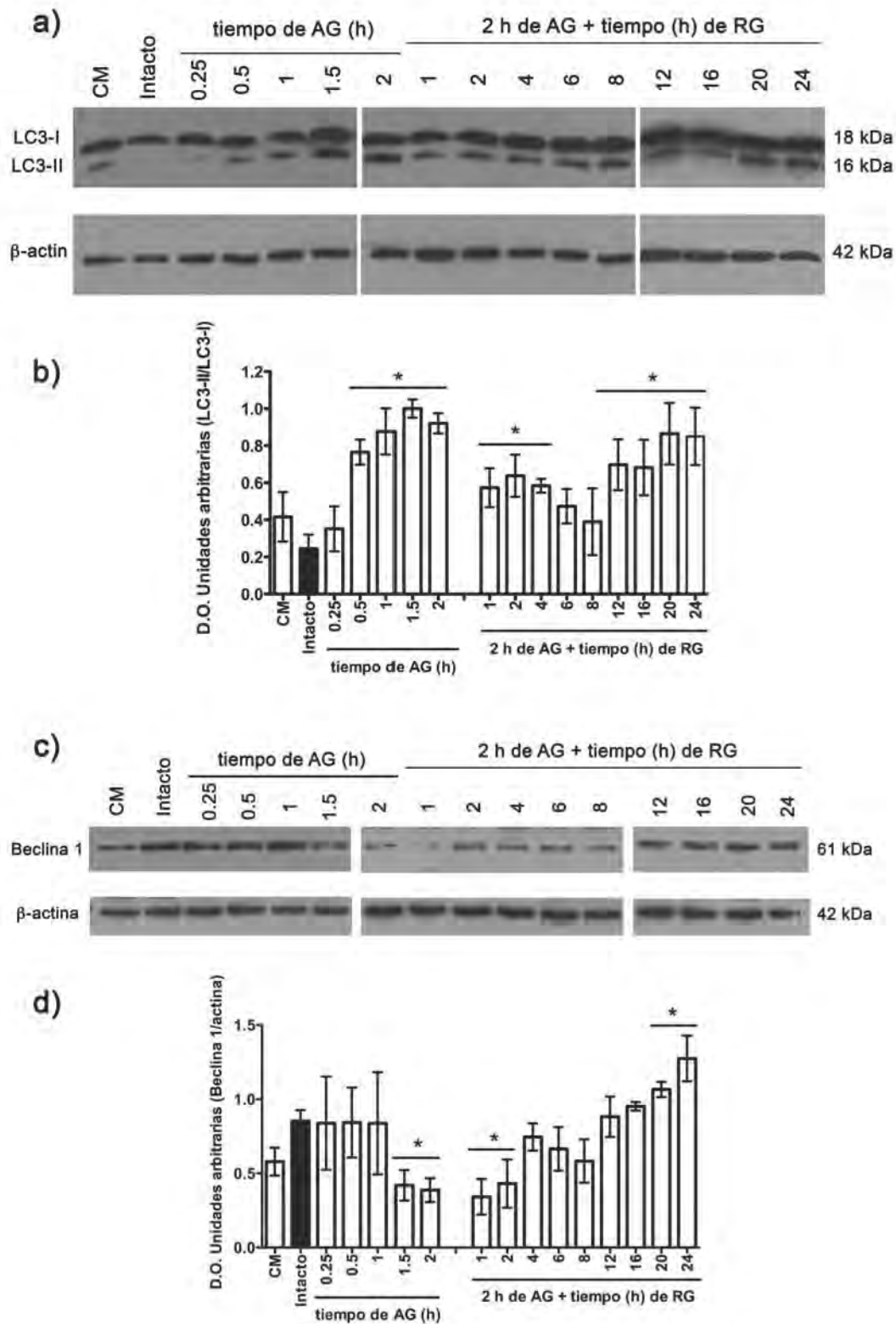


Figura 5. Niveles de proteínas relacionadas con el mecanismo de autofagia durante el periodo de AG y RG. a) Western-blot representativo de la conversión de LC3-I a LC3-II. b) Cuantificación del índice LC3-II/LC3-I. c) Western-blot representativo de los niveles de Beclina 1. d) Cuantificación de los niveles de Beclina 1 con respecto a la actina. Las barras representan la media  $\pm$  ES (n=5) prueba de *t* \* $p < 0.05$  respecto al intacto.

Siendo la autofagia un mecanismo tan complejo, determinar la activación de dicho proceso así como la formación y acumulación de autofagosomas mediante la conversión de LC3 y el cambio en los niveles de Beclina 1 no es suficiente. Por ello determinamos la formación de autofagosomas mediante la detección de la formación de los mismos con inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo que detecta tanto a LC3-I como a LC3-II. Esto nos permite observar la formación de un patrón punteado debido a la lipidación e integración de LC3-II en las vesículas de doble o multi membrana, indicando la formación de autofagosomas.

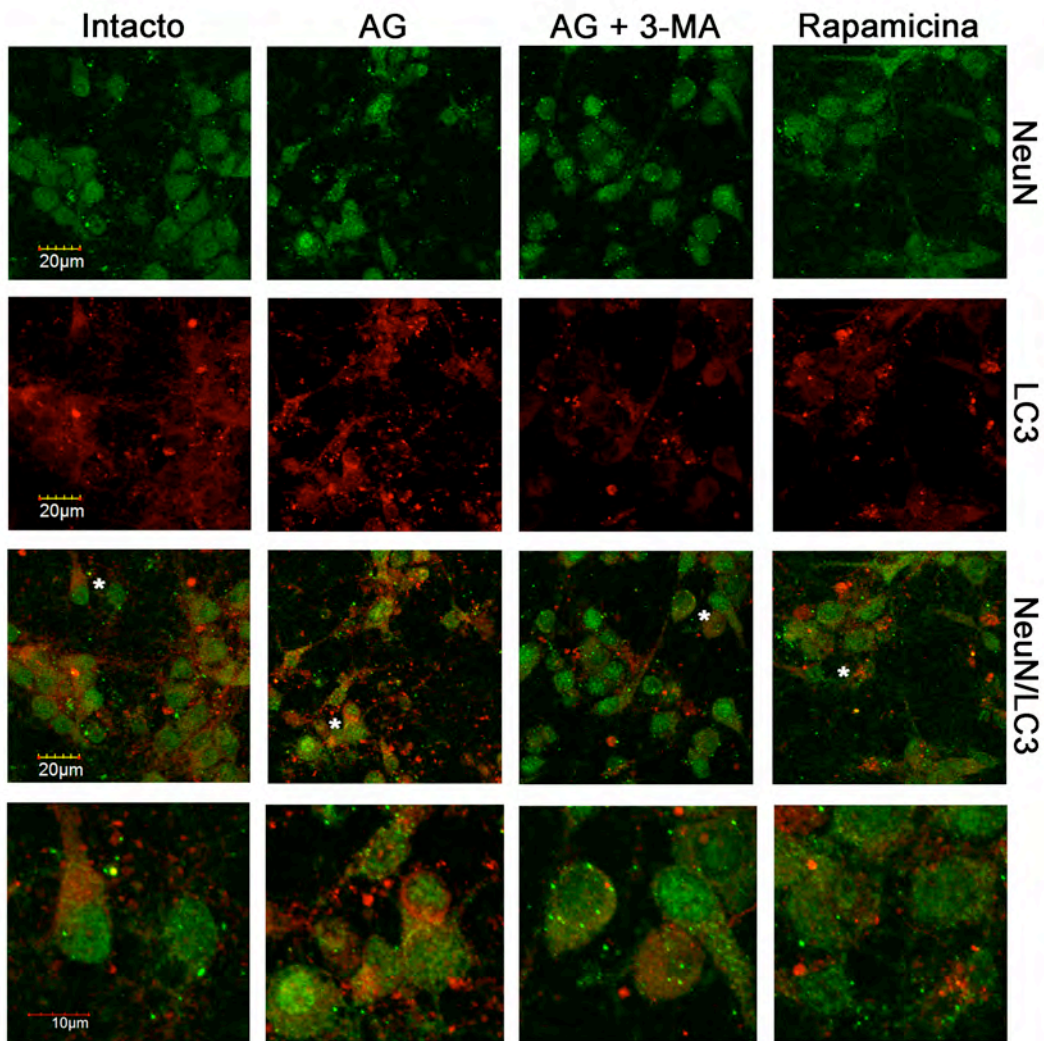


Figura 6. Formación de autofagosomas en células corticales expuestas a 1 h de AG. Las células fueron marcadas con anticuerpos contra NeuN (verde) y LC3 (rojo). Se pre-incubaron 30 min antes y durante el periodo de AG con 3-MA, además se utilizó Rapamicina como control positivo incubando a las células durante 4 h. Las imágenes del panel inferior representan la magnificación de las células marcadas con un asterisco.



Después de 1 h de exposición a la AG (tiempo en el cual se llega al máximo de lipidación de LC3, Figura 5a y b), las células corticales mostraron un incremento del patrón punteado de fluorescencia a LC3 sugiriendo la formación de autofagosomas en el soma de la neuronas (Figura 6). Sin embargo dicho incremento en la formación de autofagosomas no fue generalizado. A manera de confirmar los resultados obtenidos por la exposición a la AG, los cultivos corticales fueron pre-incubados durante 30 min antes del periodo de AG e incubados durante la AG con el inhibidor de la PI3K tipo III, 3-metiladenina (3-MA), el cual inhibe el proceso de formación de autofagosomas (Figura 6). Durante dicho tratamiento se observa una disminución en la marca punteada indicando una menor proporción de autofagosomas. Los cultivos corticales tratados con Rapamicina, un inhibidor de mTOR e inductor de la autofagia muestra la presencia de autofagosomas (Figura 6).

## **2. Activación de la vía autofágica/lisosomal**

Los resultados mostrados en las figs. 5 y 6 sugieren fuertemente la activación del mecanismo de autofagia, dada la formación y acumulación de autofagosomas iniciada por la AG. Sin embargo, se ha sugerido que este mecanismo pueda ser interrumpido en la fase de maduración de los autofagosomas (Mizushima et al., 2010), por lo que es importante determinar si los autofagosomas acumulados durante la fase de AG continúan el flujo autofágico hacia la degradación.

Para ello se determinó la actividad de la catepsina B, considerada como la principal proteasa lisosomal involucrada en la degradación del contenido de los autofago-lisomas en el sistema nervioso. Utilizando un ensayo fluorométrico determinamos la activación de dicha proteasa durante todo el curso temporal de AG y RG (Figura 7). Los resultados muestran un aumento significativo y transitorio en la actividad de la enzima entre las 0.25 h y 1 h después de la AG. Posteriormente la actividad de la catepsina B regresa a los niveles basales durante la RG y vuelve a aumentar significativamente y de manera mas sostenida de las 8 a las 16 h de RG (Figura 7). La actividad vuelve a disminuir entre las 20 y 24 h de RG. Estos resultados sugieren que la vía autofágica/lisosomal es activada por la AG en los cultivos corticales.

## **3. Contribución del mecanismo de autofagia a la muerte neuronal inducida por la AG**

Los resultados demuestran que el mecanismo de autofagia está presente en los cultivos corticales sometidos a la AG y es por ello importante determinar si este mecanismo contribuye a la muerte neuronal inducida por la AG.

La sobrevivencia neuronal se determinó a través de 2 ensayos: 1) la reducción del bromuro 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT), que es un índice de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en células vivas y 2) la liberación de LDH en el cual las células que pierdan la integridad de su membrana celular liberan la enzima al espacio extracelular. En estos experimentos después del periodo de AG, los cultivos fueron sujetos a la reintroducción del medio en el cual fueron sembradas originalmente (RG)

durante un periodo de 22 h en el caso de los ensayos de MTT y 15 h para los de LDH. Los ensayos de LDH se hicieron antes de las 24 h porque experimentos piloto mostraron que a las 24 h se detecta muy poca actividad de esta enzima posiblemente debido a que esta enzima se degrada después de ser liberada al medio. Al mismo tiempo se llevaron a cabo las pruebas con distintos inhibidores farmacológicos de distintas proteasas o de vías relacionados con el mecanismo de autofagia. Algunas muestras se sometieron únicamente al CM para determinar un posible daño neuronal por esta condición.

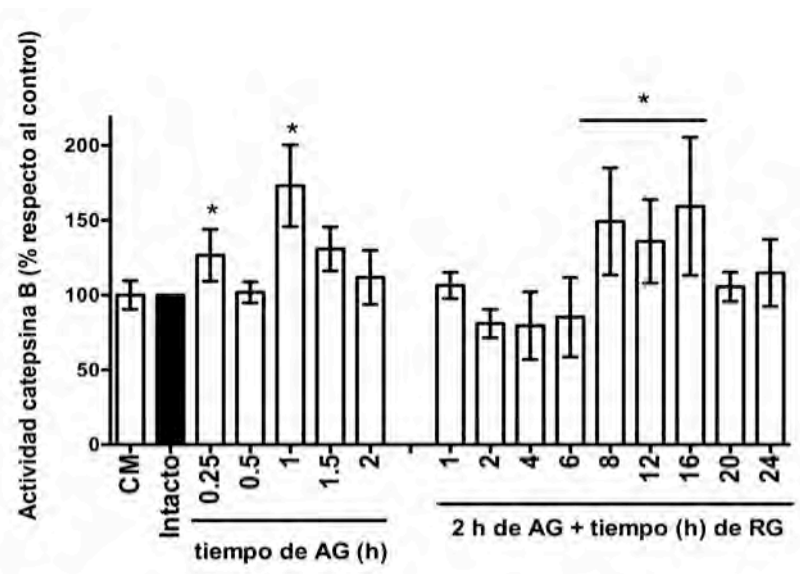


Figura 7. Actividad enzimática de la catepsina B después de la exposición de los cultivos corticales a distintos tiempos de AG y RG. Las barras representan la media  $\pm$  ES (n=5) prueba de  $t$  \* $p < 0.05$  respecto al intacto.

La exposición de las células corticales al periodo AG repercutió en la sobrevivencia neuronal. Después de 22 h las células sometidas a 2 h de AG presentaron una disminución de la sobrevivencia del 55% (Figura 8a) con respecto a las intactas en el ensayo de reducción de MTT. Al someter las neuronas a 2 h de AG y 15 h de RG la liberación de LDH fue 70% mayor respecto al control intacto (Figura 8b).

Los cultivos corticales expuestos al CM mostraron una disminución de la reducción MTT del 15% y una liberación de LDH de 20% con respecto al control intacto. Con la finalidad de demostrar que la AG es la responsable de la muerte neuronal observada, se realizaron experimentos en los cuales se añadió piruvato 10 mM como sustrato energético alternativo. Bajo estas condiciones el piruvato previno la muerte inducida por la AG presentándose un porcentaje de muerte muy similar al inducido por el CM. Esta observación sugiere que la mayor parte de la muerte en el modelo utilizado es inducido por la AG. Sin embargo existe un componente de muerte que no está asociado a la falta de sustrato energético.

Por otra parte, con el fin de conocer si la muerte observada en este modelo es iniciada por el fenómeno de excitotoxicidad se probó el antagonista de los receptores a NMDA, MK-801, incubándolo durante el periodo de AG. Este fármaco fue capaz de rescatar completamente la reducción del MTT y disminuir eficientemente la liberación de LDH (Figura 8a y b).

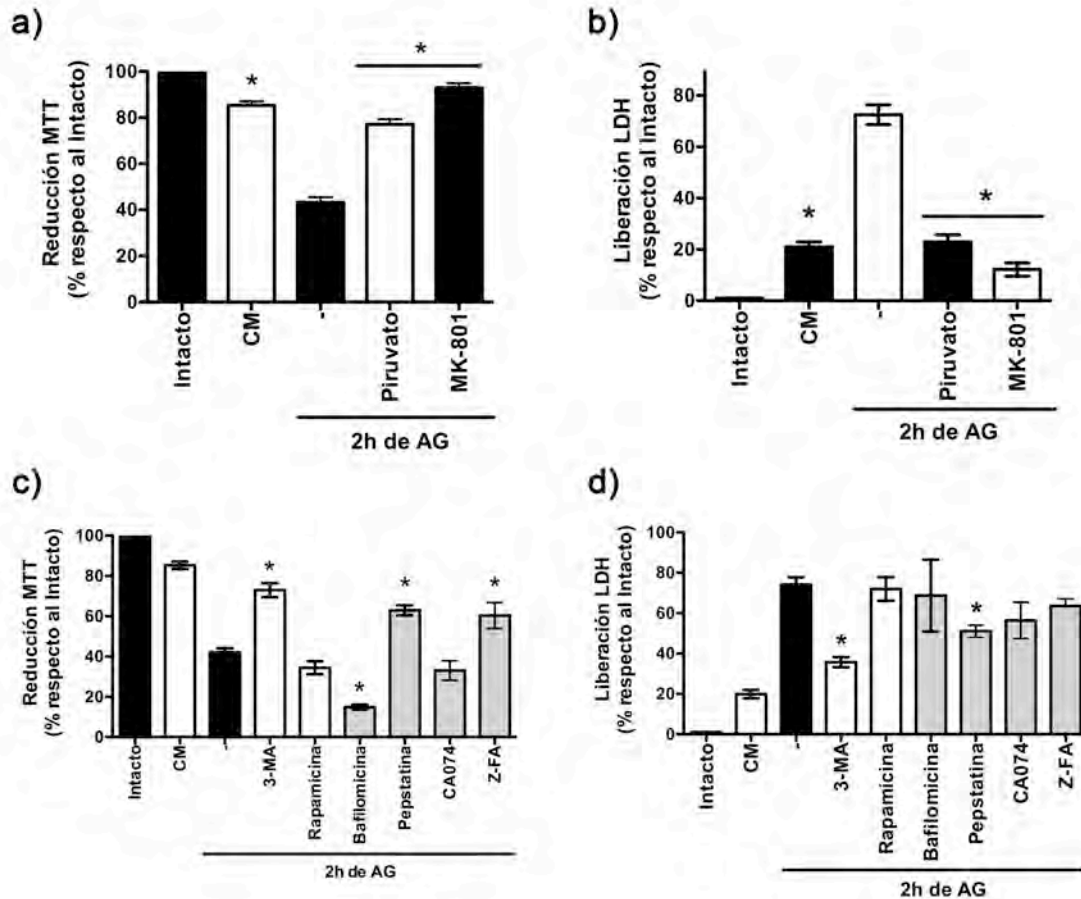


Figura 8. Ensayos de supervivencia neuronal, MTT (a,c) y LDH (b,d) de los cultivos corticales sometidos a 2 h de AG y 22 h ó 17 h de RG, respectivamente, en presencia y ausencia de piruvato y de distintos inhibidores farmacológicos relacionados con el mecanismo de autofagia. Cada barra representa la media  $\pm$  ES (n=8-10) prueba de *t* \* $p < 0.05$  respecto a la AG.

Para conocer la contribución del mecanismo de autofagia a la muerte o a la supervivencia neuronal se utilizó el inhibidor de la PI3K de tipo III, 3-MA. Dicho fármaco fue pre-incubado por 30 minutos e incubado durante el periodo de AG. Los cultivos expuestos a 3-MA mostraron un aumento significativo en la reducción del MTT de alrededor del 30% con respecto a la condición de AG. Acorde con este resultado, el 3-MA previno la liberación de LDH en comparación con la condición de AG (Figura 8c y d; Figura 9). Por otra parte se utilizó el inhibidor de la cinasa mTOR, rapamicina, para inducir la autofagia con el fin de corroborar que este mecanismo participa activamente en la muerte neuronal inducida por la AG. La rapamicina fue pre-incubada durante 30 min e

incubada durante el periodo de AG. En presencia de este fármaco no se exacerbó la muerte neuronal inducida por la AG al ser evaluada tanto por la reducción de MTT como por la liberación de LDH (Figura 8c y d). En la fig. 9 se muestran micrografías representativas del efecto protector del MK-801 y el 3-MA en contra de la muerte inducida por AG, y la falta de efecto de la rapamicina.

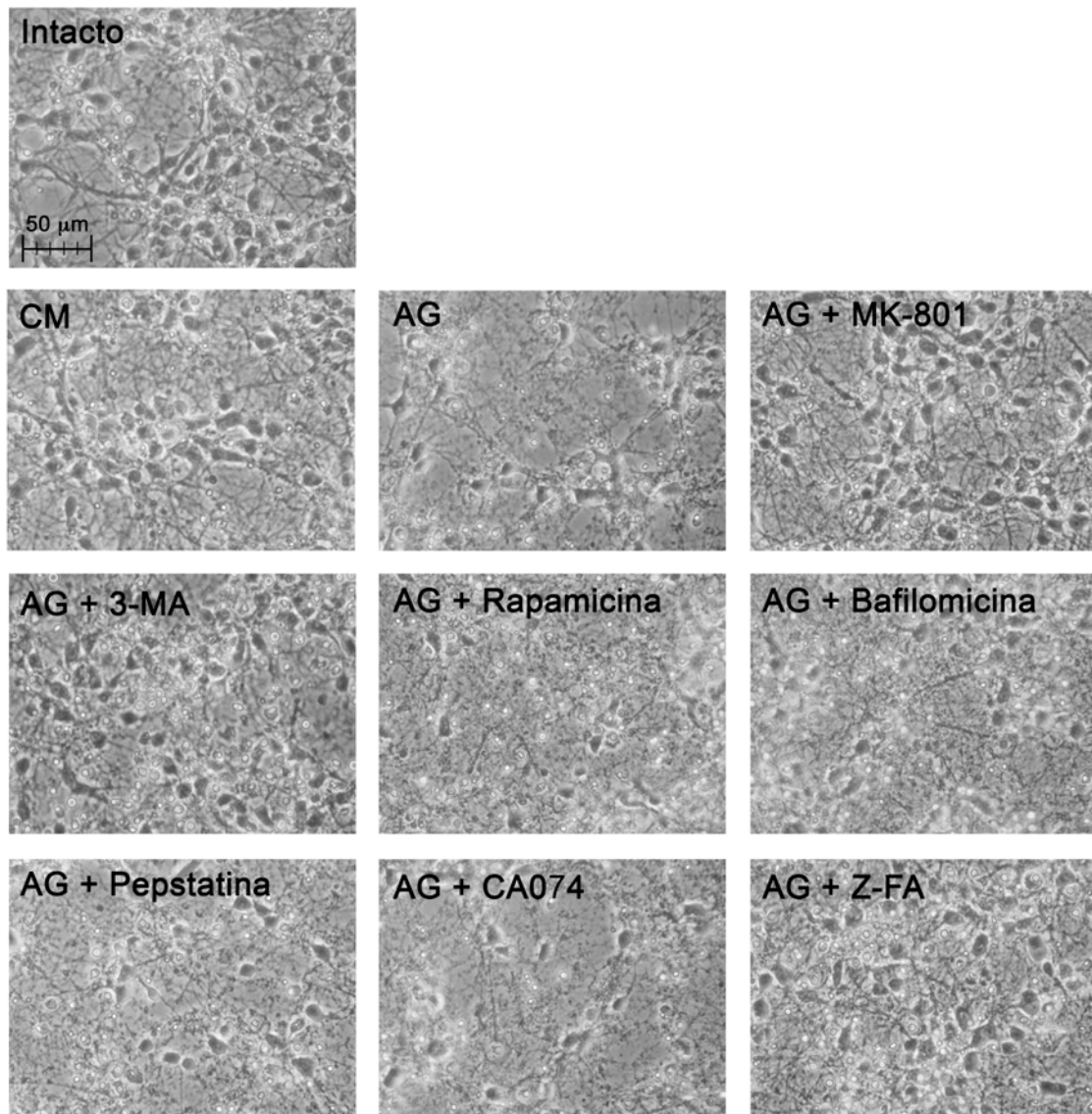


Figura 9. Fotografías representativas de los cultivos corticales sometidos a 2 h de AG en presencia o ausencia de distintos inhibidores relacionados con el mecanismo de autofagia. MK-801 y Bafilomicina fueron incubados únicamente durante el periodo de AG. 3-MA, Rapamicina, Pepstatina, CA074 y Z-FA fueron pre-incubados durante 30 min antes de la AG e incubados durante las 2 h de AG.

Como se había mencionado anteriormente se ha observado que el mecanismo de autofagia puede quedar suspendido en la etapa de maduración indicando que la vía autofágica/lisosomal no se completa (Mizushima et al., 2010). Basados en estos antecedentes decidimos probar distintos fármacos capaces de inhibir el proceso de degradación lisosomal.

La presencia de Bafilomicina, un inhibidor de la V-ATPasa, durante el periodo de AG resultó en un aumento significativo de la muerte neuronal determinada por la reducción de MTT, sin embargo no se observaron cambios en la liberación de LDH con respecto a la AG. Por otra parte, se utilizaron dos inhibidores de la catepsina B, el Z-FA y el CA074, y un inhibidor de la catepsina D, la pepstatina. Todos los inhibidores fueron pre-incubados durante 30 minutos antes del periodo de AG e incubados durante la AG. El inhibidor de la catepsina D tuvo un efecto protector contra la muerte neuronal provocada por la AG al aumentar la reducción de MTT y reducir la liberación de LDH significativamente (Figura 8c y d; Figura 9). Por otra parte los inhibidores de la catepsina B tuvieron efectos diferentes (Figura 8c y d), el CA074 no mostró efecto alguno ante el daño causado por la AG. Sin embargo, el Z-FA, previno significativamente la muerte de las neuronas evaluada por el ensayo de sobrevivencia del MTT, pero no tuvo efecto en la liberación de LDH (Figura 8c y d). En la fig. 9 se muestran micrografías representativas de los efectos de los distintos inhibidores sobre la apariencia morfológica de las células, mostrando un efecto protector de la pepstatina y el Z-FA pero no del CA074.

Todos estos resultados en conjunto sugieren una rápida activación del mecanismo de autofagia durante el periodo de AG. Sin embargo, aparentemente este mecanismo vuelve a activarse durante las ultimas etapas de la RG. Por otra parte, la vía autofágica/lisosomal contribuye aparentemente a la muerte neuronal inducida por la AG. De aquí que investigamos si los distintitos fármacos utilizados en los ensayos de sobrevivencia modulan la acumulación de autofagosomas y la activación de la vía lisosomal.

Los cultivos corticales fueron expuestos a 1 h de AG en presencia de los distintos inhibidores relacionados con la vía autofágica/lisosomal y se determinó la conversión de LC3-I a LC3-II. Como ya se había mostrado anteriormente la exposición de la neurona a la AG induce el aumento de los niveles de LC3-II y la activación de la catepsina B, no obstante el tratamiento con 3-MA es capaz de reducir los niveles de LC3-II y evitar la actividad de la catepsina B corroborando así el efecto de dicho fármaco sobre el mecanismo de autofagia (Figura 10a y b). Al utilizar el inductor de la autofagia, rapamicina, observamos un incremento de los niveles de LC3-II y de la actividad de la catepsina B con respecto al control intacto, pero no una potenciación del efecto de la AG (Figura 10a y b).

Siendo que el antagonista de los receptores a NMDA, MK-801 es capaz de rescatar casi completamente de la muerte neuronal inducida por la AG, determinamos su efecto sobre la conversión de LC3 y la actividad de la catepsina B. Los resultados no muestran cambio en la lipidación de LC3-II, sin embargo el MK-801 fue capaz de evitar la activación de la catepsina B (Figura 10a y b).

Cuando utilizamos los fármacos relacionados con la activación de la vía lisosomal, la bafilomicina no mostró cambios en los niveles de LC3-II, aunque los inhibidores de las catepsinas B y D (CA074 y pepstatina) provocaron un incremento de los niveles de LC3-I y LC3-II (Figura 10a y b). Sin embargo al determinar la actividad de la catepsina B, como era de esperarse la bafilomicina y el inhibidor específico de dicha proteasa, CA074, fueron capaces de abatir completamente dicha actividad incluso por debajo de los niveles del control intacto en el caso del CA074 (Figura 10a y b). En el caso de la pepstatina no observamos cambios en dicha actividad (Figura 10a y b).

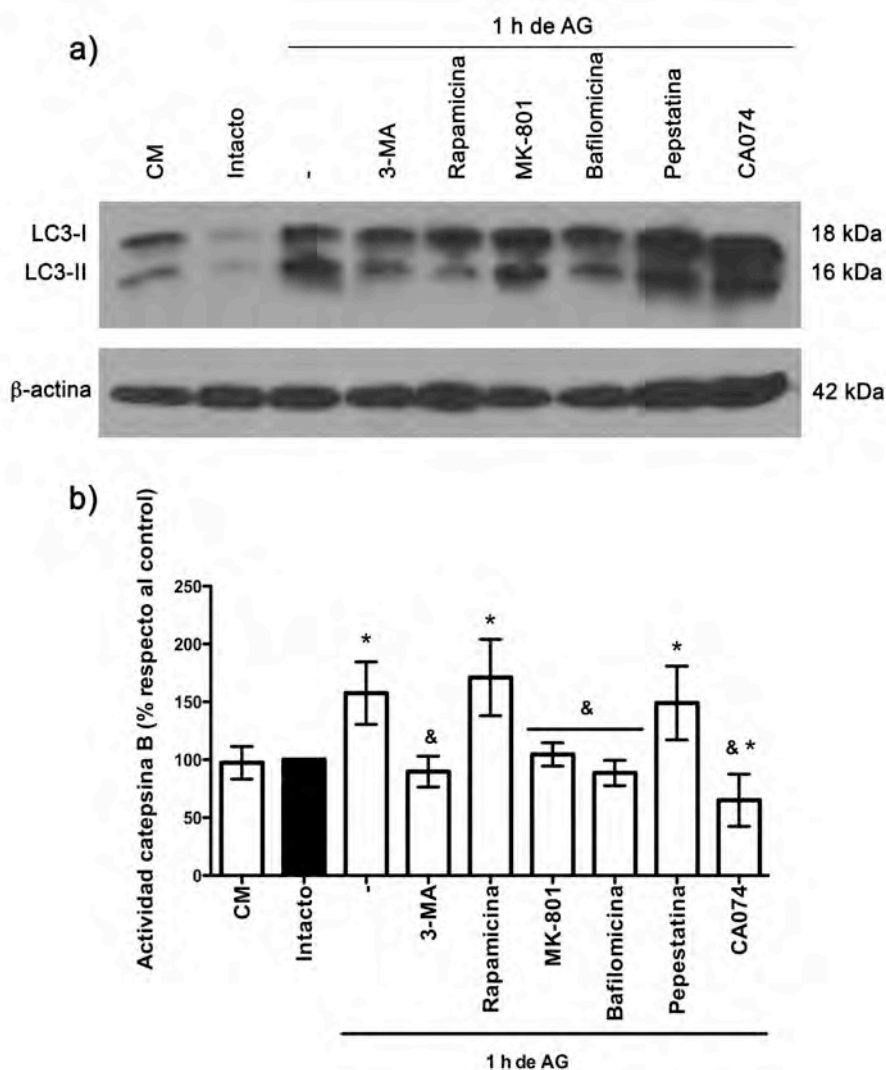


Figura 10. Efecto de distintos fármacos sobre la conversión de LC3-I a LC3-II (a) y la actividad de la catepsina B (b) evaluados después de 1 h de AG. a) Western-blot representativo de la conversión de LC3-I a LC3-II. b) Actividad enzimática de la catepsina B. Cada barra representa la media  $\pm$  ES (n=3) *prueba de t* \* $p < 0.05$  respecto al intacto, & $p < 0.05$  respecto a la AG.

## IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El daño neuronal provocado por la AG es iniciado por el mecanismo excitotóxico asociado principalmente a la sobreactivación del receptor a glutamato de tipo NMDA. La entrada masiva de calcio a la célula desencadena una serie de eventos los cuales definirán el destino de la célula. Inicialmente se creía que la muerte neuronal inducida por la hipoglucemia era de tipo necrótico, sin embargo existen evidencias bioquímicas de la participación de muerte celular programada. Es por ello que en el presente estudio postulamos la participación de la autofagia en el modelo de ausencia de glucosa.

La autofagia es un sistema responsable de la degradación de porciones citoplasmáticas y encargado del recambio de componentes citoplasmáticos dañados y proteínas mal plegadas, también es considerado un mecanismo central para la adaptación ante la falta de sustratos energéticos. Por tanto es de esperarse que promueva la sobrevivencia neuronal ya sea eliminando proteínas y organelos dañados proveyendo a la célula de sustratos necesarios para mantener las funciones vitales bajo condiciones limitantes. Sin embargo, diversos estudios demuestran que la autofagia puede promover la muerte neuronal a través de una excesiva degradación de componentes esenciales o por la interacción o activación de la apoptosis. Pocos son los estudios dedicados a determinar mediante aproximaciones bioquímicas y morfológicas la participación de los distintos mecanismos de muerte activados después del daño hipoglucémico. No obstante otra patología estrechamente relacionada es la isquémica cerebral, donde diversos estudios han demostrado la activación de la autofagia tanto in vivo como in vitro (Adhami et al., 2006; Rami et al., 2008; Wen et al., 2008; Carloni et al., 2008; Koike et al., 2008; Qin et al., 2008), así como en modelos de excitotoxicidad inducida por agonistas de los receptores de glutamato (Borsello et al., 2003; Wang et al., 2008; Sadasivan et al., 2010; Pérez-Carrión et al., 2012)

El principal marcador utilizado para determinar la formación de los autofagosomas es la conversión de LC3, comúnmente esta proteína se encuentra en el citoplasma, pero bajo condiciones de inducción de la autofagia, es lipidada y redistribuida hacia las vesículas de doble o multi-membrana. Otro marcador comúnmente utilizado para determinar la activación del mecanismo de autofagia es la Beclina 1, proteína que forma parte del complejo PI3K tipo III. Este complejo es importante para la relocalización hacia la membrana del pre-autofagosoma de la maquinaria de autofagia y por tanto para la formación de los autofagosomas. Diversos estudios muestran el aumento en los niveles de la Beclina 1 ante la inducción de la autofagia, incremento que precede a la conversión de LC3-II. En nuestros resultados se observa que la AG induce la disminución transitoria de los niveles de Beclina 1. Es posible que los niveles basales de dicha proteína sean suficientes para iniciar la inducción de la autofagia y que disminuyan cuando el proceso de degradación lisosomal es iniciado, ya que nuestros resultados muestran un pico máximo de activación de la catepsina B a 1 h de AG.

Nuestros resultados muestran un rápido aumento en los niveles de LC3-II durante el periodo de AG y un segundo pico en la últimas etapas del periodo de RG, indicando la formación y acumulación de autofagosomas.

Estudios realizados en fibroblastos sometidos a estresores del retículo endoplásmico indican que el procesamiento de LC3 puede ocurrir sin que esta proteína sea reclutada hacia la membrana de los autofagosomas (Ogata et al., 2006), sugiriendo que el análisis de la conversión de LC3-I a LC3-II no es suficiente debido a la complejidad del mecanismo de autofagia. Para corroborar la formación de autofagosomas en nuestro modelo, se realizó inmunocitoquímica, donde se observó el incremento en la intensidad y el cambio hacia un patrón punteado de la marca de LC3, demostrando así la formación de autofagosomas durante la AG. Además, la presencia de autofagosomas fue abatida en presencia de 3-MA, un inhibidor de la vía PI3K tipo III.

Se sugiere que la autofagia puede ser interrumpida en la etapa de maduración de autofagosomas, tal es así que su presencia no es suficiente para asegurar la participación de la vía autofágica/lisosomal ante un estímulo como lo es la AG. Por ello se determinó la actividad de la catepsina B, considerada la principal proteasa lisosomal responsable de la degradación del contenido citoplasmático de los autofagolisosomas. Nuestros resultados muestran la actividad transitoria pero significativa de la actividad enzimática de la catepsina B durante el periodo de AG y un segundo pico en las últimas etapas del periodo de RG. Diversos reportes muestran la activación de dicha proteasa posterior al aumento en la acumulación de autofagosomas, sin embargo en nuestros resultados dicho incremento en la actividad de la catepsina B no sigue este patrón y pareciera no correlacionar con el aumento en la lipidación de LC3, por lo que es importante determinar la actividad de otras catepsinas como la catepsina D y conocer si su actividad aumenta después de la acumulación de los autofagosomas.

La autofagia no solo es capaz de degradar proteínas solubles en el citoplasma, también organelos completos como la mitocondria o regiones de organelos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Wen et al., 2008), incluso estudios pioneros han demostrado en levaduras la degradación selectiva de áreas del núcleo. Tal es así que la excesiva actividad de la autofagia es capaz de promover daño celular dando lugar a muerte celular autofágica considerada como muerte celular programada tipo II (Qin et al., 2010).

La contribución de la autofagia a la sobrevivencia o la muerte es controversial. Recientemente se demostró en el pre-condicionamiento isquémico, que la pre-activación de la autofagia previene la muerte por isquemia al modular el estrés del RE (Sheng et al., 2012). También se ha sugerido su efecto protector en el modelo de hipoxia/isquemia neonatal (Carloni et al., 2008). Por otra parte, se ha demostrado que los ratones knock-out de Atg7 presentan menor muerte neuronal en las células piramidales del CA1 posiblemente por la disminución de la apoptosis (Koike et al., 2008). La inhibición farmacológica de la vía autofágica/lisosomal con 3-MA, Z-FA y/o Bafilomicina ha mostrado reducir la muerte neuronal en distintos modelos de daño (Sadasivan et al., 2010; Qin et al., 2010) posiblemente por medio de la modulación de proteínas anti-



apoptóticas como Bcl-2 (Wang et al., 2008; Wen et al., 2008), sugiriendo la contribución de la autofagia a la muerte neuronal. Sin embargo, bajo condiciones de estrés reticular la inhibición de la autofagia exacerba la muerte celular indicando que dicho proceso actúa como mecanismo de degradación de las proteínas mal plegadas ayudando a disminuir el estrés del retículo endoplásmico (Ogata et al., 2006; Li et al., 2008; Haibin et al., 2011). La disparidad entre los resultados depende de distintos factores: el tipo celular, la severidad del daño, la madurez del cerebro y la vulnerabilidad selectiva, entre otros. Por ello consideramos importante determinar si la autofagia presente en el modelo de AG actúa como mecanismo de sobrevivencia o muerte después del daño neuronal.

El tratamiento con 3-MA de los cultivos corticales durante el periodo de AG fue capaz de prevenir la muerte neuronal a través de la modulación de la formación de autofagosomas y de la activación de la catepsina B. Para corroborar dicho resultado incubamos las células sometidas a la AG con rapamicina, inhibidor de mTOR e inductor de la autofagia esperando que la muerte celular se viera potenciada. No obstante el tratamiento con rapamicina no mostró cambios con respecto a la AG, sugiriendo que la activación de la vía autofágica/lisosomal aparentemente alcanza sus niveles máximos ante la falta de glucosa. Con estas evidencias demostramos que el mecanismo de autofagia contribuye a la muerte neuronal inducida por la AG.

Al probar el efecto de los inhibidores de las proteasas lisosomales, solamente el inhibidor de la catepsina D, pepstatina, mostró un efecto neuroprotector contra el daño inducido por la AG sugiriendo la participación activa de dicha proteasa lisosomal en la degradación citoplasmática. Por otra parte, de los inhibidores de la catepsina B, el CA074 no mostró efecto alguno contra la muerte inducida por la AG, indicando que esta proteasa lisosomal pudiera no estar jugando una función importante en la degradación del contenido de los autofago-lisosomas. Por su parte el otro inhibidor utilizado el Z-FA fue capaz de prevenir la muerte al ser evaluado por el ensayo de reducción MTT, sin embargo se ha mostrado que este compuesto puede inhibir a las caspasas, por lo que no se puede descartar que su efecto protector se deba a la inhibición de la apoptosis (López-Hernández et al., 2003). Esta hipótesis toma sustento en el resultado obtenido en la reducción MTT más no en el de LDH, ya que se propone que el primero podría estar relacionado a la muerte celular apoptótica y el segundo a la muerte necrótica.

Diversos estudios muestran el efecto protector de la bafilomicina y su efecto en la inhibición de la vía autofágica/lisosomal. Sin embargo, los presentes resultados muestran un efecto contrario, ya que la bafilomicina exacerba la muerte neuronal. Posiblemente este efecto se deba a la concentración de bafilomicina utilizada, ya que a altas concentraciones inhibe completamente la V-ATPasa promoviendo la acumulación de autofagosomas e iniciando la apoptosis dependiente de Bax (Shacka et al., 2006). No obstante la protección obtenida al inhibir la vía autofágica/lisosomal con 3-MA, pepstatina o Z-FA, no es completa sugiriendo la posible participación de otros mecanismos de muerte como la apoptosis.

En la isquemia cerebral la muerte neuronal tardía ha sido atribuida a la apoptosis, sin embargo las evidencias demuestran la activación de la autofagia después del daño isquémico, aunque la contribución de este mecanismo a la muerte es aún controversial. Particularmente existen evidencias bioquímicas en ratas sujetas a hipoglucemia de la activación de la caspasa 3 y de la calpaína (Ferrand-Drake et al., 2003), sugiriendo una posible función de éste mecanismo en la muerte neuronal inducida por la AG.

La autofagia y la apoptosis pueden ser inducidas de forma secuencial siendo que estos dos procesos comparten señales de activación y ciertas vías están estrechamente relacionadas con las maquinarias de ambos mecanismos (Baek et al., 2012). Bajo ciertas circunstancias la inducción de la autofagia es esencial para que ocurra la apoptosis, porque la autofagia promueve el catabolismo de las células provocando la elevación de los niveles de ATP necesarios para inducir la muerte apoptótica. De esta forma la inhibición de la autofagia podría retrasar e incluso inhibir a la apoptosis. Por otra parte, la autofagia puede actuar como un mecanismo protector en contra de la muerte apoptótica, es así que la inhibición de la autofagia potenciaría a la apoptosis (Ghavami et al., 2012). Los resultados obtenidos por Koike et al. (2008) demuestran que la autofagia puede activar efectores dependientes e independientes de caspasas después de la isquemia. En el mismo sentido en miofibroblastos sometidos a ácidos grasos trans, la autofagia es necesaria para la activación de la muerte apoptótica dependiente de caspasa 3 y 7 (Ghavami et al., 2012). Se ha postulado que las proteasas lisosomales como la catepsina B son capaces de activar a la caspasa 3 a través de la caspasa 11 e inducir apoptosis (Wen et al., 2008).

En base a los resultados obtenidos sugerimos que la autofagia activada por la ausencia de glucosa contribuye a la muerte neuronal, ya que el inhibir dicho mecanismo resulta en una disminución de la muerte neuronal. Nuestros resultados muestran un segundo pico de acumulación de autofagosomas y de actividad de catepsina B en las últimas etapas de la RG, sugiriendo que este mecanismo podría participar en la muerte celular tardía. Estudios pioneros y en nuestros resultados observamos el efecto protector del antagonista de los receptores a glutamato de tipo NMDA, indicando que el daño neuronal en la hipoglucemia es iniciado por el fenómeno de excitotoxicidad, sin embargo el MK-801 no fue capaz de prevenir la formación de autofagosomas, sugiriendo que la activación de la autofagia podría estar asociada a una cascada de eventos iniciados por la ausencia de glucosa per se. Por otra parte, este antagonista si abate la activación de la catepsina B, sugiriendo que existen eventos ligados a la excitotoxicidad que llevan a la activación de las proteasas lisosomales.

A pesar de estar ampliamente documentado el efecto inhibitorio del 3-MA sobre el mecanismo de autofagia sigue siendo controversial su efecto. Por ello es necesario utilizar inhibidores farmacológicos de nueva generación que sean más específicos o el silenciamiento de genes esenciales para la autofagia como Atg5 y Atg7, para abatir completamente la activación del mecanismo de autofagia y probar su efecto sobre la muerte en condiciones de AG. Estudios posteriores son necesarios para conocer las vías de activación del mecanismo de autofagia y su interacción con los diversos eventos iniciados por la AG

## X. REFERENCIAS

- Adhami F, G Liao, YM Morozov, A Schloemer, VJ Schmithorst, JN Lorenz, RS Dunn, CV Vorhees, M Willis-karp, JL Degen, RJ Davis, N Mizushima, P Rakic, BJ Dardzinski, SK Holland, FR Sharp & CY Kuan. 2006. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Neurobiology*. 169: 566-583.
- Auer RN, T Wieloch, Y Olsson & BK Siesjö. 1984. Distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta neuropathologica*. 64: 177-191
- Auer RN, Kalimo H, Olsson Y & BK Siesjö. 1985. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta neuropathologica*. 67: 13-24.
- Auer RN. 2004. Hypoglycemic brain damage. *Metabolic brain disease*. 19: 169-175.
- Balduini W, S Carloni & G Buonocore. 2009. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury. *Autophagy*. 5: 221-223.
- Badiola N, C penas, A Miñano-Molina, B Barneda-Zahonero, R Fadó, G Sánchez-Opazo, JX Comella, J Sabirá, C Zhu, K Blomgren, C Casas & J Rodríguez-Alvarez. 2011. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell death and disease*. 149.
- Borsello T, K Croquelois, JP Hornung & PGH Clarke. 2003. N-methyl-D-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *European Journal of Neuroscience*. 18: 473-485.
- Carloni S, G Buonocore, W Balduini. 2008. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis*. 32:329-39.
- Cryer PE. 2007. Hypoglycemia, functional brain failure and brain death. *The journal of clinical investigation*. 117: 868-870.
- Giansanti V, A Torriglia & AI Scovassi. 2011. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". *Apoptosis*. 16:321-333
- Gill MB & JR Pérez-Polo. 2008. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochemical Research*. 33: 2379-89
- Ghavami S, RH Cunnington, B yeganeh, JLL Davies, SG Rattan, K Bathe, M Kavosh, MJ Los, DH Freed, T Klonisch, GN Pierce, AJ Halayko & IMC Dixon. 2012. Autophagy regulates trans fatty acid-mediated apoptosis in primary cardiac myofibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*. 1823(12):2274-86
- Gottron, FJ, HS Ying & DW Choi. 1997. Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Molecular and cellular neurosciences*. 9:159-69.

- Gozuacik D & A Kimchi. 2004. Autophagy as cell death and tumor supresor mechanism. *Oncogene*. 23: 2891-2906.
- Haces M, T Montiel & L Massieu. 2010. Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hipoglicemia. *Neuroscience*. 165: 28-38.
- He C & DJ Klionsky. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 43: 67-93
- Hernández-Fonseca K & L Massieu. 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research*. 82:196-205
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Beclinphosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*. 2, 330–335.
- Kosuge Y, T Imai, M kawaguchi, T Kihara, K Ishige & Y Ito. 2008. Subregion-specific vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Neurochemistry International*. 52: 1204-1211
- Koike M, M Shibata, M tadakoshi, K Gotoh, M Komatsu, S Waguri, N Kawahara, K Kuida, S Nagata, E Kominami, K Tanaka & Y Uchiyama. 2008. Inhibition of autophagy prevents hippocampal piramidal neuron death alter hypoxic-ischemic injury. *The american Journal of pathology*. 172: 454-469.
- Lee J. 2009. Autophagy in nuerodegeneration: two sides of the same coin. *Neurodegeneration*. *BMP reports*. 42: 324-30.
- López-Hernández FJ, MA Ortiz & Y Bayon. 2003. Z-FA-fmk inhibits effector caspases but not initiator caspases 8 and 10, and demonstrates that novel anticáncer retinoid-related molecules induce apoptosis via the intrínstico pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2: 255-263.
- Lum, J.J., Berardinis, R.J., and Thompson, C.B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6: 439–448.
- Malagelada C, X Xifró, A Miñano, J Sabriá & J Rodríguez-Alvarez. 2005. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiology of disease*. 20: 27-37.
- Meloni B, A Meade, D Kitikomolsuk & NW Knuckey. 2011. Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen–glucose deprivation) models. *Journal of neuroscience methods*. 195: 67-74
- Mizushima N, T Yoshimori & B Levine. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 140: 313-326.
- Mouw, G., Zechel, J.L., Gamboa, J., Lust, W.D., Selman, W.R., Ratcheson, R.A., 2003. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 14, 183–186.

- Ogata T, Nakamura Y, Tsuji K, Shibata T, Kataoka K. 1995. A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 20:737–743.
- Páramo B, K Hernández-Fonseca, AM Estrada-Sánchez, N Jiménez, A Hernández-Cruz & L Massieu. 2010. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*. 167: 1057-1069.
- Pérez-Carrión MD, FC Pérez-Martínez, S Merino, P Sánchez-Verdú, J Martínez-Hernández, R Luján & V Ceñas. 2012. Dendrite-mediated siRNA delivery knocks down Beclin 1 and potentiates NMDA-mediated toxicity in rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*. 120: 259-268.
- Qin AP, CF Liu, YY Qin, LZ Hong, M Xu, L Yang, J Liu, ZH Qin & HL Zhang. 2010. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy*. 6:738-753.
- Rami A & D Kögel. 2008. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra. *Autophagy*. 4: 422-426.
- Rami A, A Langhagen & S Steiger. 2008. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiology disease*. 29: 132-141.
- Ravikumar et al. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol rev*. 90: 1383-1435.
- Sadasivan S, Z Zhang, SF Larner, MC Liu, W Zheng, FH Kobeissy, RL Hayes & KW Wang. 2010. Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is accompanied by autophagy induction and late Honest autophagic cell death phenotype. *BMC Neuroscience*. 11:21.
- Sandberg M, SP Butcher & H Hagberg. 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulina-induced hypoglycemia: In vivo Dialysis of the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*. 47: 178-183.
- Sandberg M, Nystrom B, Hamberger A. 1985. Metabolically derived aspartate-elevated extracellular levels in vivo in iodoacetate poisoning. *J Neurosci Res* 13:489–495.
- Sautin, Y.Y. Lu, M. Gaugler, A. Zhang, L. Gluck, S.L. 2005. Phosphatidylinositol 3-kinasemediated effects of glucose on vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 575-589.
- Shacka JJ, Klocke BJ & KA Roth. 2006. Autophagy, Bafilomycin and Cell Death. *Autophagy*. 2: 228-230.
- Sims NR & H Muyderman. 2010. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1802: 80-91.

Siegel GJ, RW Albers, ST Brady & DL Price. 2006. Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. 7ed. Elsevier academic press.

Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neuroscience* 16:6125–6133.

Stoka V, V Turk & B Turk. 2007. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol Chem.* 388. 555-60

Suh S, K Aoyama, Y Che, P Garnier, Y Matsumori, E Gum, J Liu & RA Swanson. 2003. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *The Journal of neuroscience.* 23: 10681-90

Sutherland GR, RL Tyson & RN Auer. 2008. Truncation of Krebs cycle during hypoglycemic coma. *Medicinal chemistry.* 4:379-385

Sheng R, VQ Liu, LS Zhang, B Gao, R Han, YQ Wu, XY Zhang & ZH Qin. 2012. Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy.* 8: 310-325.

Szydłowska K & M Tymianski. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium.* 47: 122-129

Tanida I. 2011. Autophagy basics. *Microbiol immunol.* 55: 1-11.

Wang C, Nguyen HN, Maguire JL, Perry DC. 2002. Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22: 206–214.

Wang Y, R Han, ZQ Liang, JC Wu, XD Zhang, ZL Gu & ZH Qin. 2008. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy.* 4:214-226.

Wen YD, R Sheng, LS Zhang, R Han, X Zhang, XD Zhang, F Han, K Fukunaga & ZH Qin. 2008. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy.* 4: 762-769

Wieloch T. 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science.* 8: 681-683

Yamashima T, Y Kohda, K Tsuchiya, T Ueno, J Yamashita, T Yoshioka, E Kominami. 1998. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis. *Eur J Neurosci.* 10:1723-33.