



Universidad Nacional Autónoma de México
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA

**EFFECTO DE LA HIPOGLUCEMIA MODERADA RECURRENTE SOBRE LA MUERTE NEURONAL Y
EL DÉFICIT COGNITIVO INDUCIDO POR LA HIPOGLUCEMIA SEVERA IN VIVO.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORADO EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

NADYA GABRIELA LANGUREN RAMÍREZ

DIRECTORA:

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

DEPTO: NEUROLOGÍA MOLECULAR, INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

COMITÉ:

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

DEPTO: NEUROCIENCIA COGNITIVA, INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO

DEPTO: NEUROFISIOLÓGIA MOLECULAR, INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

DEPTO: NEUROQUÍMICA, INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

**DEPTO: MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

México Cd. Mx.

FEBRERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS:

Al Programa de Maestría y Doctorado en Psicología de la UNAM y al CONACYT, beca 363968 y proyecto CB239607 por el apoyo brindado para la realización de mi proyecto de doctorado.

Al Instituto de Fisiología Celular

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo por haberme recibido en su laboratorio y ser mi tutora del proyecto de doctorado.

A la Bióloga Teresa Montiel, por todas las enseñanzas y la ayuda brindada para la realización de los experimentos de mi proyecto.

A la Dra. Leticia Ramírez Lugo, quien fue una gran ayuda para realizar los experimentos conductuales, por todas las enseñanzas y apoyo brindado en la última etapa de mi proyecto.

A Gianfranco Chávez-Marchetta, por la ayuda brindada en los experimentos de water maze.

A Daniela Rodríguez, gracias por tu ayuda, las pláticas y por hacer más amenas las horas en el criostato al contarme tus historias de criminología.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia por su ayuda y paciencia en las sesiones de microscopía confocal.

A mi comité tutorial, el Dr. Federico Bermúdez-Rattoni y la Dra. Patricia de Gortari Gallardo, por ser una gran guía, por todas las sugerencias y recomendaciones para concluir mi proyecto de doctorado.

A la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt y la Dra Milagros Méndez Ubach, por ser parte de mi comité de evaluación en los exámenes de postulación y candidatura, por todas sus acertadas sugerencias, gracias por enriquecer mi proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi segunda casa durante tanto tiempo, por brindarme la oportunidad de ser parte de la mejor casa de estudios de México.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Psicología, al Lic. Oscar Iván Negrete, por toda la ayuda brindada para la realización de los trámites referentes al posgrado.

A CONACYT por el apoyo que me permitió dedicarme a la realización de mi proyecto de doctorado.

Dra. Lourdes Massieu Trigo, muchas gracias por todo Dra. por haberme recibido en su laboratorio y ser un gran ejemplo para mí, por mostrarme que el camino de la ciencia es arduo y difícil, pero que el trabajo, la dedicación y la constancia rinden frutos y brindan las mejores satisfacciones. Gracias por ser la guía de mi proyecto y por todas sus enseñanzas, por motivarme a aprender, por su confianza, comprensión, paciencia y el apoyo que siempre me mostró.

Tere Montiel, muchas gracias por todo Tere, por enseñarme que es mejor ir lento pero seguro, que ese lento que voy de prisa aplica para todo en la vida, gracias por ayudarme en la realización de mis experimentos, por apoyarme cuando mis ratitas se morían y yo me sentía triste, por recibirme en tu casa cuando nos teníamos que quedar hasta tarde a trabajar, muchas gracias por las comidas, los libros, los consejos y todas las enseñanzas.

Gracias a las dos por su trabajo tan loable, por formarnos con el ejemplo, por su disciplina, esfuerzo y amor a la ciencia, gracias por ser seres humanos tan admirables.

A Cecilia Escalona, muchas gracias Cecy, por mantener ordenado el laboratorio, por las pláticas, por el café y estar al pendiente de nosotros, por preguntarme siempre cuantos experimentos me faltaban y apoyarme al decirme que ya casi terminaba.

A mis ratitas, gracias porque mi proyecto no sería posible si no fuera por ustedes, porque es verdad que la investigación en animales también salva vidas.

Todo este largo camino en el doctorado no hubiera sido igual sin el apoyo de las personas que más amo en la vida, mi familia, muchas gracias por apoyarme incondicionalmente, por escucharme, aconsejarme o sólo abrazarme.

Gracias mamá por todo!!! Porque cada día de mi vida has estado al pendiente de mí, por desvelarte conmigo, por escucharme siempre, por tus consejos y apoyo incondicional, por estar conmigo siempre.

Gracias papá por escucharme siempre, por darme los mejores consejos para no rendirme, por tus oraciones por mí, por ser un gran papá, por darme todo cuanto pudiste, por siempre estar para mí.

A mis hermanos Gerardo y Octavio, gracias por todo, muchas gracias porque la vida a su lado es mejor, por escucharme y aconsejarme, por los momentos juntos, por cuidarme, por estar para mí en todo momento, los quiero infinitamente.

A Glovis y Marley!!! Por hacerme sonreír siempre.

A mi tía Carolina y a mi abuelita Dolores, muchas gracias a ustedes en especial, porque han estado a mi lado desde que nací, porque tengo la dicha de compartir con ustedes, gracias por estar para mí.

A mis tías Rosa, Araceli y a mi abuelito Daniel, gracias por siempre brindarme buenos momentos, gracias por todo.

En especial quiero agradecer a las personas tan valiosas que me ha regalado la vida, mis amigos, porque ustedes llegaron a mi vida y han hecho que el mundo sea aún más sorprendente.

A Dianela. Qué más te puedo decir que no sepas ya, agradezco infinitamente tu amistad, muchas gracias por tu apoyo incondicional, por escucharme y aconsejarme siempre, porque has sido parte de mi historia, por todos los momentos que hemos compartido, por las tardes de café y wineberry, las papas del jerónimas, los cafés en el centro, sin ti esta etapa hubiera sido tan diferente, gracias por impulsarme a seguir adelante, porque me has dado grandes lecciones de fortaleza y de vida. Gracias por todo, te quiero mucho amiga!!

A Lety, amiga, agradezco inmensamente tu amistad, porque siempre me has escuchado, dado consejos, por todos los momentos que hemos compartido, porque sin importar la hora estás para mí, gracias infinitas por todo, te quiero mucho amiga!!

A Miguel Ángel, por ver el mundo con los mismos ojos, por apoyarme, por hacerme sonreír, por la música que es parte de nuestra historia, gracias por todo.

A Aridahi y Mireya, muchas gracias por su amistad, por su ejemplo, por trabajar arduamente y siempre estar al pendiente de mí, porque aunque no hemos podido vernos tan seguido como quisiéramos el apoyo es incondicional, las quiero mucho niñas.

A Wendy, Nancy, Esme, Jesús, Abraham, Diana, Gaby, César y Abel, muchas gracias por su compañía, por todos los momentos que hemos pasado juntos, por compartir, por su constancia, su empatía, ejemplo y apoyo siempre, los quiero mucho!

A Selene, Carmen y Lucy!!!! Niñas, gracias por su amistad, porque las horas en el laboratorio fueron mejores a su lado, por las pláticas, los consejos, la hora de la comida, por los momentos de risa, y también por echarnos porras siempre para concluir nuestro camino en común, las quiero mucho!

A Susy, Cristian, Alberto Julio, Julio César, Marco, Juan Carlos, Eva y Nadia, por ser un gran equipo en el laboratorio, gracias por los seminarios, las reuniones, congresos, las celebraciones de cumpleaños, las reuniones de navidad, los momentos compartidos, por hacer que el laboratorio AL-302 sea un segundo hogar.

Organización de la tesis

La presente tesis está organizada de la siguiente manera:

I. Introducción comprende una revisión general sobre el metabolismo de glucosa en el cerebro, la regulación de la glucemia, las consecuencias de la hipoglucemia cerebral sobre la sobrevivencia neuronal, el daño oxidativo y la función cognitiva y su relación con la Diabetes Mellitus tipo 1.

Dentro de esta parte de la tesis se presenta el artículo de revisión:

Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. Neurochemistry International 63 (2013) 331-343

II. Planteamiento del problema y la hipótesis

III. Metodología. Incluye la descripción de la metodología empleada en todos los experimentos de esta tesis

IV Resultados

Esta parte comprende 2 secciones:

Sección 1 Consecuencias de la hipoglucemia moderada recurrente previa al coma hipoglucémico sobre la sobrevivencia neuronal, el daño oxidativo y la función cognitiva. Resultados publicados (artículo incluido en el Anexo 1)

Capítulo 2 Consecuencia de la hipoglucemia moderada recurrente previa a la hipoglucemia severa en ausencia de coma sobre la sobrevivencia neuronal y el daño oxidativo (resultados no publicados).

V. Discusión general de la tesis

VI. Anexo 1

Publicación de los resultados descritos en la Sección 1 de la tesis

Gabriela Languren, Teresa Montiel, Leticia Ramírez-Lugo, Israela Balderas, Gustavo Saánchez-Caávez, Francisco Sotres-Bayón, Federico Bermúdez-Rattoni and Lourdes Massieu. Recurrent moderate hypoglycemia exacerbates oxidative damage and neuronal death leading to cognitive dysfunction after the hypoglycemic coma. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (2017) DOI: 10.1177/0271678X17733640

ÍNDICE

I. Resumen	
II. Introducción.....	1
1. Metabolismo Energético cerebral.....	1
1.1 Transportadores de glucosa en el cerebro.....	1
1.2 Transportadores de sustratos energéticos alternos a la glucosa.....	3
1.3 Metabolismo de la glucosa	4
2. La hipoglucemia	6
2.1 Causas	6
2.2 Clasificación de la hipoglucemia.....	7
2.3 La hipoglucemia como principal complicación del tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 1: Epidemiología.....	9
2.4 Implicaciones clínicas de la hipoglucemia.....	10
2.5 Hipoglucemia nocturna	11
2.6 Respuesta contrareguladora a la hipoglucemia.....	11
2.6.1 Fallo autonómico asociado a la hipoglucemia e “hipoglucemia desapercibida”	13
2.7 Hipoglucemia severa	14
2.7.1 Vulnerabilidad neuronal selectiva en la hipoglucemia severa.....	14
2.7.2 Efecto de la hipoglucemia severa en el Funcionamiento cognitivo.....	15
3. Mecanismos implicados en la muerte neuronal inducida por hipoglucemia	16
3.1 Excitotoxicidad	17
3.2 Estrés oxidante en la hipoglucemia	19
3.3 Papel del sistema antioxidante durante la hipoglucemia y la reintroducción de glucosa.....	21
4. Efecto de la hipoglucemia moderada recurrente en el funcionamiento cognitivo.....	24

5. Adaptaciones metabólicas durante la hipoglucemia	27
5.1 Regulación de la expresión de transportadores de glucosa y de monocarboxilatos durante la hipoglucemia	27
5.2 Supercompensación de glucógeno durante la hipoglucemia.....	28
6. Tratamientos para el control de la hipoglucemia.....	30
III. Planteamiento del problema	31
IV. Objetivos.....	32
V. Hipótesis	32
VI. Diseño experimental	33
Sección 1	
1. Animales	33
2. Inducción de hipoglucemia moderada recurrente (HR).....	33
3. Inducción del coma hipoglucémico (HS).....	33
Inducción de hipoglucemia moderada recurrente previa a la hipoglucemia severa con coma (HR/HS).....	34
Sección 2	
Inducción de Hipoglucemia Severa sin coma (HSNC).....	34
Inducción de hipoglucemia moderada recurrente previa a la hipoglucemia severa sin coma (HR/HSNC).....	35
4. Análisis Histológico.....	35
4.1. Determinación de la muerte neuronal	35
4.2 Tinción de Fluorojade B (FJB) y Nissl	35
4.3 Tinción de TUNEL.....	36
5.0 Determinación de marcadores de daño oxidativo	36
5.1 Inmunohistoquímica para 4-2-hidroxinonenal (4-HNE) y nitrotirosinas (NT).....	36
5.2 Determinación de los niveles de lipoperoxidación (LPO).....	37

5.3 Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH).....	37
6. Determinación de los niveles de glucógeno	38
7. Pruebas Conductuales.....	38
7.1 Memoria espacial (Laberinto acuático de Morris).....	38
7.2 Memoria contextual (Condicionamiento al miedo).....	39
7.3 Actividad locomotora y ansiedad (Prueba de campo abierto).....	39
8. Análisis Estadístico.....	40
9. Artículo de revisión titulado: <i>Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. Neurochemistry International 63 (2013) 331-343</i>	
VII. Resultados.....	42
Sección 1.....	42
1. Niveles de glucosa sanguínea y registro de la actividad eléctrica cerebral (EEG) durante la hipoglucemia.....	42
2. La hipoglucemia moderada recurrente previa a la inducción del coma hipoglucémico exacerba la muerte neuronal.....	43
3. La hipoglucemia moderada recurrente previa a la inducción del coma hipoglucémico induce declinamiento cognitivo.....	49
4. La hipoglucemia moderada recurrente previa al coma hipoglucémico induce la presencia de daño oxidativo a lípidos y proteínas.....	52
5. La hipoglucemia moderada recurrente previa al coma hipoglucémico induce una supercompensación de los niveles de glucógeno cerebrales.....	55
Sección 2	
1. La hipoglucemia moderada recurrente previa a la inducción de la hipoglucemia severa en ausencia de coma reduce la muerte neuronal	56
2. La hipoglucemia moderada recurrente previa a la inducción de la hipoglucemia severa en ausencia de coma reduce el estrés oxidante	56

VIII. Discusión	58
IX. Conclusiones.....	64
X. Referencias	71
XI. Apéndice	72

Artículo Publicado: ***Gabriela Languren, Teresa Montiel, Leticia Ramírez-Lugo, Israela Balderas, Gustavo Saánchez-Chávez, Francisco Sotres-Bayón, Federico Bermúdez-Rattoni and Lourdes Massieu. Recurrent moderate hypoglycemia exacerbates oxidative damage and neuronal death leading to cognitive dysfunction after the hypoglycemic coma. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (2017) DOI: 10.1177/0271678X17733640***

RESUMEN

La consecuencia más común del tratamiento con insulina en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), es la presencia de episodios frecuentes de hipoglucemia moderada e incluso severa. La hipoglucemia moderada recurrente (HR) induce la falla de la respuesta hormonal reguladora de la concentración glucosa sanguínea, lo que aumenta el riesgo de que se presente hipoglucemia severa (HS) e incluso el coma hipoglucémico. El estado de coma se asocia con la muerte neuronal en regiones vulnerables del cerebro como la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado, el cual en parte está mediado por el estrés oxidante. Aunque la hipoglucemia moderada en sí no representa una amenaza inmediata para la vida de los pacientes, si es recurrente, puede conducir a varias secuelas clínicas, entre ellas el déficit cognitivo. Aún se desconocen muchos de los efectos de la HR y se han explorado muy poco los posibles efectos que ésta tiene sobre un periodo subsecuente de HS, ya sea acompañado ó no de coma hipoglucémico, sobre la función cognitiva, el estrés celular y la sobrevivencia neuronal. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar si la HR previa a la inducción de la HS en presencia ó ausencia de coma hipoglucémico, puede exacerbar el daño oxidativo en diferentes regiones del cerebro, y si esto se correlaciona con la vulnerabilidad a la muerte neuronal y la alteración de las funciones cognitivas.

Para esto se estableció un modelo de HR en ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron sometidas a 7 episodios de HR (55-40 mg/dl glucosa) seguidos de HS (< 35 mg/dl glucosa) acompañada ó no de un periodo de coma hipoglucémico de 7-10 min. Se evaluó el daño oxidativo monitoreando los niveles de glutatión reducido (GSH) y la presencia de células marcadas con 4-Hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y 3-Nitrotirosinas (3-NT) mediante inmunotinción. La muerte neuronal se evaluó usando las tinciones de FJB, Nissl, y el ensayo de Tunel. Las pruebas de laberinto acuático de Morris y de condicionamiento al miedo, fueron utilizadas para evaluar la función cognitiva. Los resultados indican que los animales sometidos a HR seguida del coma hipoglucémico, mostraron un aumento significativo en la presencia de células FJB (+) en la corteza parietal, el estriado y el hipocampo en relación con el grupo expuesto únicamente al coma, que correlacionó con la presencia de células positivas a Tunel, 4-HNE y 3-NT y con una importante disminución de los niveles de GSH en las 3 regiones. Además, los animales presentaron un mayor deterioro cognitivo en relación al observado en los animales expuestos únicamente al coma. Por otra parte, la administración del antioxidante N-Acetil cisteína (NAC) redujo la muerte neuronal y previno el déficit cognitivo.

En contraste con estos resultados, la HR previa a un episodio de HS sin coma, no indujo un mayor aumento en la muerte neuronal ni en los niveles de lipoperoxidación, ni una disminución mayor en los niveles de GSH, en relación a los animales sometidos únicamente a la HS en ausencia de coma. Estos datos sugirieron que la HR ejerce un efecto negativo sobre la HS sólo cuando se alcanza el estado coma, y que este efecto está mediado en parte por una disminución en la defensa antioxidante y daño oxidativo. En su conjunto, los datos sugieren que la regulación de la defensa antioxidante y de los niveles de estrés oxidativo, es determinante en la vulnerabilidad al daño cerebral y al deterioro cognitivo inducido por la HS, destacando la importancia de un control adecuado de los episodios de hipoglucemia moderada en los pacientes con DMT1.

ABSTRACT

The most common consequence of insulin therapy in Diabetes Mellitus Type 1 (DMT1) patients is the presence of moderate and even severe hypoglycemia. Recurrent moderate hypoglycemia (RH) induces a defective hormonal glucose regulatory response, which increases the risk of severe hypoglycemia (SH) and even the hypoglycemic coma. This is associated with neuronal death in vulnerable brain regions such as the cortex, the hippocampus and the striatum, and is mediated in part by oxidative stress. Although moderate hypoglycemia is not an immediate life threat for patients, if it is recurrent, it can lead to several clinical sequelae, such as cognitive dysfunction. The effects of moderate RH on cognitive function are not completely understood and its effect on the consequences of a subsequent period of SH, accompanied or not by the hypoglycemic coma, have been poorly explored. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether the induction of RH prior to an episode of SH either in the presence or the absence of coma, can exacerbate oxidative damage in different regions of the brain, and whether it correlates with a higher vulnerability to neuronal death and altered cognitive function.

With this purpose a model of RH was established in Wistar rats, which were exposed to 7 consecutive episodes of RH (55-40 mg / dl) prior to the induction of SH (< 35 mg / dl) in the presence or the absence of a 7-10 min period of coma. Oxidative damage was evaluated by the determination of the levels of reduced glutathione (GSH), as well as the presence of 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 3-Nitrotyrosine (NT) positive cells by immunostaining. Neuronal death was evaluated using Fluoro Jade B and Nissl staining as well as the TUNEL assay. Cognitive function was monitored using the Water Maze and the Fear Conditioning tests, both of which are sensitive to changes in spatial memory and context aversion, respectively. Results indicate that animals subjected to RH followed by the hypoglycemic coma, a significant increase in the number of damaged neurons in the parietal cortex, the striatum and the hippocampus was observed, relative to the animal group exposed to the hypoglycemic coma alone. These changes correlated with the presence of 4-HNE and 3-NT positive cells and a significant decrease in GSH. Furthermore, these animals showed a more severe cognitive impairment as compared to those exposed to the coma alone. In addition, the administration of the antioxidant N-Acetyl cysteine (NAC) reduced neuronal death and prevented cognitive deficit. In contrast to these results, RH previous to an episode of SH in the absence of coma, did not enhance neuronal death, lipoperoxidation or the reduction in GSH levels, as compared to animals exposed to SH alone. The present results suggest that RH exerts a negative effect upon SH only when is accompanied by a period of coma, and that this effect is mediated by depletion of the antioxidant defense and oxidative damage. In contrast, RH does not enhance brain injury when SH is not accompanied by coma. Altogether, these results suggest that the regulation of the antioxidant defense and the magnitude of oxidative stress, is crucial for brain vulnerability to hypoglycemic injury and cognitive decline, highlighting the importance of an adequate control of moderate hypoglycemic episodes in DMT1 patients.

ABREVIATURAS

3-NT: 3-Nitrotirosina
4-HNE: 4-2-hidroxinonenal
ACh: Acetilcolina
ATP: Adenosin trifosfato
BHB: Beta-hidroxi butirato
DCCT: Diabetes Control and Complications Trial
DMT1: Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2
EEG: Electroencefalograma
ERO: Especies Reactivas de Oxígeno
FIA: Factor Inductor de Apoptosis
GLUTs: Transportadores de Glucosa
GLUT1: Transportador de Glucosa 1
GLUT3: Transportador de Glucosa 3
GP: Glucógeno Fosforilasa
GPx: Glutación Peroxidasa
GR: Glutación Reductasa
GS: Glucógeno Sintasa
GSH: Glutación Reducido
GSP: Glucosa 6 Fosfato
GSSG: Glutación Oxidado
HC: Hormona de Crecimiento
HR: Hipoglucemia moderada recurrente
HR/HSNC: Hipoglucemia moderada recurrente seguida de HS sin coma
HS: Hipoglucemia Severa
HSNC: Hipoglucemia severa sin coma
HU: Hipoglucemia Unawareness
LPO: Lipoperoxidación
MDA: Malondialdehído
MnSOD: Manganeso Superóxido Dismutasa
NAC: N-acetil-cisteína
NADPH: Nicotidamina Dinucleótido Fosfato
NE: Norepinefrina
NMDA: N- metil-D-Aspartato
Nrf2: Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2)
OMS: Organización Mundial de la Salud
PARP1: Poli-1 (ADP-Ribosa)- polimerasa 1
SGLT: Sodium Glucose Transporters
SH: Grupos sulfridriolo
SNA: Sistema Nervioso Autónomo
SNC: Sistema Nervioso Central
SOD: Superóxido Dismutasa
TBARS: Tiobarbituric Acid Reactive Substances
TCA: Ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos

TMCs: Transportadores de Monocarboxilatos

INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo energético cerebral

El cerebro es un órgano altamente costoso en términos de energía, debido a que aunque sólo pesa el 2 % del peso corporal total, el requerimiento de energía para su funcionamiento, aún en estado de reposo es alto, consumiendo el 20 % del O_2 y el 25 % de la glucosa corporal total (Zigmond et al., 1999). La glucosa es el principal sustrato que provee de energía a las células, siendo un sustrato fundamental para el cerebro en desarrollo, y el sustrato energético más utilizado por el cerebro adulto. La glucosa es una molécula hidrofílica, la cual llega al Sistema Nervioso Central (SNC) a través de proteínas especializadas conocidas como Transportadores de Glucosa (GLUTs) localizados en la barrera hematoencefálica por medio de difusión facilitada. Al llegar al cerebro, la glucosa es metabolizada para la obtención de energía; ésta es oxidada hasta producir bióxido de carbono y agua a través de la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa, tal como ocurre en otros tipos celulares (Beltran et al., 2012). La mayor parte de energía consumida por el cerebro se utiliza en el mantenimiento del potencial de membrana, la comunicación neuronal, el reciclamiento de neurotransmisores, la señalización intracelular y el transporte dendrítico y axonal (Qutub & Hunt, 2005). El cerebro tiene un alto consumo de energía, de 21 μmol de ATP/g/min, mientras que el consumo de oxígeno (O_2) es de 49 ml O_2 /min, el cual es utilizado en el cerebro casi totalmente para la oxidación de carbohidratos (Clarke & Sokoloff, 1999).

1.1 Transportadores de glucosa en el cerebro

Los sustratos energéticos utilizados por el cerebro son tomados de la circulación sanguínea por los transportadores localizados en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La glucosa ingresa al SNC a través de transportadores localizados en la barrera hematoencefálica por difusión facilitada (Belanger et al., 2011; Vannucci & Vannucci, 2000). Además de la glucosa, otras hexosas requieren de proteínas transportadoras especializadas para ingresar a la mayoría de las células de los mamíferos. Se ha descrito una familia de 13 proteínas transportadoras formadas por

doce segmentos transmembranales, denominadas desde GLUT1 hasta GLUT 12 y un transportador de mioinositol (Vannucci et al., 2007).

Se han descrito dos principales proteínas transportadoras de glucosa; los transportadores dependientes de sodio y los transportadores facilitadores de glucosa. Las isoformas dependientes de sodio regulan el transporte de glucosa en contra de un gradiente de concentración y son los que se encuentran principalmente en el riñón, en el epitelio intestinal y otros órganos y son denominados SGLT (“Sodium Glucose Transporters”, por sus siglas en inglés), de los cuales se han descrito 6 isoformas. El flujo de sodio a través del gradiente electroquímico es la fuerza para mediar el transporte de glucosa, mientras que los transportadores facilitadores de glucosa, transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración. En el caso de las isoformas dependientes de sodio son localizadas en la periferia; sin embargo, aún no han sido descritos en el cerebro. Los transportadores facilitadores de glucosa han sido caracterizados tanto en la periferia como en el SNC (Duelli & Kuschinsky, 2001).

Existen dos principales transportadores de glucosa en el cerebro, el GLUT1 y el GLUT3, que son independientes de sodio. El GLUT 1 se localiza en la mayoría de las células de los mamíferos, principalmente en las células endoteliales y gliales. GLUT 1 existe en dos isoformas, ambas derivadas del mismo gen; una isoforma glucosilada de 55 kDa localizada en las membranas luminales y abluminales de las células endoteliales, y una isoforma no glucosilada de 45 kDa expresada en el pie terminal perivascular de los astrocitos adyacentes, en las neuronas y en la microglía. El GLUT 3 es un transportador de glucosa de alta afinidad y con una actividad catalítica alta, y se localiza casi exclusivamente en las neuronas (Vannucci et al. 2007).

Se ha descrito la presencia de otros transportadores de glucosa en el cerebro, como el GLUT 2, localizado principalmente en neuronas hipotalámicas, el GLUT4, el cual ha sido detectado en diferentes poblaciones neuronales del hipocampo, el cerebelo y el bulbo olfatorio y su localización corresponde a la de los receptores de insulina, sugiriendo que la recaptura de glucosa dependiente de insulina puede ocurrir en regiones cerebrales específicas (Tups et al., 2017). El GLUT4, también ha sido detectado en el músculo esquelético y el tejido adiposo bajo la influencia de insulina. Además del GLUT 5, localizado principalmente en microglía, los transportadores

GLUT 6 y GLUT 11, son incapaces de transportar glucosa debido a que su afinidad por la glucosa es más baja que la de la fructuosa (Duelli & Kuschinsky, 2001).

Otros transportadores de glucosa han sido descritos en órganos periféricos, como el transportador GLUT2 y GLUT 7, localizados en páncreas e hígado o el GLUT 9 localizado en el intestino; todos forman parte de los transportadores independientes de sodio (Simpson et al., 2007; Harati, 1996; Vannucci et al., 1997; Qutub & Hunt, 2005).

1.2 Transportadores de otros sustratos energéticos alternos a la glucosa

El cerebro requiere de un constante suministro de oxígeno y de sustratos que aporten energía. Hace 60 años, Keit and Sokoloff demostraron que la glucosa es el sustrato energético esencial para el cerebro; sin embargo, existen muchas condiciones en las que en ausencia de glucosa se utilizan otros sustratos energéticos tales como el lactato, el piruvato y los cuerpos cetónicos. Además de los GLUTs, en el cerebro existen Transportadores de Monocarboxilatos (TMCs) que se encuentran en las neuronas, astrocitos y microglía. La expresión de los TMCs varía a través de los diferentes órganos y tejidos (Pierre y Pellerin, 2009). En el SNC los principales TMCs son el TMC2, localizado en neuronas, además del TMC1 y TMC4 localizados en astrocitos (Carneiro & Pellerin et al., 2015).

Existen diversos estudios que demuestran la caracterización de TMCs en el cerebro y la periferia. Al igual que los transportadores de glucosa, la distribución de los transportadores correlaciona por la alta afinidad a los monocarboxilatos. La proteína MCT2 representa el principal transportador expresado en el cerebro. Ha sido ampliamente reportado en la corteza, el hipocampo y el cerebelo de roedores y se ha asociado a la alta utilización de lactato por las neuronas (Magistretti et al., 1999).

Existe amplia evidencia que muestra que el lactato es el sustrato energético más utilizado por las neuronas, aún en presencia de glucosa. Sin embargo, existen otros sustratos metabólicamente importantes como el piruvato, la valina y la isoleucina, que son necesarios en ciertas condiciones y juegan un papel importante en el metabolismo cerebral cuando no hay suficiente glucosa cerebral. Los cuerpos cetónicos; acetoacetato y β -hidroxibutirato, los cuales son producto del metabolismo de los ácidos grasos y se

consumen en ciertas condiciones, como el ayuno prolongado y el periodo de amamantamiento en los neonatos (Ames, 2000). Durante este periodo hay niveles elevados en el cerebro de las enzimas necesarias para la utilización de los cuerpos cetónicos como la D- β -hidroxibutirato dehidrogenasa y la aceto-acetil-succinil CoA transferasa, mientras que los niveles de las enzimas que participan en el metabolismo oxidativo de la glucosa son más bajos. Además, los niveles de densidad de los transportadores de los monocarboxilatos, incluyendo a los cuerpos cetónicos, son más altos en este periodo, en relación a los de glucosa (Nehlig & Pereira, 1993).

1.3 Metabolismo de la glucosa

La glucosa es el principal sustrato que provee de energía a las células, incluyendo a las células del cerebro. Actúa como un precursor versátil que da lugar a intermediarios metabólicos para diversas reacciones biosintéticas. Después de ser transportada a través de los GLUTs, al ingresar a la célula, la glucosa es fosforilada por la hexocinasa para producir glucosa 6-fosfato (G6P), la cual al igual que en otros órganos puede ser procesada a través de tres principales vías metabólicas: la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y la glucoénesis (en los astrocitos) (Belanger et al., 2011; Beltran et al., 2012). Ver figura 1.

La primera vía de obtención de energía es la glucólisis, en la cual a través de una serie de reacciones enzimáticas, una molécula de glucosa es convertida a 2 moléculas de piruvato y produce ATP (adenosin trifosfato) y NADH^{H^+} , al ingresar a la mitocondria donde es metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TAC) y la fosforilación oxidativa. El piruvato es descarboxilado para generar Acetil coenzima A por medio de la piruvato descarboxilasa. La Acetil Coenzima A entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y se une al oxaloacetato para producir citrato. A través de una serie de reacciones químicas, por cada grupo acetilo que entra al TAC como Acetil Coenzima A se generan 2 moléculas de CO_2 , una molécula de FADH_2 , 3 moléculas de NADH^{H^+} y un GTP (Guanosin Trifosfato), los cuales son transferidos a la cadena respiratoria para dar lugar a la oxidación completa de glucosa en la mitocondria, donde se producen grandes cantidades de energía en forma de ATP (Zigmond et al., 2009; Magistretti & Allaman, 2015).

La glucosa también puede ser oxidada a través de una vía alternativa, la vía de las pentosas fosfato, en la cual la oxidación de la glucosa provee monosacáridos de 5 carbonos para la síntesis de ácidos nucleicos y la producción de equivalentes reductores de NADPH, el cual es esencial para los procesos biosintéticos reductores y el mantenimiento del balance redox en las células, ya que el NADPH es el sustrato de la Glutación Reductasa (GR), enzima que genera al Glutación Reducido (GSH) a partir del Glutación Oxidado (GSSG), el cual es previamente producido por las reacciones catalizadas de la Glutación Peroxidasa (GPx). Por lo tanto, el NADPH^{H+} producido en esta vía es importante para la defensa en contra del estrés oxidante a través del metabolismo del tripéptido GSH, el cual es un donador de electrones en varias reacciones, incluyendo la desintoxicación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).

Finalmente, en los astrocitos, la G6P puede ser usada para almacenar unidades glucosiladas como glucógeno, un polímero de la glucosa que puede proveer de energía al organismo de manera directa. Se sintetiza a partir de la G6P y su síntesis está regulada por las enzimas glucógeno sintasa (GS) y la glucógeno fosforilasa (GP). Ambas son reguladas en direcciones opuestas por fosforilación. La glucogenólisis en los astrocitos lleva a la producción de lactato, el cual actúa como un sustrato energético para el metabolismo oxidativo en las neuronas activas (Beltran et al., 2012).

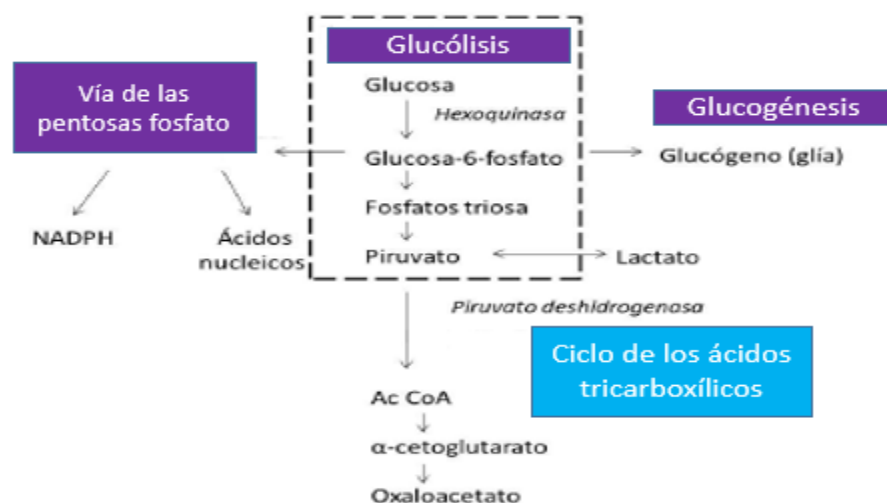


Figura 1. Vías metabólicas que sigue la glucosa para la obtención de energía. Adaptado de Mc Call et al., 2004.

2. La Hipoglucemia

2.1 Causas

A pesar de la capacidad del cerebro para utilizar otros sustratos energéticos, la glucosa es el principal sustrato utilizado en el metabolismo energético cerebral (Vannucci & Vannucci, 2000). Cuando los niveles de glucosa sanguínea se alteran, el metabolismo cerebral se ve afectado desencadenando una serie de respuestas de defensa a nivel fisiológico, bioquímico y conductual (Clarke & Sokoloff, 1994; Tesfaye & Seaquist, 2010).

Los niveles normales de glucosa sanguínea se encuentran en un rango de 70-110 mg/dl, los cuales se mantienen controlados por sistemas endocrinos eficientemente regulados. No obstante, existen diferentes causas por las cuales los niveles normales de glucosa pueden alterarse drásticamente, como la falla o desajuste de los mecanismos de regulación endocrino (como el cortisol), además de otros factores, como la presencia de un insulinoma, daño hepático y renal, malnutrición, ejercicio intenso, el uso de fármacos como la sulfonilurea o por el uso excesivo de hormonas como la insulina (Guettier & Gorden, 2006) utilizada en el tratamientos de pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) (Cryer et al., 2003; Tesfaye & Seaquist, 2010).

La hipoglucemia puede ocurrir por anormalidades en el metabolismo de la glucosa, las cuales son comunes en el periodo neonatal. Por otra parte, se han descrito mutaciones en los genes que regulan los mecanismos de liberación de insulina a nivel pancreático en el 50 % de los pacientes con hipoglucemia congénita, lo cual es esencial para mantener regulados los niveles de glucosa. La regulación eficiente de insulina depende de los canales de K_{ATP} de las células β , los cuales están conformados por 2 tipos de subunidades; Kirb.2 y SUR1. El gen ABCC8 codifica para el receptor de Sulfonilurea (SUR1), el cual actúa como una subunidad reguladora del canal, mientras que el gen KCNJ11, codifica para la subunidad Kirb.2, que forma el núcleo del canal. Ambos genes están localizados en el cromosoma 11p15.1. La mutación de estos genes altera el funcionamiento de los canales K_{ATP} al provocar el cierre permanente del canal, produciendo una despolarización continua de la célula β y la secreción no controlada de insulina (Rhaman et al., 2015).

Existen otras mutaciones en los genes GLUD 1, HADH, GCK, SLC16A1, HNF4A, HNF1A, UCP2; a estas alteraciones se les ha denominado metabopatías, y están relacionadas con la afectación de vías metabólicas cuyo producto final es la hipersecreción de insulina. Aunque la presencia de estas mutaciones no es tan frecuente, sí representan una de las principales causas de la presencia de hipoglucemia persistente (Güemes & Hussain, 2015).

2.2 Clasificación de la hipoglucemia

Una vez que los niveles de glucosa en sangre disminuyen a valores por debajo de los normales (menos de 70 mg/dl o 3.9 mmol/L) se produce un estado fisiológico conocido como hipoglucemia. El grado de hipoglucemia va a depender de la concentración sanguínea de glucosa; aunque en la literatura existe una amplia variedad de clasificaciones del grado de hipoglucemia, una de las clasificaciones ampliamente citadas es la de la DCCT (“Diabetes Control and Complications Trial”) por sus siglas en inglés.

De acuerdo a la DCCT, la severidad de la hipoglucemia es definida clínicamente de acuerdo a si los pacientes requieren de la ayuda externa para recuperar los niveles de glucosa normales además de los síntomas que se presentan (Cryer et al., 2003; Frier et al., 2014). Whipple en 1938 definió a la hipoglucemia patológica como una triada de eventos, los cuales incluyen la disminución de glucosa en plasma (< 40 mg/dl), síntomas hipoglucémicos y resolución de síntomas por la corrección de glucosa en sangre (Guettier & Gorden, 2006). Principalmente se han caracterizado 2 tipos de síntomas: autonómicos y neuroglucopénicos, los cuales pueden ser revertidos por la administración de glucosa. Los síntomas autonómicos (neurogénicos o simpatoadrenales) incluyen: sudoración fría, ansiedad, temblor fino, parestesias, sensación de debilidad, sensación de hambre y palpitaciones. Estos síntomas son esenciales para la percepción del estado hipoglucémico, pero después del tratamiento con insulina éstos no son reconocidos oportunamente por el paciente, por lo que no se corrige la hipoglucemia. Los síntomas neuroglucopénicos se relacionan con la privación de glucosa en el cerebro e incluyen: visión borrosa, fatiga o debilidad, sensación de mareo, confusión o reacción lenta, dificultad para hablar, sensación de somnolencia,

irritabilidad y trastornos de humor (Guettier & Gordon, 2006; Tesfaye & Seaquist, 2010).

Acorde a esto, la Asociación Americana de Diabetes ha sugerido la siguiente clasificación:

- 1) **Hipoglucemia Sintomática:** Los niveles de glucosa sanguínea disminuyen por debajo de los 70 mg/dl; se acompaña de la presencia de síntomas neurogénicos o simpatoadrenales derivados de la activación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) e incluyen a la sudoración, temblor, mareo, palpitaciones y hambre.
- 2) **Hipoglucemia Asintomática:** Los niveles de glucosa sanguínea disminuyen por debajo de los 70 mg/dl sin la presencia de síntomas neurogénicos.
- 3) **Hipoglucemia Moderada o Media:** Los pacientes no requieren de la asistencia externa para recuperar los niveles de glucosa, los niveles de glucosa sanguínea oscilan entre los 60-35 mg/dl.
- 4) **Hipoglucemia Moderada Recurrente:** Los pacientes presentan episodios de hipoglucemia en niveles moderados al menos 2 o 3 veces por semana.
- 5) **Hipoglucemia Severa:** Los niveles de glucosa sanguínea disminuyen por debajo de los 35 mg/dl; los pacientes requieren de la asistencia externa para recuperar los niveles de glucosa con la administración de glucosa exógena, carbohidratos o glucagón.

En estudios recientes se puede encontrar la siguiente clasificación: hipoglucemia leve (57.6-64.8 mg/dl), hipoglucemia moderada (mild hypoglycemia 41.4-64.8 mg/dl) e hipogluemia severa (< 36 mg/dl) (Jensen et al., 2013; Frier et al., 2014).

2.3 La hipoglucemia como principal complicación del tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 1: Epidemiología

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por la falla en la producción endógena de insulina, una hormona secretada de pequeños grupos de células β del páncreas, la cual estimula la recaptura de la glucosa en los diferentes órganos, disminuyendo sus niveles en sangre (Wrighten et al., 2009). Existen 2 tipos de diabetes; La Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), la cual es el resultado de la pérdida de células β pancreáticas que secretan insulina debido a un proceso autoinmune y suele ocurrir en etapas tempranas de la vida, mientras que la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) es caracterizada por una respuesta reducida a insulina (resistencia a insulina) aunada a la alteración de la función de las células β ; se desarrolla más en la etapa adulta y se ha relacionado con la presencia de trastornos metabólicos como la obesidad y el síndrome metabólico (Reagan et al., 2012). Como resultado, en ambos tipos de diabetes los niveles de glucosa en sangre aumentan (>120 mg/dl) dando lugar a la hiperglucemia. La administración de insulina es el tratamiento más utilizado para regular los niveles sanguíneos de glucosa en la DMT1 (Klein & Waxman, 2003; Wrighten et al., 2009), por lo que la hipoglucemia es la consecuencia inmediata adversa del tratamiento terapéutico con altas dosis de insulina en aproximadamente el 50% de los pacientes con DMT1. Sin embargo, la presencia de episodios de hipoglucemia en los pacientes con DMT2 ha incrementado de manera considerable debido al aumento del uso de fármacos análogos a la insulina en estos pacientes (Gold et al., 1995; Frier et al., 2014).

La incidencia de diabetes alrededor del mundo se ha convertido en un problema de salud grave. De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes, en la actualidad existen aproximadamente 422 millones de personas viviendo con diabetes, y se estima que este número incrementará a alrededor de 552 millones en 2020. La presencia de hipoglucemia se ha descrito principalmente en pacientes con DMT1. Sin embargo en los pacientes con DMT2, los cuales representan el 90 % de los casos de diabetes alrededor del mundo de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la utilización de análogos de insulina también ha producido un incremento en la presencia de los episodios de hipoglucemia. La incidencia promedio de hipoglucemia moderada en

pacientes con DMT1 es de 1-2 episodios por semana, mientras que en los pacientes con DMT2 es de 0.3-0.7 episodios por semana (Cryer, 2003). Se ha descrito que los episodios repetidos de hipoglucemia moderada se observan frecuentemente en el 70-80% de los pacientes con DMT1 y en el 40% de los pacientes con DMT2 debido a la terapia con insulina (Donnelly et al., 2005; Heller et al., 2004). La hipoglucemia moderada recurrente (HR) aumenta el riesgo de presentar hipoglucemia severa (HS), la cual tiene una incidencia del 36% y del 7% de los pacientes con DMT1 y DMT2, respectivamente (Blasetti et al., 2011; Frier et al., 2014; Languren et al., 2013). De acuerdo al DCCT, el cual es uno de los estudios prospectivos más citado, la incidencia de hipoglucemia severa es de 0.62 episodios por paciente al año en la DMT1, mientras que en la DMT2 la incidencia de hipoglucemia severa es menor, reportándose 0.07 episodios por paciente al año (Frier et al., 2014). Se estima que alrededor del 4 % de la tasa de mortalidad de pacientes diabéticos es debido a la presencia de hipoglucemia (Cryer et al., 2007), ya que en un 25 % de los eventos de hipoglucemia severa hay presencia de coma (Frier et al., 2014).

2.4 Implicaciones clínicas de la hipoglucemia

La hipoglucemia puede tener efectos adversos sobre la vida diaria de los pacientes, desde afectar las actividades diarias más cotidianas, hasta poner en riesgo la vida al sufrir algún accidente vehicular, caídas o fracturas; esto incide de manera negativa al afectar el estado anímico y emocional de los pacientes que son expuestos a las alteraciones de glucosa de manera frecuente. Se ha descrito que la hipoglucemia aumenta los niveles de ansiedad y produce déficits cognitivos importantes, entre los que se incluye la atención y la memoria. Cuando la duración de la diabetes va aumentando, los pacientes pueden sufrir de complicaciones a largo plazo, entre las que se incluye el fallo en la respuesta endocrina ante la disminución de glucosa, lo cual deriva en la hipoglucemia desapercibida (“hypoglycemia unawareness”, HU), que promueve un ciclo recurrente de episodios de hipoglucemia (Ver más adelante).

Durante la hipoglucemia ocurre la activación del SNA, como parte de los mecanismos de defensa que contrarrestan el estado hipoglucémico; la liberación frecuente de catecolaminas junto con la activación del sistema autónomo produce efectos hemodinámicos sobre el flujo sanguíneo regional, lo cual afecta de manera importante

al sistema cardiovascular (Frier et al., 2014; Martin-Timón et al., 2015). Además, los pacientes pueden tener un mayor riesgo de sufrir déficits neurológicos al padecer cambios funcionales y estructurales permanentes cuando la hipoglucemia se asocia con convulsiones ó cuando se alcanza el estado de coma hipoglucémico, dando lugar a complicaciones y secuelas neurológicas irreversibles (Jansen et al., 2013). Los cambios en la función cognitiva resultantes de la hipoglucemia severa en humanos se describen más adelante.

2.5 Hipoglucemia nocturna

La presencia de hipoglucemia puede ocurrir durante la noche y puede tener una duración de varias horas. Esto se debe a que los síntomas de la hipoglucemia no se perciben durante el sueño y el monitoreo de los niveles de glucosa durante la noche es poco frecuente. Se ha descrito que el 50 % de los episodios de hipoglucemia en los pacientes con DMT1 ocurren durante la noche en adultos tratados con insulina y en cerca del 80 % de niños. La frecuencia y el tiempo de duración de los episodios varían de acuerdo a los diferentes tratamientos de insulina (Frier et al., 2014).

2.6 Respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia

Ante la presencia de hipoglucemia el cerebro sensa la disminución de glucosa y activa mecanismos de defensa contrarreguladores. El umbral de glucosa sanguínea para la activación de estos mecanismos es aproximadamente de 67 mg/dl. La primera respuesta producida por el decremento de glucosa, es la supresión de la secreción endógena de insulina. Una vez que los niveles sanguíneos de glucosa se encuentran por debajo del rango fisiológico, inicia la secreción de hormonas contrarreguladoras que antagonizan la acción de la insulina; el glucagón y la epinefrina. El glucagón producido en las células pancreáticas α incrementa la concentración de glucosa en plasma al estimular la producción de glucosa hepática vía la glucogenólisis (degradación de glucógeno a glucosa) y la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de piruvato) de

manera transitoria; además se activa el SNA, el cual incrementa la secreción de norepinefrina y epinefrina de la médula adrenal, que actúan sobre receptores α y β adrenérgicos en múltiples órganos y mantienen un incremento más sostenido en la concentración de glucosa en plasma; además se limita la utilización de glucosa periférica. Ambos favorecen la oxidación de ácidos grasos y la degradación de proteínas para proporcionar sustratos para la gluconeogénesis (Lewitt & Baxter, 1991; Carrol et al., 2003). Cuando la disminución de glucosa se prolonga por más tiempo (después de 3 h aproximadamente) y se encuentra en un rango de aproximadamente 66 mg/dl, incrementa la secreción de hormona de crecimiento, mientras que el cortisol incrementa cuando los niveles de glucosa son cercanos a los 58 mg/dl. La hormona de crecimiento y el cortisol inducen cambios en los niveles de glucosa al estimular la lipólisis en el tejido adiposo, la cetogénesis y gluconeogénesis en el hígado. Si la defensa fisiológica no contrarresta la disminución de los niveles bajos de glucosa, se producen síntomas neurogénicos que incluyen sudoración, temblor, mareos y hambre, los cuales promueven la ingesta de alimento (Cryer, 2007; Beall et al., 2012), lo cual puede revertir el estado de hipoglucemia, (Ver Figura 2). Sin embargo, se ha descrito que la respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia se atenúa en un 40 % de los pacientes con DMT1, los cuales son incapaces de percibir los signos autonómicos de hipoglucemia (“hypoglycemia unawareness”) y esto aumenta el riesgo de padecer HS (6 veces en DMT1 y 17 veces en DMT2) (Frier et al., 2014; Tesfaye and Seaquist, 2010; Beall et al., 2012).

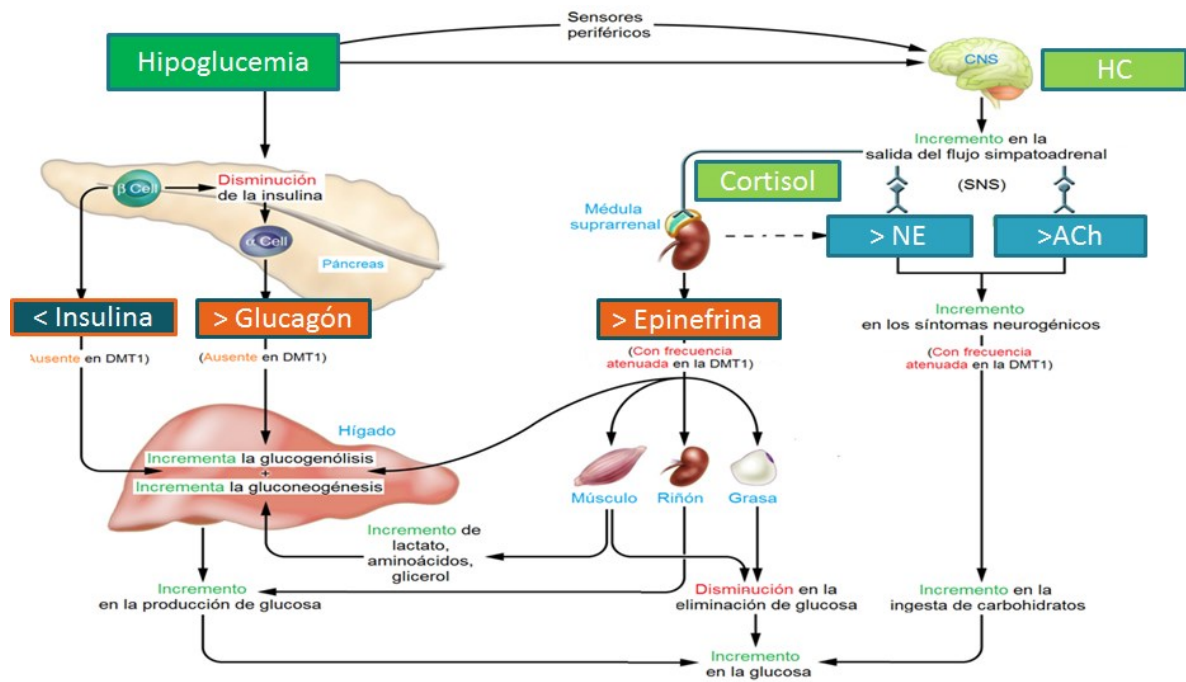


Figura 2. Respuesta contraregulatoria de glucosa. Mecanismos periféricos y centrales de la regulación de los niveles de glucosa durante la hipoglucemia. Ante la disminución de los niveles de glucosa, el páncreas disminuye la liberación de insulina y aumenta la liberación de glucagón para promover la glucogenólisis y gluconeogénesis en el hígado, aunado a la activación del sistema nervioso autónomo para incrementar la liberación de Epinefrina y Acetilcolina y se presentan los síntomas autonómicos, entre los que se incluye la sudoración, temblor y hambre, lo cual incrementa la ingesta de carbohidratos y la corrección del estado hipoglucémico. Adaptado de Cryer et al., 2006. NE: Norepinefrina, ACh: Acetilcolina, HC: Hormona de crecimiento.

2.6.1 Fallo autonómico asociado a la hipoglucemia e hipoglucemia desapercibida

La falla en la defensa endocrina puede ser producida por diferentes causas. Se ha descrito que un solo episodio de hipoglucemia previa (producido por ejercicio ó sueño) produce el síndrome de contraregulación deficiente de glucosa, reduciéndose la respuesta de epinefrina en la ausencia de respuestas de glucagón e insulina, y por ende la falla en el reconocimiento del estado hipoglucémico. Debido a la ausencia de los síntomas neurogénicos inducidos por la respuesta del SNA, los síntomas neuroglucopénicos resultantes de la privación de glucosa al cerebro se convierten en la primera advertencia del estado hipoglucémico, lo que aumenta el riesgo de hipoglucemia recurrente e incluso severa (Cryer et al; 2003; Cryer, 2006; Tesfaye & Seaquist, 2010). Se ha descrito que la hipoglucemia desapercibida se presenta en el 40 % de los pacientes con DMT1 y en menor frecuencia en los pacientes con DMT2 (Martín-Timón et al., 2015).

2.7 Hipoglucemia severa

La hipoglucemia severa (HS) se presenta cuando los niveles de glucosa sanguínea disminuyen de manera drástica por debajo de los 35 mg/dl y si no hay administración de glucosa exógena se puede conducir al estado de coma. Este se caracteriza por el cese en la actividad eléctrica cerebral, por lo que también se le conoce como periodo isoelectrico. Cuando la hipoglucemia severa no es tratada oportunamente y se presenta el coma hipoglucémico por un periodo de entre 30-60 min, éste puede derivar en déficits neurológicos permanentes e incluso en la muerte neuronal en regiones cerebrales vulnerables. La muerte neuronal después del coma, se ha relacionado con la presencia de estrés oxidativo (ver más adelante) y con déficits cognitivos tanto en humanos como en modelos animales (ver más adelante). Cuando las neuronas son sometidas a un estrés energético sostenido, como lo es la privación de glucosa, se activan diferentes mecanismos encargados de reestablecer la homeostasis celular como la respuesta antioxidante. Estudios previos han demostrado que en condiciones de hipoglucemia severa aún sin la presencia de coma, hay un incremento en los niveles de estrés oxidativo, así como una disminución significativa de los niveles de Glutación (GSH), el cual es el principal antioxidante en el cerebro (Dringen et al., 2002; Singh et al., 2004; Patockova et al., 2003; Rao et al., 2014).

2.7.1 Vulnerabilidad selectiva a la muerte neuronal por hipoglucemia severa

Diversos estudios experimentales han mostrado que la presencia de coma hipoglucémico da lugar a daño neuronal en áreas cerebrales como las capas 2 y 3 de corteza cerebral, el hipocampo, principalmente el subículo y el giro dentado (GD) y el estriado dorsolateral (Auer et al., 1984, Kalimo et al., 1985; Sandberg et al., 1986, Suh et al., 2003).

Auer (1984) demostró una correlación positiva entre la duración del periodo isoelectrico y la extensión del daño neuronal. De acuerdo con estos estudios y con investigaciones en humanos, la hipoglucemia severa produce daño neuronal en poblaciones neuronales específicas. Sin embargo, áreas como el tallo cerebral y el cerebelo son menos susceptibles al coma hipoglucémico, debido probablemente a una mayor eficiencia del transportador de glucosa cerebelar, generando resistencia al daño hipoglucémico (La Manna & Harik, 1985).

Auer observó que durante la HS (niveles de glucosa sanguíneos menores de los 35 mg/dl) la actividad eléctrica cerebral disminuye hasta observarse un aplanamiento en el registro electroencefalográfico (cese en la actividad eléctrica cerebral). Cuando éste permanece de 30-60 min se produce daño neuronal. En un registro electroencefalográfico, la actividad eléctrica cerebral normal se caracteriza por la presencia de ondas beta (13-25 Hz), después de la administración de insulina la actividad cerebral cambia a ondas α (8-13Hz), y cuando la severidad de la hipoglucemia aumenta (18-36 mg/dl, 1 mM de glucosa equivale a 18 mg/dl), incrementa la actividad de ondas theta (3.5-7.5Hz) y delta (1-3 Hz) hasta que comienza el periodo isoelectrico, caracterizado por el aplanamiento en el EEG; en este momento los niveles de glucosa se encuentran por debajo de 1 mM.

Estudios clínicos en paciente diabéticos y normales, son consistentes con los datos obtenidos en modelos animales de hipoglucemia, entre los cuales se ha descrito que la presencia de hipoglucemia severa afecta a las neuronas de la corteza cerebral, particularmente la corteza insular, el hipocampo y los ganglios basales. Fujioka y colaboradores, en 1997, investigaron los cambios en el cerebro de pacientes diabéticos que padecieron de hipoglucemia severa (<35 mg/dl) utilizando tomografía computarizada e imagen de resonancia magnética, y reportaron lesiones en la corteza insular, parieto-occipital y sustancia nigra. Estudios recientes han descrito que la presencia de hipoglucemia severa produce un incremento en la lesión de áreas cerebrales como la corteza temporal, parietal y occipital, hipocampo, putamen y núcleo caudado (Ma et al., 2009; Lee et al., 2010), lo cual ha generado interés en conocer las causas por la cuales hay una vulnerabilidad selectiva en el daño producido por la hipoglucemia (Suh et al., 2003; Suh et al., 2007).

2.7.2 Efecto de la hipoglucemia severa sobre el funcionamiento cognitivo

La presencia de HS produce un importante deterioro cognitivo y alteraciones neurológicas permanentes, la cual si no es revertida a tiempo puede derivar en la muerte del paciente. Las consecuencias de la hipoglucemia severa y aguda son bien conocidas. Tanto en estudios clínicos como en modelos animales se ha mostrado que la

hipoglucemia severa de manera repetida puede derivar en daño cerebral y deterioro cognitivo permanente. La presencia de HS en modelos animales con diabetes y animales sanos ha derivado en la presencia de muerte neuronal principalmente en la corteza cerebral y el hipocampo, lo cual se ha asociado con el deterioro de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje. Estudios realizados por Suh et al., (2003) mostraron que animales que fueron sometidos a HS con coma durante 45 min, presentan un declive significativo en la memoria espacial al ser evaluados 6 semanas después de la inducción de la HS, lo cual fue relacionado con la presencia de muerte neuronal en el hipocampo. Más adelante, Suh et al., (2005) corroboraron el déficit inducido por la HS en la prueba de memoria espacial realizada en el laberinto acuático de Morris. La administración de sustratos energéticos como el piruvato disminuyó el deterioro cognitivo, lo cual correlacionó con la disminución de la muerte neuronal es un 70%.

En concordancia con los datos descritos previamente, diversos estudios en humanos han demostrado que la HS induce un déficit importante en funciones cognitivas como la atención y la memoria. Para conocer más detalles sobre los estudios en humanos ver el inciso 3.3 de la revisión *Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. Neurochemistry International 63 (2013) 331-34* incluida al final de la introducción de esta tesis.

3. Mecanismos implicados en la muerte neuronal por hipoglucemia

Se han descrito algunos factores implicados en el daño neuronal hipoglucémico, entre ellos la excitotoxicidad inducida por la activación de receptores de glutamato, la liberación neuronal de zinc, la activación de la Poli-1(ADP-Ribosa)-polimerasa 1 (PARP1), el incremento intracelular de calcio, la activación de la NADPH oxidasa y el estrés oxidante (Auer et al., 1985; Suh et al., 2003; Suh et al., 2004; Suh et al., 2008; Haces et al. 2010). Ver Figura 3. Recientemente también estudios de nuestro laboratorio han sugerido que la acumulación de proteínas mal plegadas y la falla en la degradación autofágica contribuye a la muerte en neuronas en cultivo expuestas a la privación y la reintroducción de glucosa (García de la Cadena et al. 2014; Gerónimo-Olvera et al. 2017)

3.1 Excitotoxicidad

Experimentos previos han evaluado el papel de la excitotoxicidad en la muerte neuronal después el coma hipoglucémico. El término excitotoxicidad fue acuñado en 1969 por Onley y se refiere a la capacidad del glutamato para producir degeneración neuronal por la estimulación prolongada de sus receptores postsinápticos. Este mecanismo se ha observado en la muerte neuronal producida por hipoglucemia. Experimentos utilizando microdiálisis mostraron que los aminoácidos excitadores como glutamato y aspartato son liberados hacia el espacio extracelular desde que se inicia el periodo isoelectrico. Este incremento se debe en gran medida a que durante el estado hipoglucémico el piruvato que se genera en la glucólisis deja de proveer Acetil coenzima A hacia el TCA, por lo que a partir de reacciones de transaminación el glutamato es metabolizado a α -cetoglutarato para ser utilizado como sustrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, mientras que el oxaloacetato es metabolizados a aspartato por lo que hay una mayor liberación de aspartato al espacio extracelular que estimula los receptores a glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) , generándose excitotoxicidad (Sandberg et al. 1986). Wieloch et al., en 1985 mostraron que la administración de antagonistas de los receptores de tipo NMDA y no-NMDA, reduce la muerte neuronal hipoglucémica. Finalmente, un estudio realizado por Butcher y colaboradores en 1997 mostró que la ablación de las terminales glutamatérgicas corticoestriatales puede prevenir el daño neuronal inducido por la hipoglucemia en el estriado de manera significativa. Todos estos datos permitieron probar que la excitotoxicidad es un factor importante en la muerte hipoglucémica.

En la actualidad se han descrito diversos mecanismos que están implicados en la muerte neuronal hipoglucémica, ya que se ha mostrado en estudios *in vivo e in vitro* que después del estado hipoglucémico se produce muerte (Suh et al., 2007). Hay que recordar que la muerte no se produce durante el estado hipoglucémico a menos que este sea muy prolongado. Una de las principales consecuencias de la excitotoxicidad es el incremento en los niveles de calcio hacia el espacio intracelular, lo cual activa una serie de enzimas que dan lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como a la activación de enzimas proapoptóticas como las caspasas.

Investigaciones realizadas por Suh y colaboradores (2003), mostraron que después de la administración de glucosa, la cual es necesaria para revertir el estado hipoglucémico, hay una activación de la enzima PARP-1, la cual actúa como mediador de la muerte celular por excitotoxicidad y varios procesos inflamatorios al reparar el daño al DNA. PARP-1 utiliza al grupo ADP ribosa de NAD1 para formar polímeros de ADP ribosa, los cuales facilitan la reparación del DNA. Sin embargo su sobreactivación da lugar al daño en diferentes biomoléculas, como proteínas, lípidos y DNA. El mecanismo por el cual PARP-1 produce daño celular es debido a la depleción de energía y a que su activación señala la liberación del Factor inductor de apoptosis (FIA) de la mitocondria, dando lugar a la muerte celular programada independiente de caspasas. (Yu et al., 2002). Suh et al 2003 mostraron que al administrar inhibidores de PARP-1 durante la reintroducción de glucosa, se reduce significativamente la muerte neuronal. Más adelante mostraron que durante la reintroducción de glucosa ocurre la liberación de óxido nítrico, lo cual estimula la liberación de zinc desde las terminales nerviosas. El zinc se transloca a neuronas postsinápticas y produce la activación de la enzima NOX y PARP-1, dando lugar a la producción de ERO (Suh et al., 2007, 2008). Por otra parte, estudios in vitro realizados por Páramo et al. (2010) indican que la privación de glucosa en cultivos neuronales hipocámpales produce un aumento significativo en la producción de ERO, lo cual deriva en la activación de diversas enzimas como la NOX, la xantina oxidasa y la fosfolipasa A₂, las cuales contribuyen a la muerte neuronal. Recientemente Won y colaboradores (2012) mostraron que la respuesta inflamatoria es otro mecanismo importante que puede contribuir a la muerte neuronal, ya que aún 7 días después de la inducción de hipoglucemia se pudo observar la activación microglial en regiones como el hipocampo.

Durante el estado hipoglucémico, la producción de ATP se ve significativamente disminuida, lo cual sugiere que la mitocondria es un blanco importante que se ve afectado en esta condición. Durante la hipoglucemia ocurre la despolarización de la membrana mitocondrial y durante la reintroducción de glucosa se presenta la apertura del poro de transición mitocondrial, la liberación de citocromo c y la activación de caspasa 3 (Friberg et al., 1998; Ferrand-Drake et al., 2003). Todos los datos descritos previamente sugieren que la presencia de muerte neuronal subsecuente a la

hipoglucemia depende de múltiples factores que ocurren tanto en el estado hipoglucémico como durante la reintroducción de glucosa. Ver figura 3.

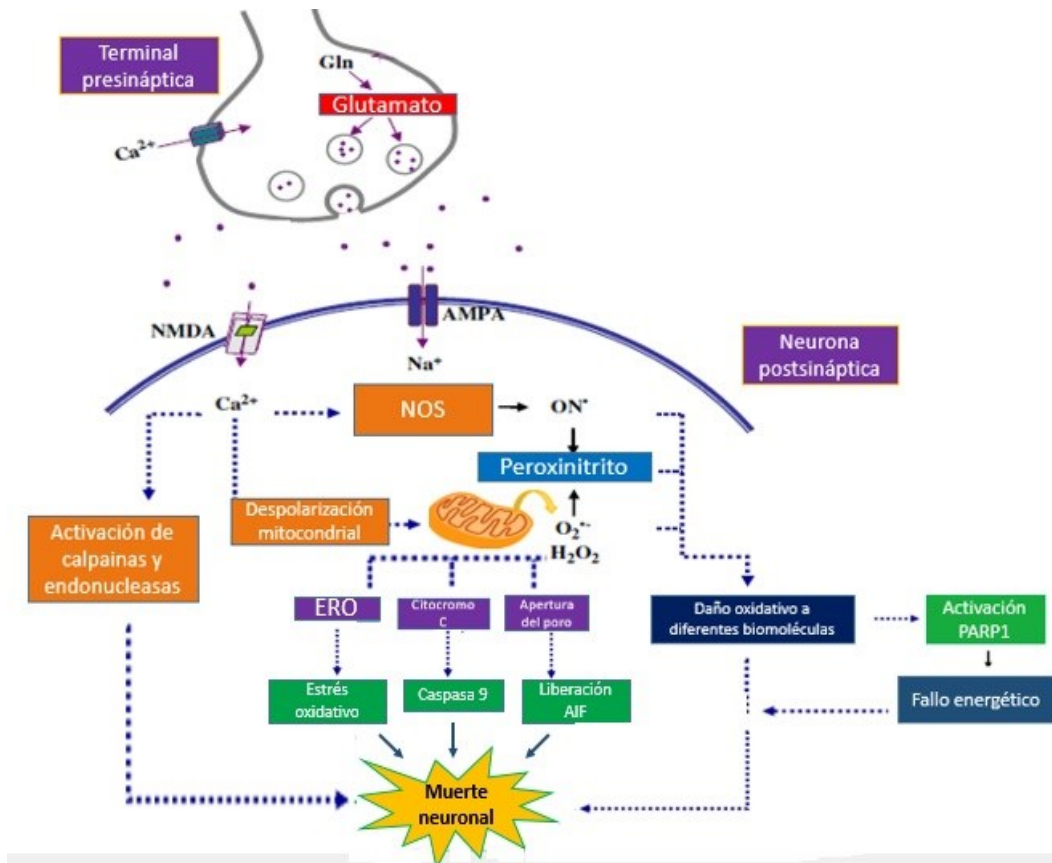


Figura 3. Factores implicados en la muerte neuronal por hipoglucemia. Adaptado de Estrada-Sánchez et al., 2009; Haces & Massieu, 2005.

3.2 Estrés oxidante en la hipoglucemia

Como se mencionó previamente, existe evidencia considerable que indica que el estrés oxidante ejerce un papel importante en el daño neuronal asociado con la hipoglucemia y otros desórdenes metabólicos. El estrés oxidante es definido como el desequilibrio entre los procesos bioquímicos que llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los procesos responsables de la remoción de las mismas, es decir la defensa antioxidante (Melov, 2002; Halliwell, 2006).

Las ERO pueden ser radicales de oxígeno que poseen electrones desapareados tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo, o no radicales como el peróxido de hidrógeno. La mitocondria es una de las principales fuentes de producción de ERO, donde una fracción significativa de oxígeno molecular no es completamente reducido y forma superóxido (Bondy & Lebel, 1993).

En condiciones normales, la producción de ERO es una consecuencia de muchos procesos celulares y su presencia excesiva es prevenida, por sistemas de defensa antioxidante endógenos, como el glutatión, el α - tocoferol (Vitamina E), los carotenoides, el ácido ascórbico, así como enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Choi et al., 2008). Sin embargo, cuando las ERO exceden la capacidad antioxidante se produce estrés oxidante conduciendo al daño a distintas biomoléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Debido en gran medida a que el SNC es altamente sensible al daño producido por los radicales libres y la defensa antioxidante es menor en comparación con otros tejidos (Halliwell., 2006), éste es muy vulnerable al daño oxidativo cuando se producen ERO.

Se ha detectado la presencia de estrés oxidante en el estado hipoglucémico (Bhardwaj et al., 1998; Patocková et al., 2003; Singh et al., 2004; Suh et al., 2007), pero no se ha explorado completamente, ni se han dilucidado los mecanismos responsables del daño oxidante en esta condición. En el 2003, Patocková et al. observaron que el malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos, incrementó de manera significativa en el cerebro del ratón después de un evento de hipoglucemia severa, lo cual indica la presencia de estrés oxidante. Suh et al. (2007) demostraron la presencia de superóxido en el hipocampo de ratas con hipoglucemia y sugirieron que la mayor producción de especies reactivas ocurre durante la reintroducción de glucosa después de un periodo de coma. Además proponen a la NADPH oxidasa como uno de los sistemas productores de especies reactivas más importantes. Por otra parte, Haces y colaboradores en el 2010 demostraron la presencia de daño oxidante a lípidos y proteínas durante la hipoglucemia, aún en ausencia de coma, en las regiones vulnerables al daño (corteza cerebral, hipocampo y estriado), más no en las menos vulnerables como el cerebelo. Más adelante Julio-Amilpas y colaboradores en 2015 mostraron que la hipoglucemia aguda y prolongada, aún en ausencia de coma cerebral, da lugar a la formación de ERO en las capas

intermedias de la corteza cerebral y en el hipocampo, al evaluarse 24 h después de la hipoglucemia severa, mientras que la muerte neuronal sólo se observa en capas superficiales de la corteza.

Además de los estudios pioneros que demostraron el efecto protector de los antagonistas del receptor NMDA contra el daño hipoglucémico (Wieloch, 1985), estudios más recientes han demostrado que la inhibición de la NADPH previene la muerte neuronal en el hipocampo de ratas hipoglucémicas y que los ratones deficientes en esta enzima son más resistentes al daño (Suh et al. 2007). Otros estudios han mostrado que la administración de sustratos energéticos que pueden sustituir a la glucosa, como el lactato y el piruvato, reducen el daño hipoglucémico (Suh et al., 2005; Zhou et al., 2012; Won et al., 2012). En un estudio previo en el laboratorio se encontró que el cuerpo cetónico beta-hidroxibutirato (BHB), es capaz de sustituir a la glucosa como fuente energética en condiciones de hipoglucemia química in vitro y de prevenir el daño oxidante a lípidos en animales hipoglucémicos (Haces et al. 2008). El BHB es capaz de transportarse desde la sangre al cerebro, cruzar la barrera hematoencefálica e incorporarse al TCA como acetyl coenzima A, produciendo ATP. Además de su efecto metabólico, Haces et al., (2008) mostraron que el BHB es capaz de reducir la presencia de ERO en neuronas cultivadas, posiblemente a través de su papel como atrapador de las mismas. En una investigación más reciente se observó que el BHB previene notablemente la presencia de neuronas en degeneración en la corteza cerebral de los animales hipoglucémicos y reduce la generación de ERO (Julio-Amilpas et al., 2015), sugiriendo que al mejorarse el estado energético celular se reduce la producción de ERO promoviendo la sobrevivencia neuronal.

3.3 Papel del sistema antioxidante durante la hipoglucemia y la reintroducción de glucosa

El estrés oxidante juega un papel importante en el daño cerebral inducido por una amplia variedad de desórdenes metabólicos y neurodegenerativos (Halliwell, 2006). En el SNC un extenso sistema de enzimas antioxidantes y componentes de bajo peso molecular ejercen un papel protector fundamental en contra del daño oxidativo. El principal sistema de defensa antioxidante es el del tripéptido glutatión (GSH), el cual

junto con el ascorbato y el α -tocoferol son los mayores sistemas antioxidantes de bajo peso molecular en el cerebro (Vatassery, 1998). El ascorbato y el GSH son solubles en agua, mientras que el α -tocoferol o vitamina E es soluble en lípidos. Tanto el ascorbato como el α tocoferol son transportados a través de la barrera hematoencefálica, mientras que el tripéptido GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es sintetizado localmente a partir de sus tres componentes, el glutamato, la cisteína y la glicina (Dringen et al., 2000).

El GSH es la principal molécula antioxidante en el SNC, al actuar como atrapador directo de las ERO y proteger a las células en contra del estrés oxidativo y el daño xenobiótico; además mantiene el estado celular redox de los grupos thiol, al prevenir la oxidación de los grupos sulfidrilo (SH) (Dringen, 2000). Se localiza principalmente en glia, en los astrocitos, donde el GSH es cortado por la enzima astrocítica γ -glutamil transpeptidasa (γ GT), mientras que la CySGly es cortada por la aminopeptidasa N para producir glicina y cisteína, los cuales son utilizados por las neuronas para producir su propio GSH.

El GSH tiene una concentración más elevada en regiones cerebrales anteriores como la corteza cerebral y el hipocampo. Su concentración en el fluido cerebroespinal es de 2-3 mM, y aún es baja en comparación con otros órganos, además de que se ha descrito una disminución de los niveles del antioxidante debido al envejecimiento (Limón-Pacheco et al., 2007). De acuerdo a Rice & Russo-Menna (1998), los niveles de GSH y de enzimas antioxidantes son más elevados durante el periodo postnatal y se ha observado un aumento en los niveles de GSH durante el desarrollo.

En condiciones donde ocurre estrés oxidante, como la hipoglucemia, se han observado cambios en los niveles de enzimas antioxidantes, incluidos el GSH. Rao et al. (2014) evaluaron el efecto de la hipoglucemia aguda sobre los niveles de ascorbato, α tocoferol y GSH, y mostró que los niveles de GSH disminuyeron de manera significativa tanto en animales neonatos como adultos, mientras la hipoglucemia no modificó los niveles de ascorbato y el α tocoferol en las mismas condiciones evaluadas.

Por otra parte se ha observado una disminución en los niveles de GSH durante la hipoxia-isquemia, una condición caracterizada por el fallo energético cerebral, excitotoxicidad y daño oxidativo, similar a la condición de hipoglucemia (Lyrer et al.,

1991). Esto explicaría porque los adultos son más vulnerables al daño producido por estrés oxidante, en comparación con los neonatos, quienes son más resistentes a los efectos adversos producidos por daño hipoglucémico (Yamada et al., 2004).

Cardoso et al. (2010, 2012) mostraron cambios en el balance oxidativo mitocondrial y la defensa antioxidante de la corteza cerebral y el hipocampo de animales diabéticos sometidos a hipoglucemia aguda y HR. En hipoglucemia aguda, Cardoso et al. (2010) mostraron cambios en los marcadores de estrés oxidante, específicamente un incremento en la lipoperoxidación y en la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), y la glutatión peroxidasa (GPx) en el hipocampo de animales diabéticos. Estos datos concuerdan con los resultados de experimentos previos en los que la inducción de hipoglucemia aguda produce un aumento en la producción de ERO, particularmente el aumento en la lipoperoxidación, y una disminución significativa en los niveles de GSH también en animales diabéticos (Singh et al., 2004). Sin embargo, el aumento en los niveles de lipoperoxidación también ha sido observado en animales sanos sometidos a hipoglucemia aguda (Patockova et al., 2003; Haces et al., 2010). Más adelante Cardoso et al. (2012) mostraron que la HR produce una disminución de la defensa antioxidante (GSH/GSSG), lo cual sugiere que el cerebro es vulnerable a la presencia de estrés oxidante inducido por hipoglucemia, aún sin la patología diabética.

Por otra parte, se ha observado que durante la hiperglucemia, condición asociada a la diabetes, ocurre un aumento de estrés oxidante en diferentes órganos, incluido el cerebro (Moneira et al., 2005; Nakhaee et al., 2010; Mc Growder et al. 2013). Consistente con estas observaciones, Bree et al. (2009), demostraron que el daño inducido por la hipoglucemia, se exacerba en animales diabéticos. Por otra parte, McNeilly y colaboradores (2016), observaron que en animales diabéticos sometidos a hipoglucemia recurrente, el aumento en la expresión de Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), un factor de transcripción sensible al estado redox, que desempeña un papel esencial en regular la respuesta antioxidante celular, es insuficiente para contrarrestar el daño oxidativo y el déficit cognitivo inducido por la HR. Estudios realizados por Choi et al., 2013 mostraron que la presencia de HR en animales diabéticos produce un aumento en los marcadores de daño oxidativo como el 4-2-hidroxinonenal (4-HNE), acompañado de una disminución en los niveles de GSH. Estos

datos sugieren que las consecuencias de la HR en el sistema antioxidante podrían ser agravadas en la condición diabética (Won et al., 2012; Mc Neilly et al., 2016).

En un trabajo más reciente realizado por Kho y colaboradores (2016) demostraron que la administración de la N-acetil-cisteína (NAC), la cual actúa como un potente antioxidante al ser un derivado de cisteína, revirtió la depleción de los niveles de GSH y redujo la presencia de muerte neuronal después de la hipoglucemia aguda. Estos datos sugieren que el NAC puede tener un efecto protector al restaurar los niveles de GSH y contribuir a disminuir los niveles de ERO que están implicados en la muerte celular (Reyes et al., 2016).

4. Hipoglucemia moderada recurrente (HR) y funcionamiento cognitivo

Estudios en humanos han mostrado que un solo episodio de hipoglucemia en niveles moderados puede conducir a la alteración de las funciones cognitivas como el aprendizaje, la atención y la memoria a corto plazo (Amiel., 1998; Strachan et al., 2001; McNay & Cotero, 2010). La HR es más común que la HS en los pacientes con DMT1, particularmente en niños y adolescentes, y aunque no es una amenaza inmediata para la vida de los pacientes, la presencia frecuente de episodios de HR puede tener implicaciones clínicas considerables, como el deterioro cognitivo permanente (Perantie et al., 2008; Franchini et al., 2016). Hasta el momento, los efectos de la HR son todavía controvertidos.

En un primer estudio en el 2004, McNay & Sherwin en 2004, mostraron que animales diabéticos (modelo de administración de estreptozotocina) sometidos a HR durante 3 días no tuvieron un deterioro significativo en la memoria espacial, e incluso observaron una mejoría en la ejecución de la tarea, acompañada de una recuperación de los niveles de glucosa en el fluido extracelular hipocampal. Los datos sugirieron que la hipoglucemia moderada incrementa el transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica, como una posible respuesta adaptativa a la hipoglucemia (ver más adelante), lo cual podría tener un efecto en las tareas de alta demanda cognitiva. Sin embargo, los animales evaluados bajo la condición de hipoglucemia aguda mostraron un menor desempeño en la ejecución de las tareas cognitivas. Esto podría deberse probablemente a un transporte deficiente de glucosa en la barrera hematoencefálica, produciendo un funcionamiento deficiente del hipocampo, además de otros mecanismos

como la supresión de los niveles de epinefrina durante la HR, la cual se ha relacionado con procesos de memoria (Williams & McGaugh, 1993).

En el 2006, McNay et al. estudiaron el efecto de la HR sobre funciones cognitivas como la memoria espacial en animales diabéticos y sanos utilizando un modelo de HR más crónico, con una duración de 11 meses, en el cual los episodios de hipoglucemia moderada se presentaban 1 vez a la semana. Los animales fueron evaluados en las tareas de memoria espacial 4, 8 y 12 meses después de concluir el protocolo de HR. Los resultados mostraron que bajo condiciones de euglicemia, a los 4 meses, los animales mostraron una mejora significativa en la tarea de memoria espacial en comparación con el grupo control, no obstante, en condiciones de hipoglucemia el desempeño en la tarea disminuyó significativamente. Al evaluar a los 8 y 12 meses, los animales con HR bajo condiciones de euglicemia, también mejoraron en la tarea de memoria con respecto a los controles, los cuales mostraron un declive en la tarea cognitiva en función de la edad. A los 8 y 12 meses los animales con HR también presentaron déficit en las tareas conductuales cuando se hicieron las pruebas en condiciones de hipoglucemia, pero no así en condiciones de euglicemia, en las que el desempeño incluso fue mejor.

Estos datos indican que la HR mejoró de manera significativa el desempeño en la tarea de memoria espacial dependiente de hipocampo, lo cual correlaciona con un incremento en los niveles de glucosa y lactato en hipocampo, sugiriendo una mayor captura de estos sustratos. Sin embargo en el estado hipoglucémico los animales se comportaron de manera deficiente.

Estos hallazgos sugieren que los déficits en tareas cognitivas relacionados con hipoglucemia han sido más evidentes en procesos cognitivos complejos, y los datos de los estudios en animales han sido consistentes con los estudios en humanos, tanto a nivel cognitivo como en procesos metabólicos, lo que sugiere que la HR puede preservar el funcionamiento cognitivo, al menos en un estado de euglicemia (McNay et al., 2010). Estos datos concuerdan con datos recientes de Osborne et al. (2016), quienes observaron una mejoría en la ejecución de tareas conductuales dependientes de hipocampo en animales no diabéticos, debido a un aumento en la señalización de glucocorticoides, los cuales están implicados en regular procesos hipocampales como el aprendizaje y la memoria. Después de la inducción de HR se observó un aumento en la

expresión de receptores de glucocorticoides, además de los receptores de tipo NMDA y no-NMDA, promoviendo una mejor ejecución de tareas de aprendizaje y memoria contextual, como parte de los mecanismos adaptativos inducidos por la HR.

En contraposición a los estudios descritos arriba, Yamada y colaboradores en el 2004 mostraron que animales neonatos no diabéticos, sometidos a HR, presentaron escasa muerte neuronal en las capas 2 y 3 de la corteza cerebral. Sin embargo observaron una alteración de la plasticidad sináptica al evaluar la potenciación a largo plazo (LTP), un mecanismo celular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria. Esto sugiere que a pesar de que la HR no dañó el hipocampo, si interfirió con la plasticidad sináptica, lo que sugiere que la HR puede afectar de manera importante los mecanismos celulares de la memoria en ausencia de muerte neuronal, y esto puede tener efecto a largo plazo en el desempeño cognitivo. Investigaciones recientes realizadas por Won et al. (2012) en un modelo de HR en ratas diabéticas y no diabéticas demostraron la presencia daño oxidativo en espinas dendríticas del hipocampo, aunque éste sólo fue observado en ratas diabéticas.

La presencia del daño dendrítico hipocampal en los animales diabéticos se relacionó con un desempeño cognitivo deficiente en tareas dependientes de memoria. En concordancia a los datos previos, Mc Neilly et al. (2016) mostraron que la HR produce un deterioro significativo en la memoria de reconocimiento de objetos únicamente en animales diabéticos.

Finalmente, se ha reportado que la HR también tiene efectos importantes sobre la conducta emocional y social. Moore y colaboradores en el 2010 investigaron el efecto de la HR sobre el daño neuronal y diversas tareas de interacción social y conducta emocional, mostrando que animales neonatos son sensibles a factores estresantes como la privación de glucosa favoreciendo la vulnerabilidad a la muerte neuronal en la corteza temporal y parasagital.

De acuerdo a las observaciones descritas anteriormente, todavía existe controversia acerca de los efectos de la HR sobre el funcionamiento cognitivo y el posible daño oxidativo en diferentes áreas cerebrales. Más aún, se desconoce cuál es el efecto de la HR sobre el daño neuronal y cognitivo inducido por un episodio subsecuente de

hipoglucemia severa. En el presente estudio hemos abordado esta pregunta en animales sanos, excluyendo la influencia de la patología diabética.

5. Adaptaciones metabólicas cerebrales ante la hipoglucemia

5.1 Regulación de la expresión de los transportadores de glucosa en el cerebro durante la hipoglucemia

Se ha propuesto que en condiciones de bajos niveles de energía como en la hipoglucemia, la expresión de los transportadores de glucosa puede ser regulada. Uno de los primeros estudios relacionado a la regulación de los transportadores de glucosa en la hipoglucemia fue realizado por McCall y colaboradores en 1986. Encontraron que durante la hiperglucemia la expresión de los transportadores de glucosa disminuye, por lo que evaluaron en si en una condición de hipoglucemia crónica hay un incremento en la abundancia de los transportadores de glucosa. Sus datos mostraron que la expresión del transportador de glucosa GLUT1 en la barrera aumentó significativamente durante la hipoglucemia crónica en ratas. Sin embargo, en una condición de hipoglucemia aguda no se observó el mismo efecto en el transportador de glucosa. Estos datos indican que los transportadores de glucosa de la barrera hematoencefálica son regulados durante alteraciones crónicas en los niveles de glucosa, lo que podría explicar que algunos pacientes son menos vulnerables a sufrir daño como consecuencia de la HR. Consistente con este estudio, Kumagai et al. en 1995, mostraron una regulación a la alta de la expresión del RNA mensajero del transportador GLUT1 después de inducir hipoglucemia durante 5 días. Más adelante, Uehara y colaboradores en 1997, reportaron un incremento significativo en la expresión de GLUT3 en el cerebro de ratas, después de la inducción de hipoglucemia durante 8 días. Sin embargo, los incrementos reportados en GLUT 1 y GLUT 3 en estos estudios fueron detectados en los vasos sanguíneos y no se reportaron cambios en los transportadores en las diferentes áreas del tejido cerebral. Duelli et al., 1999, indujo hipoglucemia durante una semana y examinó la densidad local de GLUT1 y GLUT 3 en el cerebro de la rata. Sus datos indicaron que la expresión de GLUT3 aumentó después de la inducción de la hipoglucemia. Observaron un ligero pero significativo incremento en GLUT3 y encontraron una correlación positiva entre la densidad de los transportadores de glucosa y la utilización

de glucosa cerebral determinada por el método cuantitativo de la 2-deoxiglucosa por autoradiografía. Lee y colaboradores (2000) mostraron un incremento significativo en la expresión de RNA mensajero de GLUT3 después de inducir hipoglucemia por 4 días. Sin embargo, en la inducción de hipoglucemia durante 8 días no encontraron efecto. No reportaron cambios significativos en la expresión de RNA mensajero de GLUT1 en el cerebro de la rata. Estos hallazgos apoyan que la hipoglucemia crónica puede inducir un incremento en el transporte de glucosa, lo cual sugiere un mecanismo adaptativo que compensa la disminución en la glucosa sanguínea. Aunque GLUT1 no cambió en comparación a las condiciones normoglucémicas parece que GLUT3, el cual media el transporte de glucosa en las neuronas, es esencial para el transporte de glucosa del torrente sanguíneo a las neuronas. Por lo tanto, una regulación hacia arriba de GLUT3 podría ejercer un efecto neuroprotector durante la hipoglucemia. En un estudio previo, Namagatsu y colaboradores (1993), reportaron un aumento significativo de 2 veces en el RNA mensajero del transportador GLUT3 en el cerebro del ratón, después de 3 días de privación de alimento durante 72 h. Sin embargo, no encontraron cambios en los niveles de proteína de GLUT 1 y de GLUT3 en comparación con las condiciones normoglucémicas. Las diferencias pueden deberse a que en este estudio se indujo un ayuno y no un estado hipoglucémico.

5. 2 Supercompensación de glucógeno en hipoglucemia

Aunque la glucosa es el principal sustrato energético que provee de energía al cerebro, éste también contiene glucógeno (Cataldo & Broadwell 1986), almacenado en forma de moléculas glucosiladas. El glucógeno es la forma primaria de almacenamiento de glucosa en el hígado y el músculo esquelético, donde su función es actuar como un depósito de energía; en el cerebro ejerce un papel similar, al mantenerse como un reservorio de energía cuando el uso de glucosa es limitado. Sin embargo, los niveles de glucógeno en el cerebro son mucho menores al del hígado ó el músculo. En condiciones donde el suministro de glucosa al cerebro está comprometido, el hígado degrada rápidamente glucógeno a glucosa, que es liberada a la circulación sanguínea para garantizar un suministro adecuado al cerebro (Frier & Fisher 2007).

Estudios recientes han determinado la distribución de glucógeno cerebral utilizando técnicas como la inmunohistoquímica y se ha localizado principalmente en astrocitos y en concentraciones más altas en regiones como el hipocampo, las capas superficiales de la corteza cerebral, el núcleo reticular talámico y en menor medida en el tálamo e hipotálamo (Oe et al., 2016). Debido a que se han monitoreado concentraciones relativamente bajas de glucógeno en roedores y humanos, esto indicaría que el glucógeno podría actuar como un sustrato energético de reserva en periodos muy limitados de tiempo (Oz et al., 2015). Se ha establecido que el contenido de glucógeno disminuye como resultado de la actividad neural (Swanson et al., 1992), lo que implica que áreas con alto contenido de glucógeno tienen correspondientemente altas exigencias metabólicas, que son al menos parcialmente cubiertas por el metabolismo del glucógeno (Rich & Brown, 2016).

Como se mencionó previamente, en condiciones en las cuales el aporte de glucosa al cerebro está afectado, hay ciertas adaptaciones cerebrales metabólicas que permiten al cerebro resistir el embate del fallo energético, entre ellas el aumento en la expresión de los transportadores de glucosa. Así es como en estudios recientes se ha demostrado que el glucógeno actúa como un suministro de energía inmediato en condiciones como la hipoglucemia. Choi y colaboradores en el 2003, mostraron que el glucógeno puede funcionar como un suministro de energía durante periodos prolongados cuando el suministro de glucosa es inadecuado. Este grupo describió que aún después de un periodo corto de hipoglucemia (2 h) desde niveles moderados hasta un nivel de glucosa cercano a cero, los niveles de glucógeno disminuyen al ser utilizados de manera inmediata como sustrato energético. Además, incluso después de restaurar los niveles de glucemia después de un solo episodio de hipoglucemia, los niveles de glucógeno aumentan incluso a niveles más altos que los fisiológicos en tejidos como el hígado, el músculo y el corazón. Este rebote o aumento en el contenido de glucógeno se ha denominado "supercompensación" y se ha reportado en otras condiciones en las que ocurre falla energética como después de un periodo de isquemia (Folbergrova et al., 1996), de hipoxia e incluso durante la privación de sueño (Kong et al., 2002). Estudios recientes han demostrado el efecto de supercompensación de glucógeno en el cerebro durante la hipoglucemia aguda, e incluso después de periodos repetidos de hipoglucemia, tanto en modelos animales (Canada et al., 2011; Herzog et al., 2008)

como en estudios con humanos, (Öz et al., en el 2009). Estos estudios muestran que la supercompensación de glucógeno después de la hipoglucemia moderada ó aguda en sujetos sanos, monitoreada por resonancia magnética nuclear, actúa como un mecanismo compensatorio, al igual que en los modelos animales. Se ha propuesto a la supercompensación del glucógeno como una respuesta metabólica compensatoria para prevenir el daño neuronal, así como un mecanismo implicado en el desarrollo de la falla en la respuesta autonómica contrareguladora de hipoglucemia y de la hipoglucemia desapercibida (Khowaja et al., 2015).

6. Tratamientos para el control de la hipoglucemia

La identificación de factores de riesgo para presentar hipoglucemia es un paso crucial para prevenirla. En pacientes con DMT1 es importante considerar la edad, la duración de la enfermedad, además de que el género puede contribuir al riesgo de hipoglucemia, debido a que en las mujeres la falla en la respuesta contrareguladora a la hipoglucemia es mediada por estrógeno (Sandoval et al. 2003).

Las estrategias para la prevención de la hipoglucemia incluyen el monitoreo constante de los niveles de glucosa además de la información y uso adecuado de los análogos de insulina, incluido el ajuste de dosis de acuerdo al consumo de carbohidratos y del ejercicio. En la actualidad han surgido nuevos tratamientos de mayor eficacia para el control adecuado de la glucemia, como las bombas de infusión de insulina, sensores continuos de glucosa e incluso el trasplante de células pancreáticas o el páncreas completo. Para conocer más detalles de estos tratamientos ver el inciso 5 y la Tabla 2 de la revisión *Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. Neurochemistry International 63 (2013) 331-34* incluida al final de la introducción de esta tesis.

Uno de los tratamientos mas recientes es el uso del sistema MiniMid 640 G-Smart Guard (640-SG), que consiste en infusión subcutánea continua de insulina con sensor de monitorización continua de glucosa intersticial implementado con la suspensión automática de acuerdo a la predicción de hipoglucemia. En un estudio reciente,

Villafuerte Quispe et al. (2017) mostraron la eficacia de este sistema para reducir el riesgo de episodios de hipoglucemia en pacientes pediátricos con DMT1.

Este tratamiento ha demostrado en estudios previos, un decremento en el número de episodios de hipoglucemia sin producir alteraciones en el control metabólico y sin aumentar la tasa de hiperglucemia (Choudhary et al., 2016). Estos datos sugieren que este sistema de infusión continua de glucosa es un tratamiento óptimo para disminuir la frecuencia de episodios de hipoglucemia y mejorar la calidad de vida de los pacientes con DMT1.

III. Planteamiento del problema

La DMT1 es una enfermedad de larga duración que comienza en edades tempranas, afectando principalmente a niños y adolescentes. A la fecha, el principal tratamiento para el control de la glucemia en pacientes con DMT1 es la administración de insulina, lo que trae como consecuencia la presencia de HR en la mayoría de los pacientes, poniéndolos en riesgo de presentar HS y pudiendo progresar al estado de coma. En estudios previos hemos desarrollado un modelo en el que la inducción de un periodo de coma hipoglucémico de corta duración (5-10 min) por la administración de insulina, induce estrés oxidante y muerte neuronal discreta principalmente en la corteza parietal y el estriado, pero no en el hipocampo. De aquí que en el presente estudio pretendemos conocer si la HR previa a un periodo de coma hipoglucémico de corta duración, puede exacerbar el daño neuronal en la corteza y el estriado e incluso producir muerte en el hipocampo, conduciendo al déficit cognitivo. Los resultados que corresponden a esta pregunta se describen en la Sección 1 de los resultados. Por otra parte, nos interesó investigar si la HR puede exacerbar el daño neuronal inducido por la HS, cuando ésta no progresa al estado de coma. Los resultados se presentan en la Sección 2 de la tesis.

En su conjunto, los resultados de este estudio nos ayudarán a estimar los efectos de una historia de hipoglucemia moderada repetida sobre el daño inducido por la hipoglucemia severa.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la presencia del estrés oxidante, muerte neuronal y déficit cognitivo en un modelo experimental in vivo de HR seguido de un episodio de HS en presencia ó ausencia de coma hipoglucémico.

Objetivos particulares:

Sección 1

Evaluar si la HR seguida de un episodio de coma hipoglucémico (HS) exagera:

- La presencia de estrés oxidante
- El daño oxidativo a proteínas
- La muerte neuronal
- El déficit cognitivo en tareas de memoria dependientes de hipocampo

Sección 2

Evaluar si la HR seguida de un episodio de HS en ausencia de coma (HSNC) exagera:

- El estrés oxidante
- La muerte neuronal

V. HIPÓTESIS

La HR exacerbará el daño oxidativo y la muerte neuronal inducida por la HS o coma hipoglucémico conduciendo al déficit cognitivo.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Sección 1

1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de entre 250-300 g. Los animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y fueron alojados en cajas estándar de acrílico, con alimento y agua ad libitum, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y temperatura (22-23°C) controlada. Los protocolos conductuales fueron realizados durante la fase de luz.

2. Inducción de la hipoglucemia moderada recurrente (HR)

Se indujo hipoglucemia moderada recurrente (HR) (n = 7) en animales no anestesiados sin ayunar que recibieron una inyección intraperitoneal (ip) diaria de 6.5 unidades de insulina (UI, Humulin 70/30, Eli Lilly, Indianápolis, E.U.) durante 7 días consecutivos, mientras que los animales del grupo control se inyectaron con una solución vehículo compuesta de 10 % de ácido acético y 90 % de agua vía i.p. La glucosa en sangre se midió a partir de la vena de la cola usando el medidor One Touch Ultra, cada 60 min después de la administración de insulina, y se mantuvo en un rango de 40-55 mg/ dl durante 2,5-3 h. Los animales recuperaron la euglucemia después del suministro de alimento y sin su administración de glucosa exógena. Veinticuatro horas después del último episodio de hipoglucemia, los animales fueron eutanizados bajo anestesia y los cerebros preparados para histología. Se utilizaron grupos independientes para la evaluación de las pruebas conductuales (Ver Figura 4).

3. Inducción de coma hipoglucémico

Una semana previa a la inducción de la hipoglucemia, los animales fueron implantados con electrodos epidurales bajo anestesia con isoflurano al 3% para monitorear la actividad eléctrica cerebral a través de un registro electroencefalográfico (EEG) de dos canales (hemisferios derecho e izquierdo). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1) **Hipoglucemia severa (HS)** (n = 7): los animales recibieron una inyección ip de 32 UI (Humulin 70/30, Eli Lilly, Indianapolis, E.U) y después de 2-3 h de HS (niveles de glucosa < 1.0 mM o 18 mg/dl) presentaron la pérdida de reflejo de enderezamiento y se permitió que la hipoglucemia progresara hasta la isoelectricidad (coma) durante 7-10 minutos, confirmada por la ausencia de actividad eléctrica cerebral monitoreada en el EEG. Los animales fueron rescatados inmediatamente después con la administración de un bolo ip. de glucosa al 25%, seguido de una perfusión intravenosa continua de glucosa al 25% en Buffer Krebs-Henseleit a una velocidad de 1.5 ml / h durante 3 h a través de la vena de la cola utilizando una bomba de perfusión (Harvard Apparatus 22, South Natick , MA, EE.UU.)

2) **Hipoglucemia moderada recurrente seguida de coma hipoglucémico (HR/ HS)** (n = 7): Los animales se trataron con HR en niveles moderados durante 7 días y 24 h después del último episodio se indujo la HS y se dejó progresar al coma durante 7-10 min y los animales fueron rescatados como se describió previamente. Todos los protocolos experimentales se describen en la Figura 4.

3) **HR/HS/NAC.** Los animales tuvieron el mismo protocolo del grupo HR/HS previamente descrito, excepto que recibieron una administración subcutánea diaria de 100 mg/kg de N-Acetil Cisteína (NAC). (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA). La dosis de NAC utilizada fue elegida en base a una curva dosis-respuesta y fue disuelta en agua destilada 1 h después de que se inició la reperfusión de glucosa; posteriormente se realizaron 4 administraciones consecutivas (5 administraciones en total).

Se utilizaron grupos independientes para las pruebas de comportamiento. Los animales que presentaron convulsiones fueron excluidos del estudio.

Sección 2

Inducción de hipoglucemia sin coma (HSNC)

Se utilizaron dos grupos independientes de animales para ser evaluados 24 h después de la administración de insulina sin llegar a presentar coma.

1) Hipoglucemia severa sin coma (HSNC). Los animales fueron implantados con electrodos epidurales. Se inició el registro del EEG 20 minutos antes de la administración i.p. de 32 unidades de insulina para disminuir los niveles sanguíneos de glucosa a 20 mg/dl por 3 h sin llegar al coma hipoglucémico. Cuando los animales presentaron la pérdida del reflejo de enderezamiento (RR), que antecede el estado de coma, se les administró inmediatamente un bolo de glucosa al 25 % y 10 min después se inició la reperfusión de glucosa al 25 % (1.5 ml/h) por la vena de la cola.

2) Hipoglucemia moderada recurrente seguida de hipoglucemia severa sin coma (HR/HSNC). Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 6.5 Unidades de insulina, para disminuir los niveles sanguíneos de glucosa a 30-55 mg/dl durante 3 h durante 7 días consecutivos. Al siguiente día, se indujo el protocolo de HS previamente descrito sin llegar al coma hipoglucémico.

Al finalizar la reperfusión de glucosa en ambos grupos, los animales fueron alojados en su caja hogar con agua y alimento y se sacrificaron 24 h después del inicio del ensayo experimental.

4. Análisis Histológico: Evaluación de muerte neuronal

Veinticuatro h después de todos los tratamientos experimentales los animales fueron anestesiados, eutanizados utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron intracardiamente con una solución salina al 0.9% seguida de paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros y se transfirieron a un gradiente de sacarosa del 20-30% (24 y 72 h, respectivamente) y se obtuvieron cortes coronales de 25 μ m.

4.1 Tinción con Fluoro Jade B y Nissl

La muerte neuronal se evaluó 24 h, 5 días y 15 días después de los diferentes protocolos experimentales utilizando Fluoro Jade B (FJB), un marcador fluorescente de alta afinidad para la identificación de neuronas dañadas, como se describió previamente (Julio- Amilpas et al., 2015). Las secciones se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM1000 usando un filtro FITC (395-590 nm). El número total de células FJB-positivas presentes en la corteza parietal y el estriado se cuantificó en 18 cortes coronales de 25 μ m

(de 3.20 a -4.20 de bregma). Se utilizaron 4 secciones para la cuantificación de daño en el hipocampo utilizando el programa Image J. En este caso las células se contaron en un área de 200 mm² de las distintas regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD e hilus). Los datos se expresaron como el número total de neuronas en degeneración en estas 4 secciones. El daño celular fue confirmado por la presencia de células picnóticas después de la tinción de Nissl en las secciones adyacentes. Las secciones se examinaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon H550S.

4.2 Tinción de Túnel

Para la determinación de TUNEL, se utilizó el kit de detección de muerte celular Roche In situ (POD, Roche Applied Science, EE.UU.). Brevemente, las secciones adyacentes a las teñidas con FJB y Nissl se bloquearon con peróxido al 3% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las láminas se incubaron en una mezcla que contenía citrato de sodio 0.1% / triton al 0.1% durante 10 minutos seguido de una mezcla de reacción TUNEL (5 µl de enzima TdT, 5 µl de Biotin-dUTP, 90 µl de tampón TdT) durante 90 minutos a 37°C. Las láminas se lavaron y se contratiñeron con Hoechst durante 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar la identificación de células positivas a TUNEL. Las muestras fueron analizadas bajo microscopio de fluorescencia utilizando una excitación con longitud de onda de un rango de 450- 500 nm y detección en un rango de 515- 565 nm (verde).

5. Determinación de marcadores de daño oxidativo

5.1 Inmunohistoquímica para 4-2-Hidroxinonal y 3-Nitrotirosinas

Veinticuatro horas después de los tratamientos se detectó la modificación de las proteína oxidadas utilizando el anticuerpo policlonal para 4-2-hidroxi-2-nonal (4-HNE) (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, EE.UU.) y monoclonal anti-3-nitrotirosinas (NT) Cayman Company, Ann Arbor Michigan, EE.UU.). Los cortes coronales de 25 µm se incubaron con anticuerpos anti-4-HNE o 3-NT (dilución 1: 200) durante 72 h a 4 °C y con los anticuerpos secundarios DyLight 594 o DyLight 488 (Jackson ImmunoResearch Lab., Pennsylvania, EE.UU., dilución 1: 250), durante 2 h a

temperatura ambiente. Se examinaron tres secciones por animal y se obtuvieron imágenes representativas mediante microscopía confocal (Leica TCS SP5).

5.2 Lipoperoxidación de lípidos (LPO)

Se evaluó la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (“TBARS”, por sus siglas en inglés), las cuales son productos derivados de la peroxidación de lípidos. El análisis de TBARS fue basado en el método de Gluck et al, 2000. Brevemente, al concluir el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se disectaron la corteza frontal, la corteza parietal, el hipocampo y el estriado. Los tejidos fueron homogenizados en una solución que consistió de 0.5 ml con 1.15 % de KCl 0.04 mM e incubados a 37° C durante 15 min. Después se añadió ácido tricloroacético al 20 % y las muestras fueron centrifugadas a 14, 000 g durante 10 min. Se obtuvieron los sobrenadantes y se añadió un volumen equivalente de ácido tiobarbitúrico (75 %) y las muestras fueron incubadas durante 20 min a 50 °C. Los niveles de TBARS fueron calculados utilizando una curva estándar de Malondialdehído (MDA). La concentración de proteína se calculó con el método de Lowry, utilizando albumina como estándar. Los datos fueron expresados como nmoles de MDA/mg de proteína.

5.3 Determinación de GSH

Una vez terminado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se disectaron las cortezas frontal y parietal, el hipocampo y el estriado. Los tejidos fueron extraídos y homogenizados en un buffer de HCL 40 mM, tricloroacético al 10% y ácido diatril triamino penta acético (DTPA) 5mM. Se puso un volumen equivalente del buffer descrito previamente más ácido ascórbico 20 mM. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas rápidamente a 20,000 rpm durante 20 minutos. Para la determinación de GSH, se añadieron 5% de ácido tricloroacético, N-etilmaleimida 7.5 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y 100 µl de o-Ftalaldehido (OPT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), utilizado como agente derivatizante para reaccionar con GSH.

Después de mezclar las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La fluorescencia se leyó a 365 nm de excitación y 430 nm de emisión. Las concentraciones de GSH se calcularon como nmol / mg de tejido basado en una curva estándar. Las concentraciones de GSH se expresan como nmol de GSH / mg de tejido.

6. Determinación de los niveles de glucógeno

La corteza parietal, el hipocampo y el estriado fueron disectados e inmediatamente homogenizados en NaOH 100 mM frío y las muestras fueron procesadas como se describe en Sánchez-Chávez et al., (2008), 24 h después de los tratamientos (n = 3-7). Los homogenizados se calentaron a 80 ° C para destruir la glucosa endógena y la glucosa-6-fosfato. Se añadió etanol fresco (70% (v / v)) para precipitar glucógeno, liofilizado y el sedimento fue resuspendido en acetato de sodio 50 mM. Se añadió amiloglicosidasa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) para hidrolizar el glucógeno y la concentración de glucosa resultante se calculó usando una curva estándar. Los niveles de glucógeno se expresaron como nmol de residuos glucosilados/ mg de proteína.

7. Pruebas conductuales

7.1 Memoria Espacial (Laberinto acuático de Morris)

Cuarenta y ocho horas después de los tratamientos, los animales (n = 7 por grupo) fueron entrenados durante 5 días (5 ensayos por día) en una piscina circular dividida en 4 cuadrantes donde una plataforma estaba oculta 1 cm por debajo del agua a temperatura constante como se describe en Delint-Ramírez et al. (2008). Veinticuatro horas después del último día de entrenamiento (7 días y 15 días después de los tratamientos) se realizó la prueba de memoria. Se retiró la plataforma y se permitió a los animales nadar durante 60 s.

Para obtener las medidas de latencia para localizar la plataforma, el número de cruces y el tiempo de estancia en el cuadrante blanco, se utilizó el software Ethovision.

7.2 Memoria contextual (Condicionamiento al miedo)

Cuarenta y ocho horas después de los tratamientos grupos diferentes de animales ($n = 7$ por grupo) fueron evaluados en la prueba de condicionamiento al miedo. Se utilizaron cuatro cámaras de condicionamiento estándar (Coulbourn Instruments) situadas dentro de cubículos de atenuación acústica (Med Associates) en una sala de prueba aislada. El piso de las cámaras consistía en barras de acero inoxidable que liberaban un choque eléctrico. Entre cada uno de los ensayos, las rejillas de choque y las bandejas de piso se limpiaron con jabón y agua, y las paredes se limpiaron con toallas de papel húmedas como se describe en Sotres-Bayon et al. (2012). El día 1, los animales fueron habituados durante 5 minutos a la cámara de condicionamiento, enseguida inició la fase de adquisición o condicionamiento, que consistió en la liberación de cinco choques con una intensidad de 0.8 mA y una duración de 2 s. Hubo un intervalo de tiempo promedio de 2 min entre cada choque. 24 h después los animales fueron evaluados en la prueba de condicionamiento al miedo durante 10 minutos. La conducta se monitoreó con cámaras de video digitales. El porcentaje de “freezing” (congelamiento) fue utilizado como medida de miedo condicionado. El “freezing” se definió como la ausencia de todo movimiento, excepto para aquellos relacionados con la respiración.

7.3 Actividad locomotora y ansiedad (Prueba de Campo Abierto)

Al finalizar la prueba de condicionamiento al miedo, los animales fueron colocados en el centro de una arena abierta de madera (90 cm de largo x 90 cm de ancho x 60 cm de altura) con un piso texturizado iluminado por 22 lux de intensidad. Una cuadrícula dibujada en el suelo con extensión de área (30x 30 cm) dividió la arena en una región central de 30 x 30 cm y un área periférica de 60 x 60 cm. La conducta se monitoreó durante 10 minutos con una cámara de video digital y se analizó con un software de video (ANY-maze). La distancia total recorrida (cm) se considera como un indicador de la actividad locomotora y el número de entradas al centro del campo abierto como índice de ansiedad.

8. Análisis Estadístico

Todos los datos fueron expresados como media \pm error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Fisher, excepto para la comparación del daño neuronal entre los grupos tratados con y sin NAC, los cuales fueron evaluados con una Prueba T de Student.

La prueba de condicionamiento al miedo se analizó con un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. La curva de aprendizaje de la prueba de memoria espacial se analizó con un ANOVA de medidas repetidas, mientras que el número de cruces fue analizado mediante la prueba No paramétrica de Kruskal-Wallis. Niveles de $p < 0.05$ y $p < 0.0001$ fueron considerados como significativamente diferentes.

Diseño Experimental Sección 1

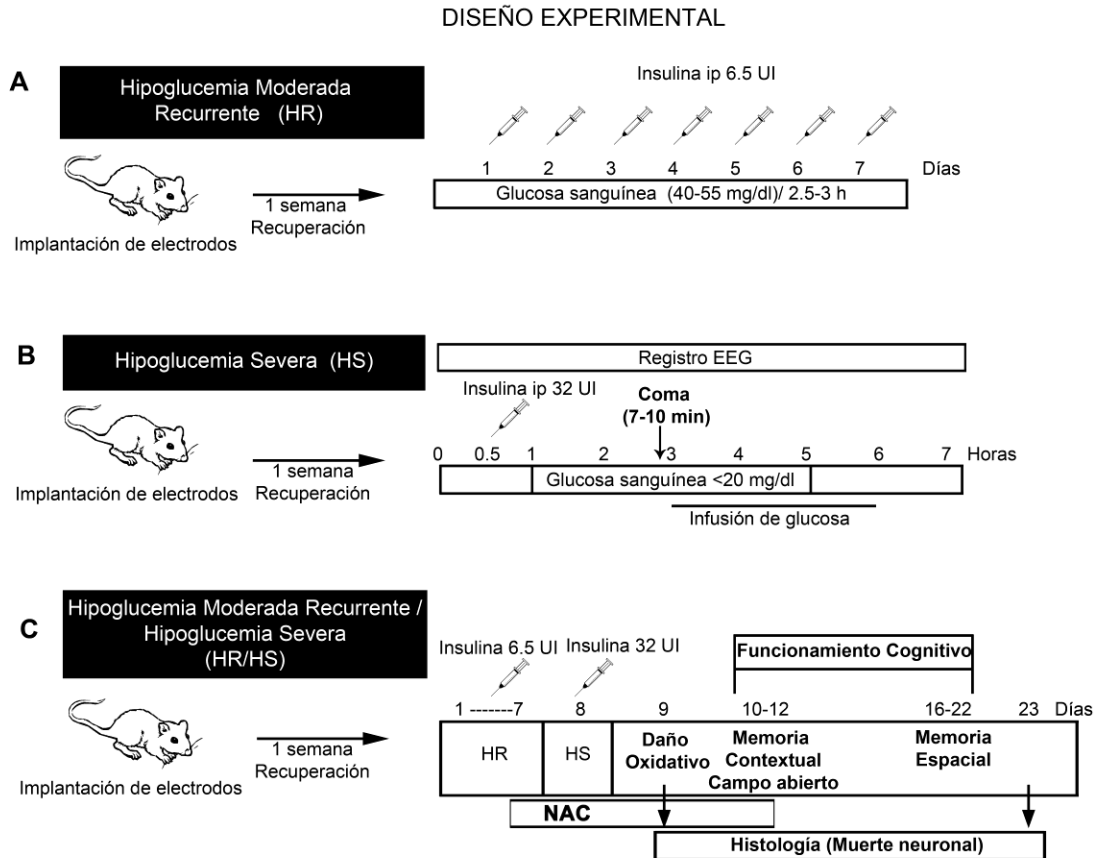


Figura 4. Diseño Experimental. Una semana previa a la inducción de hipoglucemia, los animales fueron implantados con electrodos epidurales bajo 2.5-3.0% de isoflurano para llevar a cabo el registro electroencefalográfico (EEG) de 2 canales (hemisferios izquierdo y derecho). A) Hipoglucemia Moderada Recurrente (HR). Los animales fueron inyectados con 6.5 unidades de insulina (UI) durante 7 días consecutivos y los niveles de glucosa sanguínea se mantuvieron en un rango de 40-55 mg/dl durante 2.5-3.0 h. B) Hipoglucemia Severa (HS). Los animales fueron inyectados con 32 UI y después de 2-3 h fueron expuestos al coma hipoglucémico y luego rescatados con infusión de glucosa (SH). C) Hipoglucemia moderada recurrente/Hipoglucemia severa (HR / HS). A los animales se les inyectó 6.5 UI durante 7 días y 24 h después se les administró 32 UI. Después de 2.5-3.0 h los animales fueron expuestos al coma y rescatados con glucosa. 24 h después se extrajeron los cerebros para análisis bioquímicos o histológicos. Se utilizaron grupos independientes para la evaluación de pruebas conductuales. Un grupo independiente de animales fue tratado con N-Acetil Cisteína (NAC) después del coma, 5 administraciones diarias i.p (100 mg/kg). Los cerebros fueron disectados 24 h después de los tratamientos y se utilizaron para análisis histológicos o bioquímicos o los animales fueron utilizados en las pruebas conductuales.

Diseño Experimental Sección 2

Los protocolos experimentales de la Sección 2 fueron exactamente iguales que los que se utilizaron en la Sección 1, excepto que los animales no se dejaron progresar al coma y al tener la pérdida de reflejo de enderezamiento se les administró un bolo de glucosa al 25%, seguido de una infusión continua de glucosa durante 3 h, como se muestra en los incisos b y c de la figura 2.

VII. RESULTADOS

Sección 1

1. Concentraciones sanguíneas de glucosa y registro de la actividad eléctrica cerebral durante la hipoglucemia.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración media de glucosa basal (99.66 ± 1.20 mg / dl) entre los diferentes grupos experimentales. En los animales expuestos a HR, la glucosa disminuyó a 40 mg/dl 30 minutos después de la administración de insulina y se mantuvo entre 40-45 mg/dl durante las siguientes 3 h. La glucosa se recuperó después del suministro de alimento (Figura 5A). La concentración media diaria de glucosa en sangre alcanzada durante las 3 h del período de hipoglucemia moderada fue de 40 mg/dl (Figura 5B). En los animales expuestos a HS y a HR/HS, la concentración de glucosa disminuyó rápidamente después de 30 min de la administración de la insulina y permaneció en ≤ 20 mg/dl durante las próximas 2.5-3.0 h hasta llegar a la isoelectricidad. Los niveles de glucosa se recuperaron de manera parcial 1 h después de la reperfusión de glucosa y a las 24 h alcanzaron valores cercanos al control en todos los grupos experimentales (Figura 5A). Se registró la actividad eléctrica cerebral basal durante 30 minutos previos a la administración de insulina y no se observaron diferencias entre los grupos. Después de 2-3 horas se observaron los cambios característicos del EEG reportados en estudios previos (Julio-Amilpas et al., 2015). Cuando los niveles de glucosa estaban cerca de 20 mg/dl, la actividad cerebral eléctrica se hizo más lenta y estuvo completamente ausente durante el

período de coma. La actividad cerebral normal se recuperó 1 h después de la reperfusión de glucosa (Figura 5C).

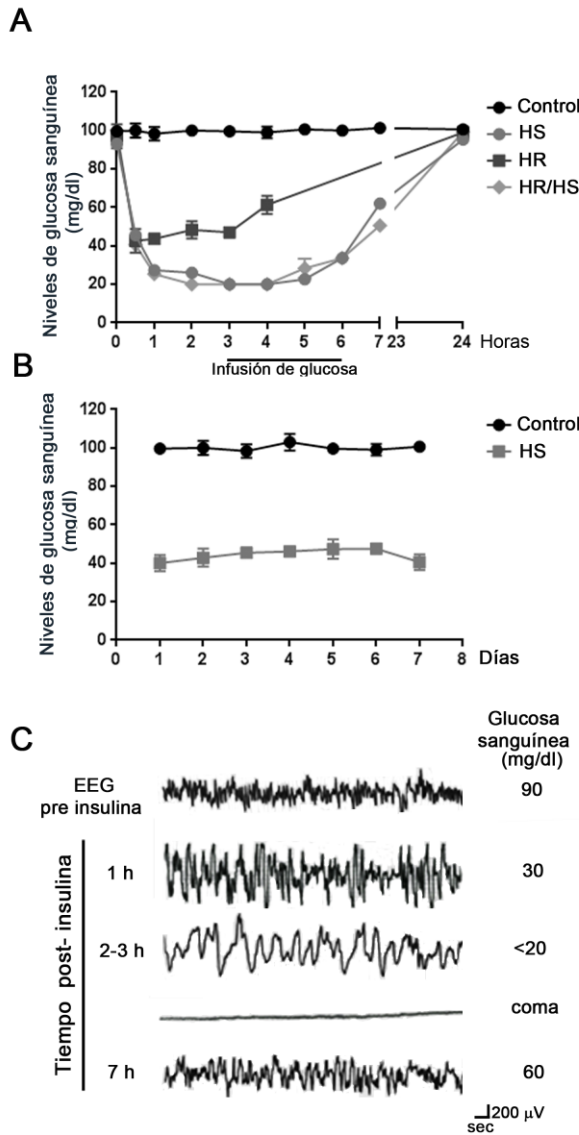


Figura 5. Niveles de Glucosa sanguínea y registro de la actividad eléctrica cerebral (EEG) en los diferentes grupos experimentales. A) Cambios en la glucosa sanguínea en animales control y tratados con insulina antes y después de la administración de insulina y después de la infusión continua de glucosa B) Concentración media diaria de glucosa sanguínea después de la inducción de HR. C) Registro de EEG representativo que muestra los cambios en la actividad eléctrica cerebral después de la administración de insulina y la infusión de glucosa de una rata expuesta al coma hipoglucémico. Datos expresados como media \pm error estándar.

2. La HR previa a la inducción del coma hipoglucémico exacerba la muerte neuronal

Las Figuras 6 y 7 muestran el número de células en degeneración a las 24 h y 16 días después de la inducción del coma en la corteza parietal y el estriado. No se observaron células de degeneración en animales de los grupos control e HR en ninguna de las

regiones evaluadas (Fig. 6A y C y Fig. 7A). Veinticuatro h después de que los animales estuvieron expuestos al coma hipoglucémico (9.5 ± 0.54 min) (HS), se observaron células FJB positivas en la corteza parietal y el estriado dorsolateral (Fig. 6A-D), mientras que en el hipocampo se observaron células FJB (+) únicamente en la cresta del giro dentado (GD) en el 50% de estos animales (Fig. 7 A, B, D). Los animales examinados 16 días después de la inducción del coma ($8.0 \pm 0,36$ min) mostraron un número menor de células FJB positivas en la corteza parietal y el estriado (Fig. 6B, D),

mientras que en las células de la cresta del GD la degeneración ya no fue visible (Fig. 7C).

Los animales expuestos al coma (9.5 ± 0.20 min) y previamente tratados con HR (HR/HS), mostraron un aumento significativo en el número de células en degeneración en la corteza parietal y el estriado en comparación con los tratados únicamente con HS, a las 24 h. Este aumento también se observó cuando los animales fueron examinados 16 días después de la inducción de HR/HS (7.28 ± 0.42 min de coma) (Fig. 6B, D). Las micrografías representativas que muestran células positivas a FJB de animales expuestos a los diferentes tratamientos se muestran en la Fig. 6A y C. Del mismo modo, el hipocampo mostró una elevación dramática en el número de neuronas en degeneración, las cuales se observaron no sólo en la cresta del GD sino también en las láminas superior e inferior del GD, el hilus, CA1 y CA3 (Fig. 7A). Este aumento fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de HS a las 24 h y 16 días en todas las regiones del hipocampo (Figura 7B, C). En las Fig. 7 A y D se muestran micrografías representativas que muestran neuronas degeneradas en los animales expuestos a los diferentes tratamientos. La presencia de células picnóticas se correlacionó con el marcaje de FJB en la corteza parietal, el estriado y el hipocampo (Figura 7D). La cuantificación de células en degeneración marcadas con FJB en las distintas regiones del hipocampo correlacionó con el marcaje de Nissl en las mismas regiones (Fig 8).

Del mismo modo, los núcleos positivos a TUNEL se observaron en la corteza parietal, el estriado (Figura 9) y el hipocampo (Fig. 10 A) de los animales del grupo HR/HS, mientras que en los animales expuestos únicamente al coma, los núcleos positivos a TUNEL se observaron sólo en la cresta del GD (Fig. 10B).

En los grupos control y HR, no se observaron núcleos TUNEL positivos en ninguna región (Figura 9). En conjunto, estas observaciones indican que la HR aumenta la vulnerabilidad a la muerte neuronal en la corteza parietal, el estriado y principalmente en el hipocampo de los animales expuestos a un periodo subsecuente corto de coma.

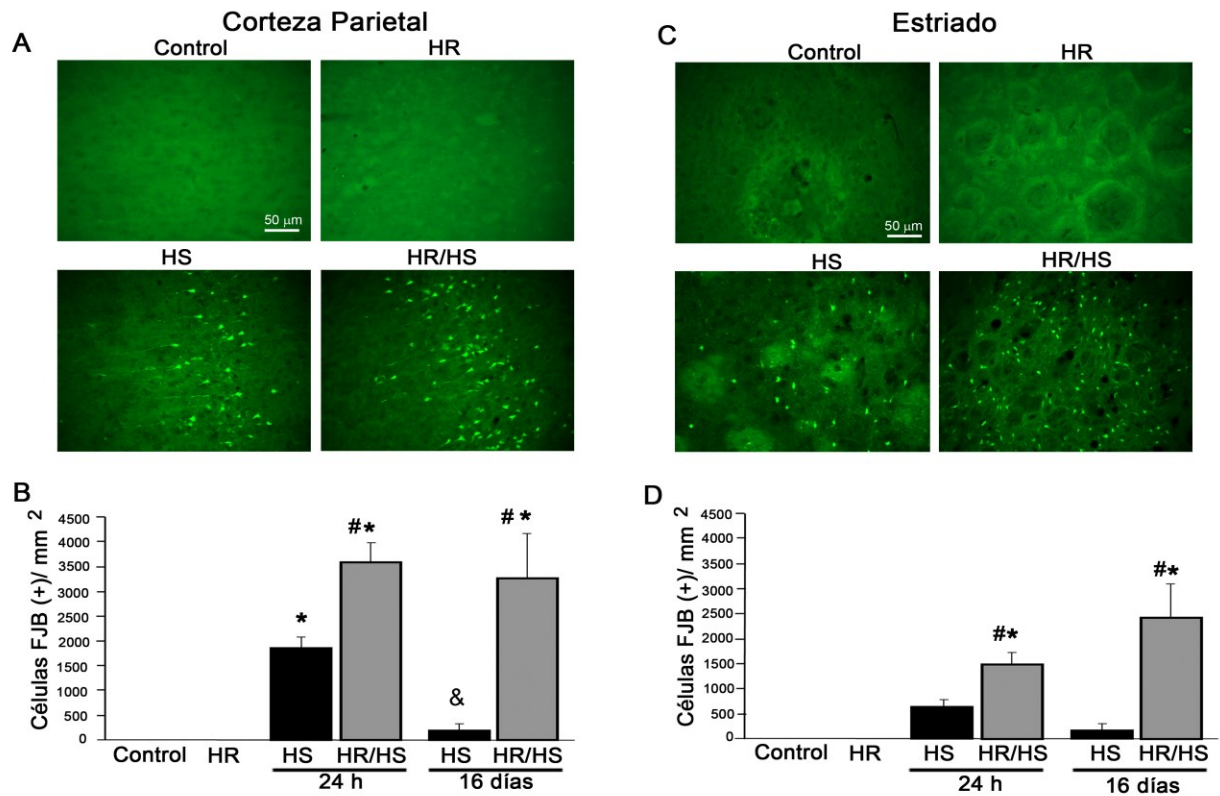


Figura 6. La muerte neuronal inducida por el coma hipoglucémico en la corteza parietal y el estriado es exacerbada por la HR previa. La muerte neuronal se evaluó 24 h y 16 días después de los tratamientos y se cuantificó el número de células FJB-positivas. Micrografías representativas del grupo de 24 h muestran que en los animales del grupo control e HR no hubo células FJB(+). En el grupo de HS se observa un incremento en el número de células FJB (+) con respecto al control en la corteza parietal (A) y el estriado (C). La muerte celular se exacerbó en animales expuestos a HR/HS a las 24 h y 16 días después de los tratamientos. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7 animales por grupo. * $P < 0.0001$ con respecto al control y HR, # $p < 0.0001$ con respecto al grupo de HS.

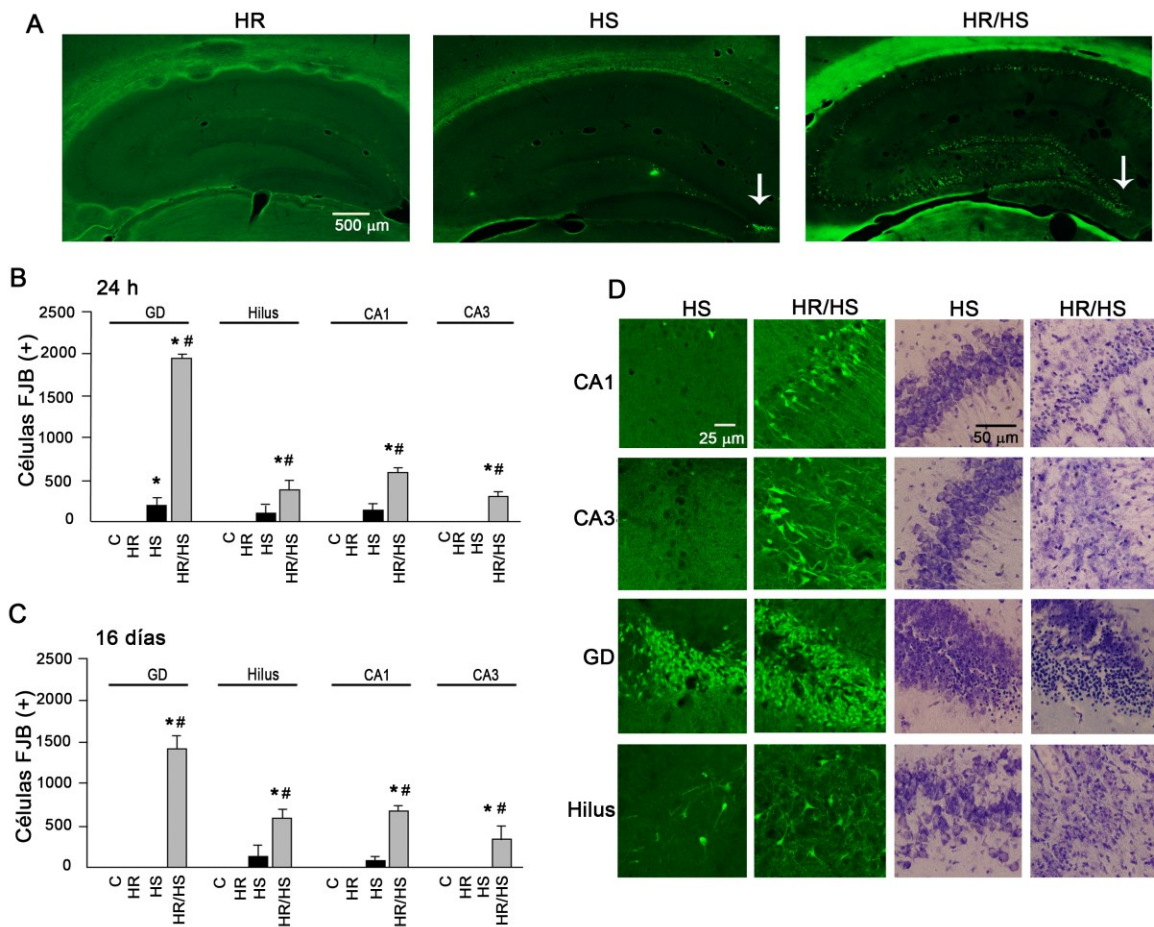


Figura 7. La muerte neuronal inducida por el coma hipoglucémico en el hipocampo es exacerbada por la HR previa. La muerte neuronal se evaluó 24 h o 16 días después de los diferentes tratamientos en secciones cerebrales teñidas con Nissl o FJB. A) Micrografías representativas del grupo de 24 h, muestran células degeneradas sólo en la cresta del GD de animales expuestos a HS y en todas las regiones hipocámpales en animales del grupo HR/HS. B-C) Datos cuantitativos que muestran la muerte neuronal exacerbada en animales expuestos a HR/HS a las 24 h o 16 días. D) Micrografías representativas muestran células FJB-positivas y picnóticas en las diferentes subregiones del hipocampo de ratas expuestas a los diferentes tratamientos. Los datos se expresan como media \pm SEM de 7 animales por grupo. * $P < 0.0001$ con respecto al control y HR, # $p < 0.0001$ con respecto a al grupo de HS.

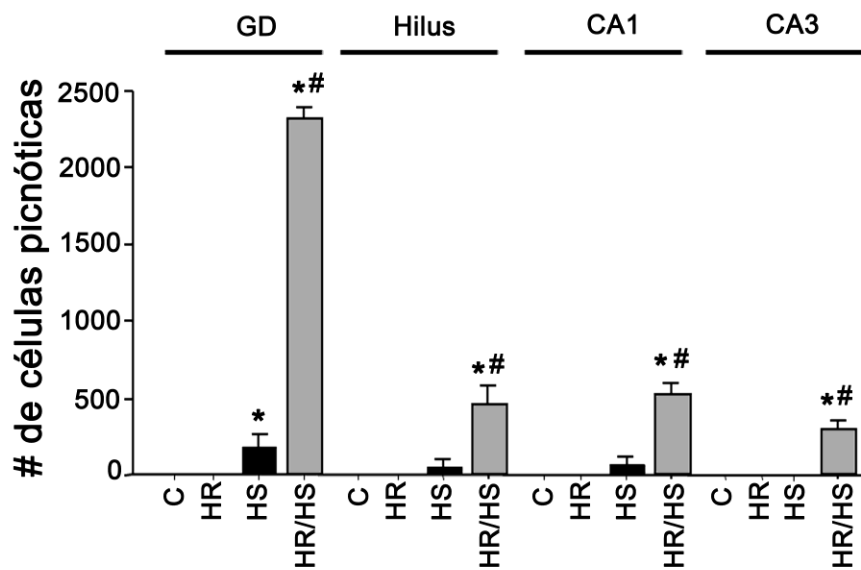


Figura 8. La muerte neuronal inducida por el coma hipoglucémico en el hipocampo es exacerbada por la HR previa. Se evaluó la muerte neuronal 24 h después de la inducción de los tratamientos experimentales en cortes coronales teñidos con Nissl. Se cuantificó el número de células picnóticas en el GD, Hilus, CA1 y CA3 del hipocampo. Se observa un aumento significativo en el número de células picnóticas en el grupo de HR/HS con respecto al grupo de HS. Los datos son expresados como Media \pm error estándar. * $p < 0.0001$ con respecto al control; # $p < 0.001$ con respecto al grupo de HS.

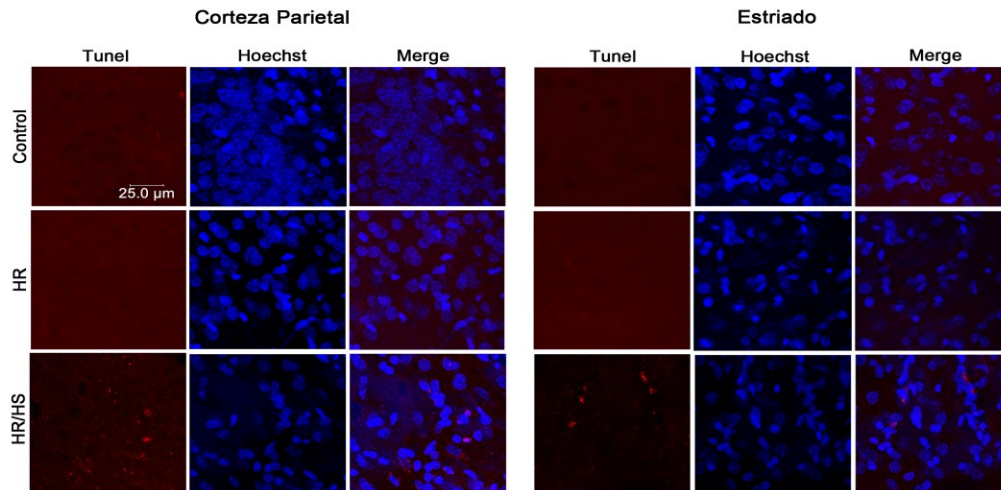


Figura 9. Células positivas a TUNEL en la corteza y el estriado. Se observaron células positivas a TUNEL en la corteza parietal y el estriado de animales expuestos a HR/HS. No se observaron células TUNEL (+) en la corteza o el estriado de animales de los grupos control o HR.

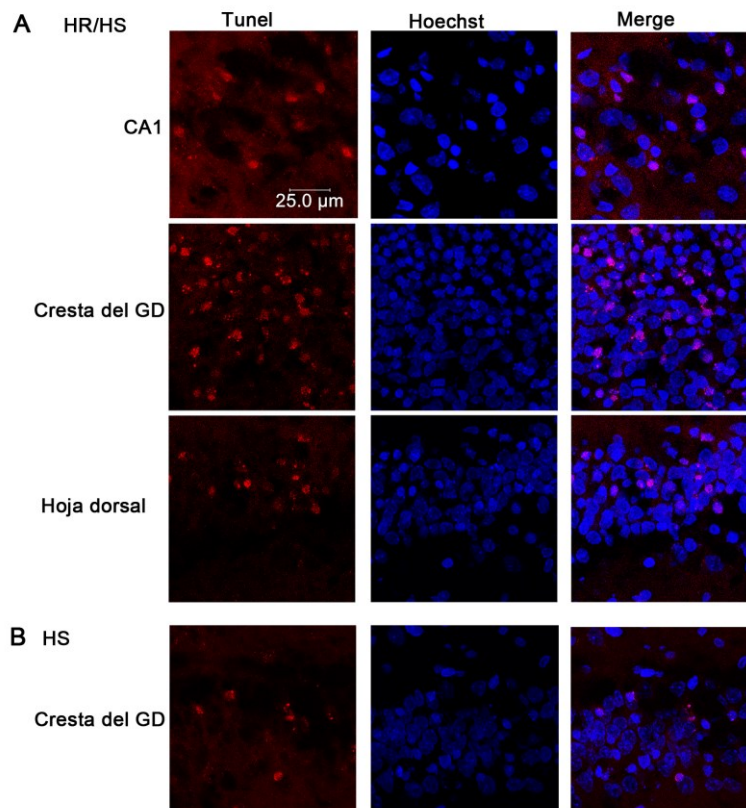


Figura 10. La HR aumenta el número de células positivas a TUNEL en ratas expuestas al coma hipoglucémico. Se examinó la presencia de células positivas a TUNEL utilizando Hoechst como contra-tinción. A) Micrografías representativas que muestran células positivas a TUNEL en CA1 y GD de animales tratados con HR/HS B) En animales expuestos únicamente a HS se detectaron células positivas a TUNEL únicamente en la cresta del GD.

3. La HR previa a la inducción del coma hipoglucémico exagera el deterioro cognitivo inducido por el coma hipoglucémico

De acuerdo con los resultados previamente descritos, la HR aumentó notablemente la muerte neuronal inducida por el coma hipoglucémico en el hipocampo. Por lo tanto, evaluamos el funcionamiento cognitivo en los animales expuestos a HR/HS mediante dos pruebas de memoria dependientes del hipocampo. La Figura 11A muestra que durante los 5 días de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, la latencia para localizar la plataforma disminuyó de manera similar en todos los grupos experimentales indicando que no hay diferencia en la adquisición del aprendizaje. Siete días después de la inducción del coma, los grupos HS y HR/HS mostraron una disminución significativa en el número de cruces con respecto al grupo control, mientras que los animales expuestos únicamente a HR no mostraron una disminución significativa (Figura 11B). La figura 11C muestra que 15 días después de la inducción de coma, únicamente el grupo de HR/HS tuvo un decremento estadísticamente significativo en el número de cruces con respecto al grupo control, lo que sugiere que la HR previa al coma produce un deterioro en la memoria, el cual permanece por un tiempo prolongado después de la inducción del coma cuando los animales fueron evaluados en estado euglucémico, lo cual sugiere un cambio a largo plazo en la memoria espacial (Figura 11C).

La figura 11D muestra el comportamiento de los animales en el condicionamiento al miedo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante la adquisición del miedo contextual (día 1), ya que se observó un porcentaje similar de “freezing” en todos los grupos experimentales. En la prueba de memoria (día 2), sólo el grupo de HR/HS mostró una disminución significativa en el porcentaje de “freezing” con respecto al grupo control y al grupo de HR (Figura 11D panel derecho). No se encontraron cambios en la actividad locomotora ni en la ansiedad en ninguno de los grupos (Fig. 11E-F). Estos datos concuerdan con la prueba de memoria espacial y sugieren que la HR previa al coma hipoglucémico exagera el deterioro cognitivo, especialmente en la consolidación de la memoria, ya que en ambas pruebas los animales

no mostraron déficits en la fase de adquisición y únicamente cuando fueron evaluados en la fase de consolidación mostraron un deterioro importante, el cual se correlaciona con la presencia de neuronas en degeneración en el hipocampo.

En los animales sometidos a la HR/HS se observó una disminución importante en los niveles de GSH (Ver más adelante), por lo que se decidió conocer si la administración del antioxidante NAC podría reducir la muerte neuronal y el declinamiento cognitivo. De acuerdo a los resultados, en los animales que recibieron este tratamiento, se previno completamente el déficit cognitivo en la prueba de memoria contextual (condicionamiento al miedo) (Fig 11 D) y este efecto correlacionó con una disminución significativa en el número de células dañadas en la región CA1 y del GD del hipocampo (Fig 11 G-H). Como se muestra en la Figura 11 G y H, el tratamiento con NAC redujo significativamente el número de células picnóticas y de células positivas a FJB en el GD y CA1, además de la región CA3 e hilus (Datos no mostrados). Finalmente, estos datos sugieren que la defensa antioxidante tiene un papel esencial en el aumento de la vulnerabilidad a la muerte neuronal, el daño oxidativo y el deterioro cognitivo en los animales que presentan HR/HS.

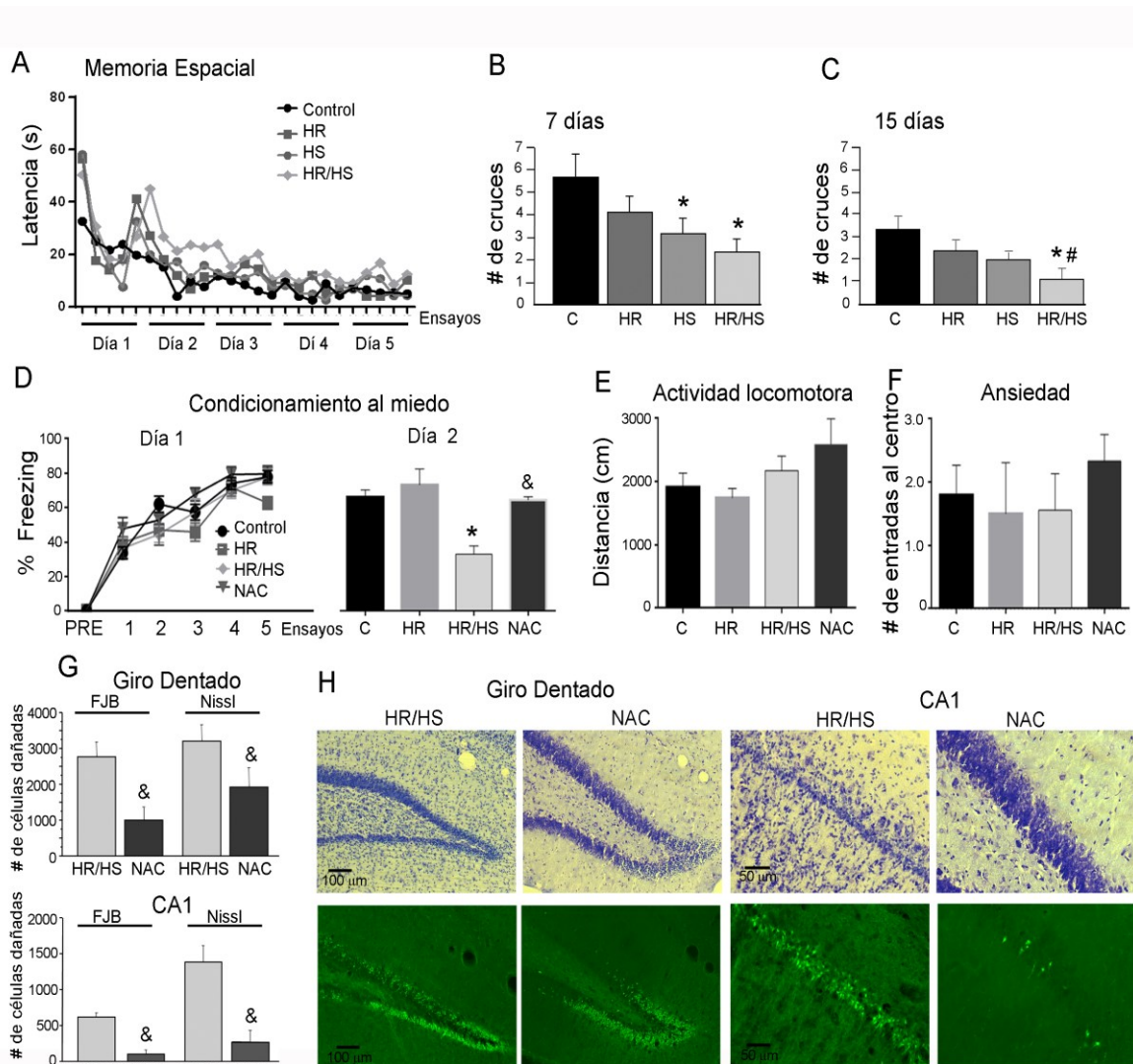


Figura 11. La HR agrava el deterioro cognitivo inducido por el coma hipoglucémico. La prueba de memoria espacial (laberinto de agua) se realizó 7 y 15 días después de los tratamientos. A) Curva de aprendizaje de los animales expuestos a los diferentes tratamientos. B) Al día 7, los animales tratados con HS y HR/HS muestran una disminución en el número de cruces. C) A los 15 días, sólo los animales del grupo HR/HS muestran una disminución significativa en el número de cruces. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7 animales por grupo * $p < 0.01$ con respecto al grupo control, # $p < 0.05$ con respecto al grupo de HS. La prueba de condicionamiento al miedo se realizó 48 h después de los tratamientos. D) Fase de adquisición del condicionamiento al miedo (día 1). El grupo HR/HS mostró una disminución significativa en el porcentaje de “freezing” en relación con los grupos control e HR durante la prueba de evocación (día 2) * $p < 0.0001$ con respecto al control y HR. E) No se observaron cambios significativos entre los grupos en la actividad locomotora y F) ansiedad. G) Muestra el número de células dañadas (células positivas a FJB y células picnóticas teñidas con Nissl) en el GD y CA1 de los animales tratados con HR/HS y con NAC, 24 h después de la prueba de condicionamiento al miedo. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 4-6 animales por grupo. & $P < 0.002$ con respecto al grupo de HR/HS. H) Imágenes representativas del efecto protector inducido por la administración de NAC.

4. La HR previa al coma hipoglucémico induce daño oxidativo a lípidos y proteínas y una disminución en la defensa antioxidante

El estrés oxidativo ha sido implicado en la muerte neuronal inducida por el coma hipoglucémico (Suh et al., 2007; Suh et al., 2008; Haces et al., 2010; Julio-Amilpas et al., 2015). Por lo tanto, evaluamos los niveles de GSH y de lipoperoxidación y la presencia de 4-HNE y 3-NT en residuos de proteínas. La figura 12 muestra la presencia de células positivas a 4-HNE en la corteza parietal, el estriado y todas las subregiones del hipocampo de los animales expuestos HR/HS, mientras que en los grupos control, HR e HS, la inmunoreactividad a 4-HNE no se observó (Fig. 12). Como se muestra en la Figura 13, se observaron células positivas a 3-NT principalmente en la corteza parietal, el GD y el hilus de los animales expuestos a HR/HS. En los grupos control y HR, la inmunoreactividad a 3-NT no se observó, mientras que en el grupo HS únicamente se observaron algunas células positivas a 3-NT en algunos animales (Figura 13). Estos resultados sugieren que la HR facilita el daño oxidativo a las proteínas en animales expuestos a un período corto de coma, subsecuente a la HR. Estos cambios se correlacionan con la presencia de muerte celular.

Posteriormente se evaluó si una disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH), la mayor defensa antioxidante en el cerebro, está implicada en el daño oxidativo observado en los animales tratados con HR/HS. Como se muestra en la Figura 14, la HR produjo una disminución parcial (de 27-32%) pero significativa en los niveles de GSH en todas las regiones cerebrales evaluadas, mientras que los animales del grupo HR/HS mostraron un decremento mayor (de 47-58%) en GSH en todas las áreas cerebrales, siendo éste cambio más drástico en el hipocampo (59%). Estos cambios en los niveles de GSH fueron observados después de 12 h de la inducción de hipoglucemia y fueron mantenidos en todas las regiones evaluadas hasta las 24 h. Estos resultados sugieren que una disminución en los niveles de GSH contribuye a aumentar los niveles de daño oxidativo en los animales que tuvieron HR/HS.

De acuerdo a los resultados descritos previamente, la disminución parcial en los niveles de GSH en los animales con HR, sugieren la presencia de estrés oxidante en esta condición, por lo que se determinaron los niveles de lipoperoxidación en este grupo, y se observó un aumento significativo en todas las regiones del cerebro estudiadas

(Figura 15). Sin embargo, de acuerdo con los resultados de inmunocitoquímica e histología, estos cambios no son suficientes para producir daño oxidativo o muerte neuronal en esta condición experimental.

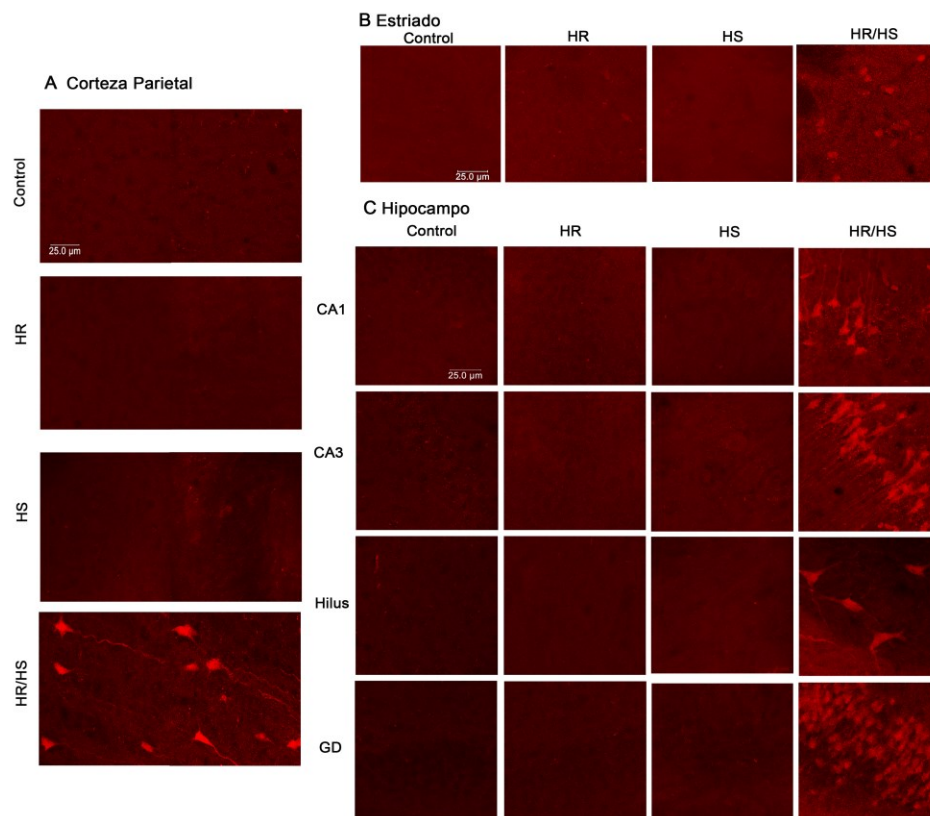


Figura 12. Inmunoreactividad a 4-HNE en el cerebro de animales expuestos a los distintos tratamientos. Imágenes representativas de fluorescencia que muestran la presencia de células positivas a 4-HNE en A) Corteza parietal, B) Estriado e C) Hipocampo de animales tratados con HR/HS. No se detectaron células positivas a 4-HNE en los grupos control, HR y HS.

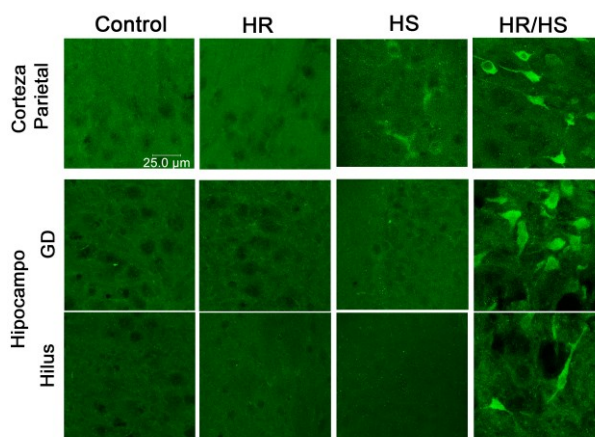


Figura 13. Inmunoreactividad a 3-NT en el cerebro de animales expuestos a los distintos tratamientos. Imágenes representativas de fluorescencia que muestran la presencia de células positivas a 3 NT en la corteza parietal y el hipocampo de animales tratados con HR/HS. No se detectaron células positivas a 3-NT en los grupos control HR y sólo algunas células en las ratas sometidas a la HS.

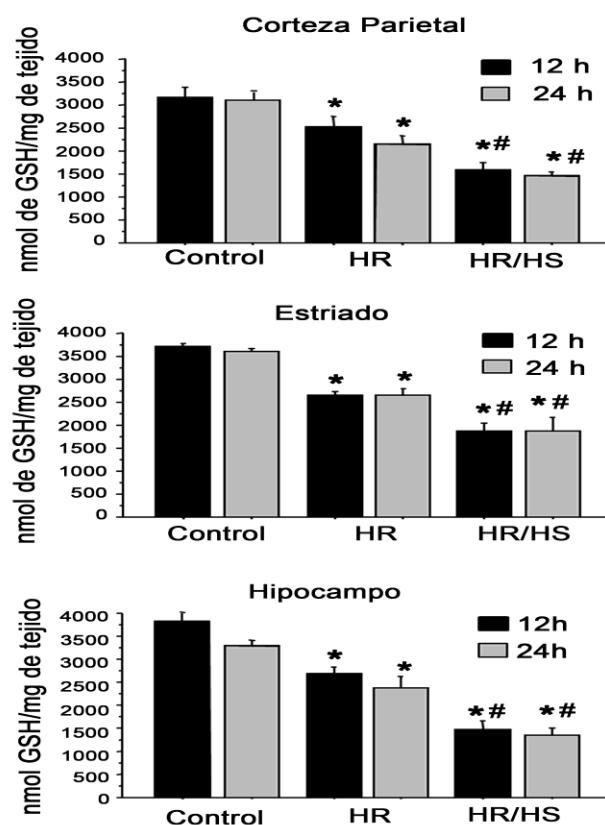


Figura 14. Cambios en los niveles de Glutación (GSH) después de la inducción de HR y HR/HS. Los animales fueron expuestos a los diferentes tratamientos y 24 horas después se evaluaron los niveles de GSH en diferentes regiones del cerebro. Los animales expuestos a HR muestran una disminución parcial significativa en los niveles de GSH con respecto a los animales del grupo control en todas las regiones cerebrales. La disminución de GSH se exagera en el grupo de HR/HS (n = 3-7 animales por grupo)

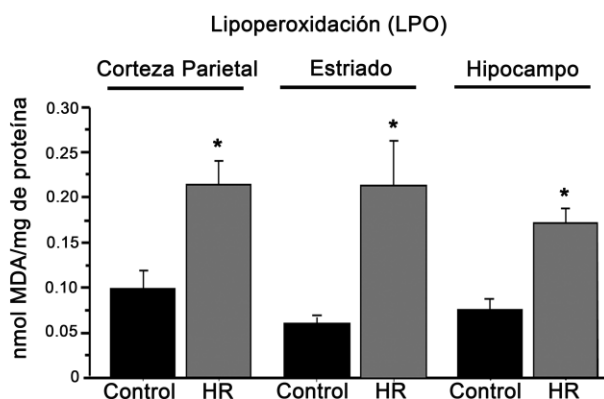


Figura 15. Niveles de Liperoxidación (LPO) en los animales tratados con HR. Veinticuatro horas después del tratamiento con HR, la LPO aumentó en la corteza parietal, el estriado y el hipocampo. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-10 animales por grupo. * P < 0.0001 en relación con el control.

5. La HR previa al coma hipoglucémico induce la supercompensación de los niveles de glucógeno cerebrales

Finalmente, se investigó si el daño oxidativo y la exacerbación de la muerte neuronal en el grupo sometido a HR/HS podría deberse al agotamiento del glucógeno cerebral. Como se observa en la Figura 16, la concentración de glucógeno no mostró ningún cambio en los animales tratados con HR en comparación con el grupo control, mientras que en los animales expuestos a HR/HS éste aumentó significativamente relativo a los niveles control en todas las regiones cerebrales estudiadas a sugiriendo una supercompensación.

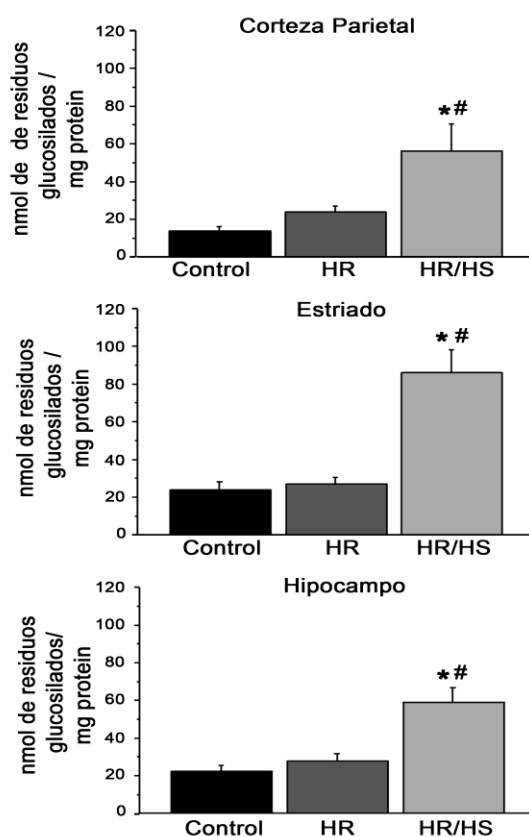


Figura 16. Cambios en los niveles de glucógeno después de la inducción de HR y HR/HS. Se observó un aumento significativo en la concentración de glucógeno en animales expuestos a HR/HS (n = 3-7 animales por grupo). Los datos son expresados como media \pm error estándar. * P <0,01 con respecto al control; # P <0,01 con respecto a HR.

Sección 2

1. La hipoglucemia moderada recurrente previa a la inducción de la hipoglucemia severa en ausencia de coma reduce la muerte neuronal

Los animales expuestos a la hipoglucemia severa sin coma, presentaron un número de células positivas a FJB en la corteza y el estriado mucho menor al observado en las ratas sometidas a coma, y no se observaron células dañadas en el hipocampo (Fig 6 y Fig 17 A), tal y como ya se había reportado anteriormente (Julio-Amilpas et al. 2015). En contraste al grupo de ratas sometidas a la HR seguida de un episodio de coma, cuando la HR precede a un episodio de HS sin coma (HR/HSNC), se observó una disminución en el número de células en proceso de degeneración en la corteza parietal, mientras que en el estriado no se observaron células dañadas (Fig. 17 A). A diferencia de los resultados obtenidos en el modelo de coma hipoglucémico, éstos resultados sugieren que la HR previene el daño inducido por la HS cuando ésta no alcanza el estado de coma.

2. La hipoglucemia moderada recurrente previa a la inducción de la hipoglucemia severa en ausencia de coma no exacerba el estrés oxidante

Los animales sometidos únicamente HS en ausencia de coma, no presentaron un aumento significativo en los niveles de LPO en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. En contraste, como ya se describió anteriormente los animales tratados únicamente con HR, sí presentaron un aumento significativo en la LPO con respecto al control en todas las regiones. Cuando la HR es seguida de un episodio de HS sin coma (HSNC), no se observó incremento en LPO ni en el estriado ni en el hipocampo y sólo se elevó en la corteza parietal a niveles similares a los observados en el grupo de HR (Fig. 17 B). Estos resultados indican que no hay mayor daño oxidativo a lípidos cuando la HR es seguida de un episodio de HS sin coma.

Por otra parte, los animales sometidos únicamente a la HS sin coma no presentaron una disminución significativa en los niveles de GSH en el hipocampo y el estriado observándose una disminución parcial significativa únicamente en la corteza similar a

la observada en el grupo de HR. Como se describió antes los animales tratados con HR presentaron una disminución parcial en los niveles de GSH. El grupo tratado con HR/HSNC presentó una disminución de GSH similar a la encontrada en los animales tratados únicamente con HR en todas las regiones (Figura 17 C). Contrario a los resultados obtenidos en el modelo de coma hipoglucémico, estos resultados sugieren que la HR no exagera el estrés oxidante inducido por un periodo de subsecuente de HS cuando no se alcanza el estado de coma.

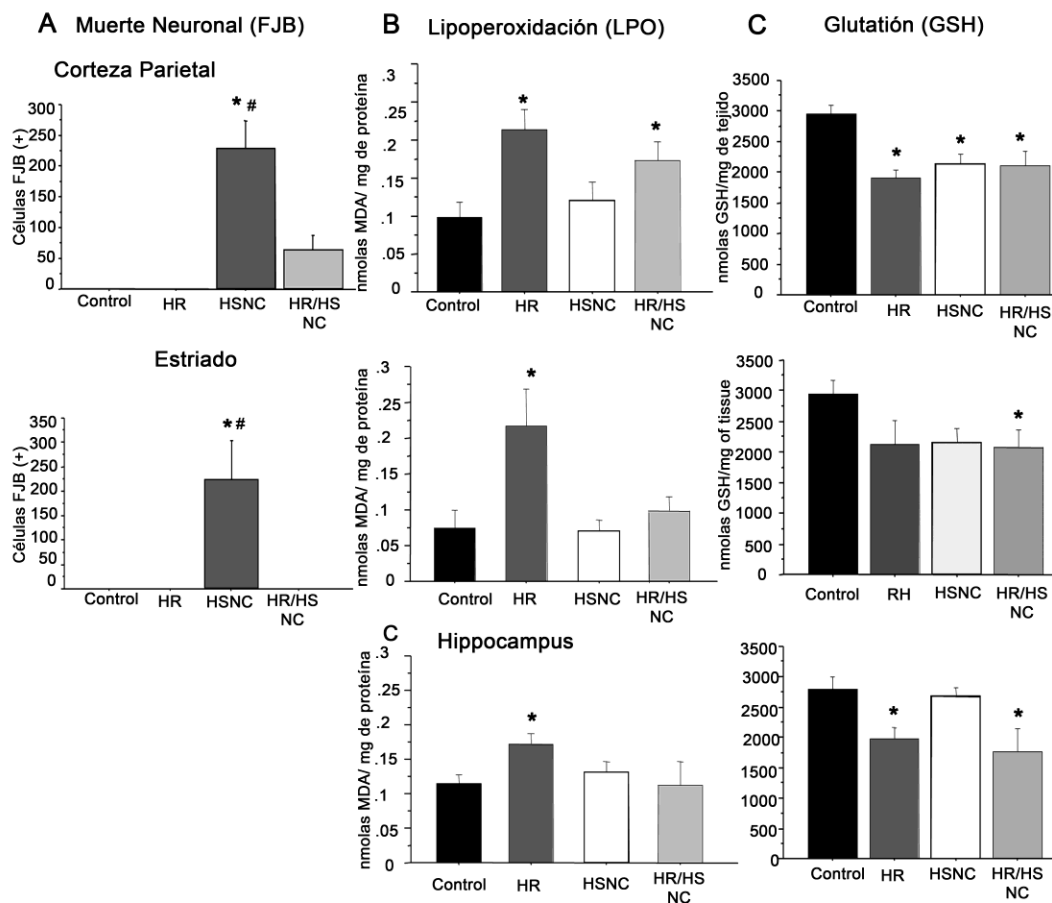


Figura 17. La HR disminuye la muerte neuronal y no exagera el estrés oxidante inducido por la HS sin coma. A) La muerte neuronal se evaluó 24 h después de los tratamientos y se cuantificó el número de células FJB-positivas. En el grupo de HS se observa un incremento en el número de células FJB (+) con respecto al grupo control en la corteza parietal y el estriado. La muerte celular disminuyó en animales expuestos a HR/HS a las 24 h después de los tratamientos. No se observó presencia de muerte celular en el hipocampo después de la HR/HS sin coma. B-C) La HR previa no causó un mayor aumento en los niveles de LPO ni una mayor disminución de los niveles de GSH a los observados en los animales tratados únicamente con HR ó HS. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7 animales por grupo. * $P < 0,0001$ con respecto al control y HR, # $p < 0,0001$ con respecto al grupo de HS.

DISCUSIÓN

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) es una enfermedad crónica prolongada frecuentemente diagnosticada durante la infancia que perdura hasta la edad adulta. En Europa se ha estimado una tasa de crecimiento anual de su incidencia de 3-4% en niños y adolescentes (Blasetti et al., 2011; Franchini et al., 2016). De acuerdo a un grupo de 25 asociaciones civiles, entre las que se encuentra la Federación Internacional de Diabetes, la Sociedad Mexicana de Pediatría y la Sociedad Mexicana de Endocrinología pediátrica, en el año 2016 se calculó que en México hay un estimado de 600 mil pacientes con DMT1, aunque no se tiene un registro oficial del número actual de pacientes que padecen de la enfermedad.

Los pacientes con DMT1 sometidos a un tratamiento estricto con insulina sufren episodios frecuentes de hipoglucemia moderada, en promedio 2 por semana, lo que aumenta el riesgo de sufrir de HS, pudiendo presentarse un episodio al año por paciente. La presencia de episodios de hipoglucemia se debe al fallo en la respuesta contrareguladora hormonal a la hipoglucemia y a la presencia de la hipoglucemia desapercibida (Beall et al., 2012; Martín-Timón et al., 2014). Aunque la hipoglucemia a niveles moderados no se ha considerado una amenaza potencial para los pacientes, sus consecuencias sobre la función cerebral, ya sea por sí misma o cuando es seguida por un episodio de HS, no se conocen del todo. En el presente estudio hemos abordado esta pregunta y nuestro hallazgo más importante es que la HR previa a la inducción de un periodo corto de coma, exacerba el daño oxidativo y la muerte neuronal, lo que conduce a un deterioro de la memoria. En estudios previos de nuestro laboratorio hemos observado que episodios cortos de coma de 5-10 min inducen la muerte neuronal principalmente en la corteza parietal, pero no en el hipocampo, excepto en la cresta del giro dentado (Julio-Amilpas et al., 2015; Haces et al., 2010). En el presente estudio se demostró que los animales expuestos a un periodo breve de coma, pero que fueron tratados previamente con HR, tuvieron un número mayor de células muertas ó dañadas en la corteza parietal y el estriado, pero notablemente más en el hipocampo, en donde las células en degeneración están presentes en todas las subregiones. Las neuronas en degeneración se observaron incluso 16 días después del coma y se correlacionaron con

la deficiencia en memoria espacial. El deterioro cognitivo fue confirmado por el déficit en la ejecución de la prueba de miedo condicionado evaluada 5 días después del coma, y curiosamente observamos que en las pruebas de memoria espacial y contextual, principalmente la consolidación de la memoria se vio afectada. Cuando los animales se exponen únicamente a la HS, se observó una disminución transitoria de la memoria, lo cual concuerda con la ausencia de muerte neuronal a largo plazo en el hipocampo.

En estos animales se observó que el número de células dañadas a las 24 h después del coma disminuye a los 16 días y eliminándose por completo en el giro dentado, lo que sugiere que la neurodegeneración es transitoria. Por lo tanto, aún falta evaluar si los animales del grupo de HS pueden presentar un deterioro en la prueba de miedo condicionado, lo cual podría ser ocasionado por una disfunción sináptica aun cuando no hay una exacerbación de la muerte neuronal en las subregiones del hipocampo debido a que la duración del coma fue muy corta (7-10 min) y no indujo una exacerbación de la muerte neuronal. Además falta evaluar si el efecto en el grupo de HR/HS es mayor en comparación con el grupo de HS.

Estudios previos han relacionado la presencia de estrés oxidativo con la muerte neuronal después de un coma hipoglucémico prolongado (Suh et al., 2008; Won et al., 2012, Suh et al., 2007; Kho et al., 2016). Los resultados del presente estudio coinciden con la contribución del estrés oxidante a la muerte, ya que se observó la presencia de células inmunoreactivas a 4-HNE y a 3-NT en regiones cerebrales en donde también se observaron células en degeneración, en los animales tratados con HR y sometidos a un episodio subsecuente de coma. El 4-HNE se observó en todas las regiones estudiadas mientras que la inmunoreactividad contra 3-NT se observó principalmente en la corteza y el hipocampo. El 4-HNE y la 3-NT reaccionan con proteínas, modificándolas oxidativamente y alterando su funcionamiento, entre ellas enzimas de la defensa antioxidante como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, dando lugar a un círculo vicioso entre la producción de especies y la alteración de la defensa antioxidante (Ullery et al., 2012; Radi et al., 2013). Una defensa antioxidante deficiente podría contribuir al estrés oxidante y la muerte neuronal exacerbada observada en este estudio, ya que todas las regiones cerebrales mostraron una reducción notable en el

contenido de GSH en los animales tratados con HR y coma hipoglucémico. Además, esta reducción fue significativamente mayor a la observada en los animales sometidos únicamente a la HR. El GSH es la principal defensa antioxidante en el sistema nervioso y su disminución se asocia con estrés oxidativo y daño celular (Dringen et al., 2000; Baxter & Hardingham, 2016), por lo en las presentes condiciones experimentales su disminución podría contribuir a la muerte neuronal. Esta hipótesis se comprobó al administrar NAC, el cual además de actuar como antioxidante restituye los niveles de GSH (Reyes et al., 2016). Estos resultados concuerdan con estudios recientes que demuestran que la restauración de GSH por la administración de NAC previene el daño inducido por la inducción de un coma hipoglucémico prolongado (Kho et al., 2016).

Por otro lado, en el presente estudio se observó una disminución moderada de los niveles de GSH en los animales tratados únicamente con HR, lo cual correlacionó con un aumento de la LPO, pero no se observó daño oxidativo a proteínas (4-HNE y 3-NT) ni muerte neuronal o deterioro cognitivo. Estos resultados concuerdan con los de Rao y colaboradores, quienes observaron una disminución del contenido de GSH incluso después de un solo episodio de hipoglucemia moderada (Rao et al., 2014), y con varios estudios que han demostrado que la HR en animales sanos produce un aumento en la presencia de células positivas a 4-HNE y de los niveles de LPO, sin producir muerte neuronal significativa o deterioro cognitivo (Won et al., 2012; Yamada et al., 2004; McNeilly et al., 2016). Por otra parte, otra serie de estudios ha reportado que la HR en animales sanos puede incluso mejorar el rendimiento cognitivo debido a cambios sinápticos y adaptaciones metabólicas cerebrales (McNay et al., 2004; McNay et al., 2006; Osborne et al., 2016; Canada et al., 2011). Sin embargo en el presente estudio no se observó una mejor ejecución en los animales tratados únicamente con HR, esto podría relacionarse con la ausencia de supercompensación de los niveles de glucógeno al menos a las 24 h, momento en el que fueron evaluados. Nuestros datos están en concordancia con los hallazgos de Herzog et al., (2008), ya que en su modelo de HR durante 3 días consecutivos no encontraron cambios en los niveles de glucógeno a las 6 y 24 después del último episodio de hipoglucemia. No obstante, faltaría evaluar si ocurre la supercompensación en tiempos más tempranos o monitorear los cambios de glucógeno durante la fase de hipoglucemia, como en los experimentos de Choi et al., (2003), quienes demostraron el aumento en los niveles de glucógeno 6 h después del

evento hipoglucémico. Por otra parte, no podemos descartar que durante la HR en ratas adultas ocurran modificaciones sinápticas aún en la ausencia de la muerte neuronal, como ya lo reportó Yamada et al., 2004 en los animales neonatos. Aún faltaría investigar si en nuestro modelo de HR ocurren otras adaptaciones metabólicas como el aumento de los GLUT's, además de monitorear otros sistemas antioxidantes que puedan contrarrestar la presencia de muerte y daño oxidativo.

Diversos estudios han demostrado que el aumento del contenido de glucógeno (supercompensación de glucógeno) ocurre en el cerebro después de la inducción de la hipoglucemia aguda o de eventos repetidos de hipoglucemia (Canada et al., 2011; Öz et al., 2009; Khowaja et al., 2015). La supercompensación del glucógeno se ha propuesto como una respuesta metabólica compensatoria que contribuye a prevenir el daño neuronal, así como un mecanismo implicado en el desarrollo del fallo autonómico hipoglucémico y la hipoglucemia desapercibida (Khowaja et al., 2015). Al igual que los hallazgos previos, nuestros datos muestran que la supercompensación de glucógeno se produjo en la corteza parietal, el estriado y el hipocampo de animales tratados con HR/HS a las 24 h después. Se conoce que dicha supercompensación se debe a un incremento en la captura de glucosa resultante de la reintroducción de glucosa después de la hipoglucemia, lo cual puede explicar por qué el tratamiento con HR sola no dio lugar a la supercompensación de glucógeno ya que los animales no recibieron glucosa sino que la euglucemia se restauró por la adición de alimento. No obstante, la supercompensación de glucógeno no fue suficiente para prevenir la muerte neuronal en el grupo de HR/HS, posiblemente debido a que la captura excesiva de glucosa, resultante de la sobre regulación de los transportadores de glucosa inducida por la hipoglucemia, puede promover el estrés oxidante (Uehara et al., 1997; Lee et al., 2000).

La exacerbación de muerte neuronal hipoglucémica inducida por la HR, concuerda con investigaciones previas que demostraron que la exposición a la HR en ratas diabéticas exagera la lesión cerebral inducida por un periodo corto de isquemia aguda. Este efecto se correlaciona con la producción de superóxido mitocondrial que implica estrés oxidativo (Dave et al., 2011). En concordancia, estudios recientes han demostrado que los efectos de la HR sobre el estrés oxidativo y la defensa antioxidante se exageran en los animales diabéticos, lo que agrava el deterioro cognitivo (Won et al., 2012; Cardoso et al., 2012; Mc Neilly et al., 2016; Choi et al., 2013). Además, la eliminación de Nrf2,

un importante factor de transcripción que regula la defensa antioxidante, exacerba el daño oxidativo a proteínas inducido por la HR y el deterioro cognitivo en los animales control y diabéticos (Mc Neilly et al., 2016). En contraste, con estas observaciones, un estudio previo mostró que la HR durante 3 días previa a la hipoglucemia aguda, indujo un efecto de preconditionamiento, disminuyendo el número de neuronas degeneradas y previniendo el deterioro cognitivo en animales no diabéticos (Puente et al., 2010). En este estudio no quedó claro si los animales alcanzaron ó no el estado de coma, ya que no se mostraron registros electroencefalográficos, pero los animales si presentaron convulsiones las cuales posiblemente contribuyeron a la muerte neuronal.

En estudios previos mostramos que la HS en ausencia de coma produce muerte neuronal muy limitada en la corteza parietal y el estriado, más no en el hipocampo (Julio-Amilpas et al. 2015). Sin embargo, la presencia de estrés oxidante en esta condición se demostró por la presencia de proteínas positivas a 4-HNE y 3-NT (Haces et al 2010), así como por el incremento en el número de células productoras de ERO (positivas al fluoróforo sensible a la oxidación, dihidroetidio), incluso en el hipocampo en donde no se presenta muerte neuronal (Haces et al. 2010; Julio-Amilpas et al. 2015). En el presente estudio se encontró que los niveles de LPO en los animales con HS sin coma, se mantienen similares a los controles en todas las regiones cerebrales estudiadas. De manera similar, el contenido de GSH se mantiene cercano a los niveles control en el hipocampo y el estriado y disminuye parcialmente en la corteza, de manera similar a los animales tratados con HR. Estos datos sugieren que en ausencia de coma, el estrés oxidante no aumenta, ya que puede contrarrestarse evitando la muerte neuronal, debido a una eficiente defensa antioxidante ya que los niveles de GSH no se depletan.

Considerando estos resultados fue de nuestro interés investigar si en el modelo de HS sin coma, la HR previa podría también exacerbar la muerte neuronal. Los resultados indican que en contraposición al modelo de coma, la HR no exacerba la muerte neuronal posiblemente debido a que los niveles de GSH se mantienen moderadamente reducidos. Incluso se observó un menor número de células dañadas sugiriendo un efecto de preconditionamiento. Dicho efecto podría estar relacionado con la inducción de respuestas cerebrales adaptativas como un aumento en la captura de glucosa y en la síntesis de glucógeno. Otras respuestas adaptativas también podrían contribuir a la

supervivencia celular, incluyendo otros sistemas de defensa antioxidante además del GSH, como el sistema de Tioredoxinas, GPx, GRx, SOD, catalasa y MnSOD.

En resumen, los presentes resultados demuestran que la HR previa puede tener un efecto adverso sobre HS subsecuente en animales sanos, y sugiere que este efecto está mediado por la disminución en la defensa antioxidante y el daño oxidativo. Estas observaciones demuestran que la HR promueve que el cerebro y particularmente el hipocampo, sean más vulnerables al daño oxidativo y a la muerte neuronal inducidos por un episodio subsecuente de coma hipoglucémico, que finalmente conduce a disfunción cognitiva. De acuerdo a los resultados, cuando la HR antecede un episodio de HS que no progresa al estado de coma, no tiene efectos adversos sino por el contrario puede prevenir la neurodegeneración. Más investigaciones son necesarias para conocer si en ausencia de coma, la HR puede mejorar la función cognitiva. Por otra parte, dilucidar los mecanismos por los que la HR puede ó no tener efectos adversos sobre la HS subsecuente nos ayudaría a prevenir sus consecuencias.

Finalmente, las observaciones del presente estudio destacan la relevancia que puede tener la presencia de los episodios hipoglucémicos en pacientes con DMT1 y nos ayudan a estimar sus consecuencias sobre los efectos de un episodio posterior de HS.

Perspectivas

La presente investigación se realizó en individuos sanos con el fin de evitar la influencia de la patología diabética sobre el daño hipoglucémico, y fue un estudio realizado a corto plazo por lo que fue necesario extender el número de episodios de HR a 7 episodios consecutivos. Sin embargo, es importante investigar en animales diabéticos si la inducción de HR a una menor frecuencia, por ejemplo 2 episodios por semana, puede empeorar ó mejorar los efectos adversos de la HS.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de este trabajo demuestran que la HR aumenta la vulnerabilidad a la muerte neuronal inducida por la HS acompañada de coma, este efecto está mediado por la disminución de defensa antioxidante y el aumento del daño oxidativo, lo cual se relacionó con el déficit en la memoria. El mantenimiento de la defensa antioxidante es esencial para la regulación del daño oxidativo y la muerte neuronal inducida por la hipoglucemia en animales sanos.

REFERENCIAS

1. Alvarez EO; Beauquis J; Revsinc Y; Banzana AM; Roing P; De Nicola AF; Saravia F. (2009). Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav Brain Res*: 224-230.
2. Ames A. (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Rev*. 34: 42-68.
3. Amiel SA. (1998). Cognitive function testing in studies of acute hypoglycaemia: rights and wrongs. *Diabetología*: 713-719.
4. Auer RN; Wieloch T; Olson Y; Siesjo B. (1984). The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathologica*. 64: 177-191.
5. Bhardwaj SK; Sharma ML; Gulati G; Chhabra A; Kaushik R; Sharma P; Kaur G. (1998). Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system. *Mol Chem Neuropathol*. 34: 157-168.
6. Baxter PS and Hardingham PE.(2016)Adaptative regulation of the brain's antioxidant defenses by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med* ; 100: 147-152.
7. Bélanger M, Allaman I, Magistretti P.(2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte- Neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*; 14: 724-738.
8. Beltrán F , Acuña A; Miró M, Castro, M.(2012). Brain energy Metabolism in health and Disease. in *Neuroscience. Dealing in Frontiers*. Intech. pp331-341

9. Beall C, Michael L, McCrimmon A, et al.(2012). The physiology and pathophysiology of the neural control of the counterregulatory response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* ; 202: 215-223.
10. Bhardwaj SK; Sharma ML; Gulati G; Chhabra A; Kaushik R; Sharma P; Kaur G. (1998). Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system. *Mol Chem Neuropathol*. 34: 157-168.
11. Blasetti A, Di Giulio C, Tocco AM, et al (2011). Variables associated with severe hypoglycemia in children and adolescents with Type 1 diabetes: a population-based study. *Pediatr Diabetes*; 12: 4-10.
12. Bondy SC; Lebel CP. (1993). The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med*. 14:633-642.
13. Bree AJ, Puente EC, Daphna-Iken D, et al. (2009). Diabetes increases brain damage caused by severe hypoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 297: 194–201.
14. Canada S, Weaver S, Sharpe S, et al.(2011) Brain glycogen supercompensation in the mouse after recovery from insulin-induced hypoglycemia. *J Neurosci Res*; 4: 585-591.
15. Cardosos S, Santos RX; Seica R, Moreira PI (2010). Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin- induced hypoglycemia. *Biochim Biophys Acta*. 11; 942-51.
16. Cardoso S, Santos RX, Correia SC, et al (2012). Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiol Dis*; 49: 1–12
17. Carneiro R, Pellerin L. (2015). Monocarboxylate transporters: new players in body weight regulation. *Obes Rev*. 1: 55-66.
18. Carrol MF; Burge MR; Schade DS. (2003). Severe hypoglycemia in adults. *Rev Endoc MetabDisord*. 4: 149-157.
19. Cataldo A, Broadwell R (1986). Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol*; 4:511-24
20. Choi SW; Benzie IF; Ma SW; Strain JJ; Hannigan BM. (2008). Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? *Free Radic Biol Med*. 44: 1217- 1231.
21. Choi BY, Kim JH, Kim HJ et al (2013). Pyruvate administration reduces recurrent/moderate hypoglycemia-induced cortical neuron death in diabetic rats. *PLoS One*; 8: 1-15.
22. Choudhary P, Olsen B, Conget E, et al. (2016). Hypoglycemia Prevention and User Acceptance of an Insulin Pump System with Predictive Low Glucose Management. *Diabetes Technol Ther*; 5: 288-291.
23. Clarke DD; Sokoloff L. (1999). Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ; Agranoff BW; Albers RW; Molinoff SK; Fisher PB; Uhler MD. (Eds.), *Basic neurochem*. Lippincott-Raven,Philadelphia, pp. 637– 669.
24. Cox DJ; Kovatchev, BP; Gonder-Frederick LA; Summers KH; McCall A; Grimm KJ; Clarke WL. (2005). Relationships between hyperglycemia and cognitive performance among adults with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 28: 71–77.
25. Cryer PE (2006). Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest*; 116: 1470-1473.

26. Dave KR, Tamariz J, Desai KM et al (2011). Recurrent hypoglycemia exacerbates cerebral ischemic damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Stroke*; 42: 1404-1411.
27. Delint-Ramírez I, Salcedo-Tello P and Bermúdez-Rattoni F (2008). Spatial memory formation induced recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J Neurochem*; 106:1658-1668.
28. De la Cadena SG, Hernández-Fonseca K, Camacho Arroyo, Massieu L. (2014). Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis*; 3: 414-427.
29. Donnelly LA, Morris AD, Frier BM, et al (2005). Frequency and predictors of hypoglycaemia in Type 1 and insulin-treated type 2 Diabetes: A population-based study. *Diabet Med*; 22: 749-755.
30. Dringen R, Gutterer JM and Hirrlinger J(2000). Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*; 16: 4912-4916.
31. Duelli R, Kuschinsky W (2001). Brain glucose transporters: Relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*. 16; 71-76.
32. Ennis K; Tran P; Seaquist ER; Rao R. (2008). Postnatal age influences hypoglycemia-induced neural injury in the rat brain. *Brain Res*. 1224: 119-126.
33. Franchini S, Comegna L, Prezioso G, et al (2016). Hypoglycemia in children with type 1 diabetes: unawareness is a concrete risk. *Curr Med Res Opin*; 32: 1487-1491.
34. Frier BM (2014). Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*; 10: 711-722.
35. Fujioka M, Okuchi K, Hiramatsu K, et al. Specific changes in human brain after hypoglycemic injury. *Stroke* 1997; 28: 584–587.
36. Gerónimo-Olvera, Montiel T, Rincón-Heredia R, Castro-Obregón S, Massieu L. (2017). Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis*. 8: 299.
37. Gluck MR, Javattilleke E, Shaw S, Rowan A, Haroutnian V. (2000). CN oxidative stress associated with kainic acid rodent model of experimental epilepsy. *Epilepsy Res*. 39, 63-71.
38. Gold A, Macleod K, Deary I, et al.(1995). Hypoglycemia-induced cognitive dysfunction in diabetes mellitus: effect of hypoglycemia unawareness. *Physiol Behav*; 58: 501–511.
39. Dave KR; Tamariz J; Desai KM; Brand FJ; Liu A; Saul I; Bhattacharya SK;Pileggi(2011). A Recurrent hypohlycemia exacerbates ischemic damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Stroke*. 1404-1411.
40. Dave KR; Pileggi A; Raval AM. (2011). Recurrent hypoglycemia increases oxygen glucose deprivation-induced damage in hippocampal organotypic slices. *Neurosci Lett*. 496:25-29.
41. Forvergrova J Katsura K, siesjo B. (1996). Glycogen accumulated in the brain following insults is not degraded during a subsequent period of ischemia.*J Neurol Sci*; 1: 7-13.
42. Frier B, Fisher B. (2007). Hypoglycemia in Clinical Diabetes. NY. Jhon Wiley.
43. Frier B. (2014). Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*. 12: 711-22.

44. Gold AE; MacLeod KM; Deary IJ; Frier BM. (1995). Hypoglycemia-induced cognitive dysfunction in diabetes mellitus: Effect of hypoglycemia unawareness. *Physiol Behav.* 58: 501-511.
45. Güemes M, Hussain K. Hyperinsulinemic hypoglycemia (2015). *Pediatr Clin North Am.* 62: 1017-36.
46. Guettier JM; Gorden P. (2006). Hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Ame.* 35: 753-766.
47. Haces ML; Hernández-Fonseca K; Medina-Campos ON; Montiel T; Pedraza-Chavarri J; Massieu L. (2008). *Experimental Neurology.* 211: 85-96.
48. Haces ML; Montiel T; Massieu L. (2010). Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neurosci.* 165: 28-38.
49. Halliwell B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now?. *J of Neurochem.* 97: 1634- 1658.
50. Harati Y. (1996). Diabetes and the nervous system. *Endocrinol Metabol Clin North Am.* 2: 325-359.
51. Heller S, Colagiuri S, Vaaler S, et al (2004). Hypoglycaemia with insulin aspart: a doubleblind randomised, crossover trial in subjects with Type 1 diabetes. *Diabet Med*; 21: 769–775.
52. Herzog R, Chan O, Yu S et al. (2008). Effect of acute and recurrent hypoglycemia on changes in brain glycogen concentration. *Endocrinology*; 4: 1499-504.
53. Jensen VF, Bogh IV and Lykesfeldt J (2014). Effect of insulin-induced hypoglycemia on the Central Nervous System: Evidence from experimental studies. *J Neuroendocrinol*; 26: 123-150.
54. Julio Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, et al. Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 851-860

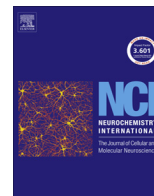
55. Kalimo H; Auer RN; Siesjo BK. (1985). The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. III. Light and electron microscopic findings in the rat caudado-putamen *Neuropathol.* 37-50.
56. Kho AR, Choi BY, Kim JH, et al.(2016). Prevention of hypoglycemia-induced hippocampal neuronal death by N-acetyl-L- Cysteine (NAC) *Amino acids*; 49:367-378.
57. Khowaja A, Choi I, Seaquist E, et al (2015). In vivo magnetic resonance spectroscopy of cerebral glycogen metabolism in animals and humans. *Metab Brain Dis*; 30: 255-261
58. Kirchhoff BA, Jundt DK, Doty T, et al (2016). A longitudinal investigation of cognitive function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* ; 12414: 1-7.
59. Klein JP; Waxman SG (2003) The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet Neurology.* 2: 548-
60. Kong J, Shepel P, Holden C, et al (2002). Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci*; 13: 5581-7.

61. Kumagai AK, Kang YS, Boado R et al., (1995). Upregulation of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes*; 12: 1399-404.
62. Kumar P, Rao N, Bhusan Pal B, et al.(2014). Hyperglycemia-induced oxidative stress induces apoptosis by inhibiting PI3-kinase/Akt and ERK 1/2 MAPK mediated signaling pathway causing downregulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*; 53: 302-319.
63. La Manna JC; Harik SI. (1985). Regional comparisons of brain glucose influx. *Brain Res.* 326: 299-305.
64. Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, et al (2013). Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int* 63: 331-343 .
65. Lee DH; Chung MY; Lee JU; Kang DG; Paek YW. (2000). Changes in glucose transporters in the cerebral adaptation to hypoglycemia. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 47: 15-23.
66. Lewitt MS; Baxter RC. (1991). Insulin- like growth factor- binding protein-1: A role in glucose counterregulation?. *Mol cell endocrinol.* 79: 147-152.
67. Lin YY; Hsu Ch; Sheu W; Chu S; Wu C; Tsai S. (2010). Risk factors for recurrent hypoglycemia induced in hospitalized diabetic patients admitted for severe hypoglycemia. *Yonsei Med J.* 51: 367- 374.
68. Magistretti PJ, Pellerin L(1999).Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain.
69. Magistretti PJ, Allaman I. A celular perspective on brain energy metabolism and funcitonal imaging (2015) *Neuron*; 86: 883-901.
70. Martín-Timón I, Del Cañizo-Gómez F. (2015). Mechanisms of hypoglycemia unawareness and implications in diabetic patients. *World J diabetes.* 7; 912:26.
71. McGrowder DA, Anderson-Jackson L and Crawford T (2013). Biochemical evaluation of oxidative stress in: Escher AP and Li A (eds) *Type 1 Diabetes.* Intech, pP. 223-248
72. Mc Gowan 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.
73. Mc Nay EC; Sherwin RS. (2004).Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes.* 53: 18-425.
74. Mc Nay EC; Williamson A; Mc Crimmon R; Sherwin RS. (2006). Cognitive and neural hippocampal effects of long-term moderate recurrent hypoglycemia *Diabetes.* 55: 1088-1095.
75. Mc Nay CE; Cotero VE. (2010). Minireview: Impact of recurrent hypoglycemia on cognitive and brain function. *Physiol Behav.* 100: 243-238.
76. McNeilly AD, Gallagher JR, Dinkova-Kostova AT, et al (2016) Nrf2-mediated neuroprotection against recurrent hypoglycemia is insufficient to prevent cognitive impairment in a rodent model of Type 1 diabetes. *Diabetes*; 65: 3151-3160.
77. Melov S. (2002). Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Journal of Biochem Cell Biol.* 34: 1395-1400.
78. Namagatsu S, Sawa H, Kamada K, et al. (1993). Neuron-glucose specific transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter RGT3) in rat central nervous. *FEBS*; 3:289:295.

79. Nehlig A; Pereira de Vasconcelos A. (1993). Glucose and ketone bodie utilization by the brain of neonatal rats. *Progress Neurobiol.* 40: 163-221.
80. Oe Y, Baba O, Ashida H, et al. (2016). Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia*; 9: 1532-45.
81. Osborne DM, O'Leary KE, Fitzgerald DP, et al (2016). Context-dependent memory following recurrent hypoglycaemia in non-diabetic rats is mediated via glucocorticoid signaling in the dorsal hippocampus. *Diabetologia*; 60: 182-191.
82. Öz G, Kumar A, Rao J, et al (2009). Human brain glycogen metabolism during and after hypoglycemia. *Diabetes*; 58: 1978-1985
83. Patočková J; Marhol P; Tumova E; Krsiak M; Rokyta R; Stípek S; Crkovska J; Andel M. (2003). Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin with hypoglycemia. *Physiol. Res* 52: 131-135.
84. Perantie DC, Lim A, Wu J, et al (2008). Effects of prior hypoglycemia and hyperglycemia on cognition in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*; 9:87-9
85. Puente EC, Silverstein J, Bree AJ, et al (2010). Recurrent moderate hypoglycemia ameliorates brain damage and cognitive dysfunction induced by severe hypoglycemia. *Diabetes*; 59: 1055-1062.
86. Qutub AA; Hunt CA. (2005). Glucose transport to the brain: A system model. *Brain Research Reviews.* 49: 595-617.
87. Rhaman S, Senniappan S, Sherif M, Tahir S, Hussain K (2015). Dipeptidyl peptidase 4 expression in pancreatic tissues from patients with congenital hyperinsulinism. *In J Clin Exp Pathol.* 8.199-208.
88. Radi R.(2013) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res*; 46: 550–559.
89. Rao A, Quach H, Smith E, et al(2014). Changes in ascorbate, glutathione and α -tocopherol concentrations in the brain regions during normal development and moderate hypoglycemia in rats. *Neurosci Lett*; 568: 67-71.
90. Reagan LP. (2012). Diabetes as a chronic metabolic stressor: Causes. Consequences and clinical complications. *Exp Neurology.* 233: 68-78.
91. Reyes R, Cittolin-Santos G, Kim J, et al (2016). Neuronal glutathione content and antioxidant capacity can be normalized *In Situ* by N-acetyl Cysteine concentrations attained in human cerebrospinal fluid. *Neurotherapeutics*; 13: 217-225.
92. Rich L, Brown A. (2016). Glycogen: multiple roles in the CNS. *The Neuroscientist*; pii: 1073858416672622. [Epub ahead of print]
93. Sánchez-Chávez G, Hernández-Berrones J, Luna-Ulloa LB, et al (2008). Effect of diabetes on glycogen metabolism in rat retina. *Neurochem Res*; 33: 1301-1308
94. Sandberg M; Nystrom B; Hamberger A. (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: In vivo dialysis of the rat hippocampus. *J neurochem.* 47: 178-184.
95. Sandoval DA, Ertl AC, Richardson MA, et al(2003). Estrogen blunts neuroendocrine and metabolic responses to hypoglycemia. *Diabetes*;52:1749–55.
96. Singh P; Jain A; Kaur G. (2004). Impact of hypoglycemia and diabetes on SNC: Correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem.* 260: 153-169.
97. Sotres-Bayón F, Sierra-Mercado D, Pardilla-Delgado, et al (2012). Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron*; 76: 804-812.

98. Strachan MW; Ewing FM; Deary IJ, Frier B. (2001). Recovery of cognitive function and mood after severe hypoglycemia in adults with insulin-treated diabetes. *Diabetes Care*. 23:305–12
99. Suh SW; Aoyama K; Chen Y; Garnier P; Matsumori Y; Gum E; Liu J; Swanson R. (2003). Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly (ADP-Ribose) Polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci*. 23: 10681-10690.
100. Suh SW; Aoyama K; Matsumori Y; Liu J; Swanson RA. (2005). Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes*. 54: 1452-1458.
101. 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: 910-918.
102. Suh SW; Hamby AM; Swanson RA. (2007). Hypoglycemia, brain energetics and hypoglycemic neuronal death. *Glia*. 55: 1280-1286.
103. Suh SW; Hamby AM; Gum ET; Shin BS; Won SH; Shelton CT; Chan PK; Swanson RA. (2008). Sequential release of nitric oxide, zinc and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28:1697- 1706.
104. Swanson RA, Morton MM, Sagar SM, et al. (1992). Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography. *Neurosci* 51(2):451–61
105. Tkacs NC; Pan Y; Raghupathi R; Dunn- Meynell A; Levin B. (2005). Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 25: 1645-1655.
106. Tesfaye N; Seaquist ER. (2010). Neuroendocrine responses to hypoglycemia. *Ann NY Acad Sci*. 1212: 12-28.
107. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM.(2017). Central regulation of glucose homeostasis. *Compr Physiol*. 2: 741-764.
108. Uehara Y, Nipper V and McCall (1997). Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons. *Am J Physiol*; 272: 716-719
109. Ullery C and Marnett LJ (2012). Protein modification by oxidized phospholipids and hydrolytically released lipid electrophiles: Investigating cellular response. *Biochim Biophys Acta*; 1818: 2424-2442.
110. Vannucci SJ; Maher F; Simpson IA. (1997). Glucose transporter proteins in brain: Delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. 21: 2-21.
111. Vannucci RC; Vannucci SJ. (2000). Glucose metabolism in the developing brain. *Seminars in perinatology*. 24, 107-115.
112. Villafuerte-Quipe B, Frías M, Martín R, Valverde Y, Álvarez M, Barrio R. (2017). Effectiveness of MiniMed 640G with SmartGuard System for prevention of hypoglycemia in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Diabetes Nutriol*; 64: 198-203.
113. Wieloch T. (1985). Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-Methyl-D- Aspartate antagonist. *Science*. 230: 681-683.
114. Wrighten SA; Piroli G; Grillo C; Reagan L. (2009). A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1792: 444-453.
115. Won SJ; Yoo BH; Kauppinen TM; Choi BY; Kim JH; Jang BG; Lee MW; Sohn M; Liu J; Swanson RA; Suh SW (2012). Recurrent/moderate hypoglycemia

- induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. *Journal of Neuroinflammation*. 9: 1-45.
116. Yamada KA; Rensing N; Izumi Y; De Erasquin GA; Gazit V; Dorsey DA; Herrera D. (2004). Repetitive hypoglycemia in young rats impairs hippocampal long-term potentiation. *Pediat Res*. 55: 372-379.
117. Zhou D; Qian J; Chang H; Xi B. (2012). Pyruvate administered to newborn rats with insulin-induced hypoglycemic brain injury reduces neuronal death and cognitive impairment. *Eur J. Pediatr*. 171: 103-109.
118. Zigmond, Bloom, Landis, Roberts, Squire. (1999). *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. pp. 1600.



Invited review

Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view



Gabriela Languren, Teresa Montiel, Alberto Julio-Amilpas, Lourdes Massieu*

Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 04510, AP 70-253, México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2013

Received in revised form 28 June 2013

Accepted 30 June 2013

Available online 20 July 2013

Keywords:

Cognitive impairment

Excitotoxicity

Hypoglycemia

Insulin

Selective neuronal death

Oxidative stress

ABSTRACT

The aim of the present review is to offer a current perspective about the consequences of hypoglycemia and its impact on the diabetic disorder due to the increasing incidence of diabetes around the world. The main consequence of insulin treatment in type 1 diabetic patients is the occurrence of repetitive periods of hypoglycemia and even episodes of severe hypoglycemia leading to coma. In the latter, selective neuronal death is observed in brain vulnerable regions both in humans and animal models, such as the cortex and the hippocampus. Cognitive damage subsequent to hypoglycemic coma has been associated with neuronal death in the hippocampus. The mechanisms implicated in selective damage are not completely understood but many factors have been identified including excitotoxicity, oxidative stress, zinc release, PARP-1 activation and mitochondrial dysfunction. Importantly, the diabetic condition aggravates neuronal damage and cognitive failure induced by hypoglycemia. In the absence of coma prolonged and severe hypoglycemia leads to increased oxidative stress and discrete neuronal death mainly in the cerebral cortex. The mechanisms responsible for cell damage in this condition are still unknown. Recurrent moderate hypoglycemia is far more common in diabetic patients than severe hypoglycemia and currently important efforts are being done in order to elucidate the relationship between cognitive deficits and recurrent hypoglycemia in diabetics. Human studies suggest impaired performance mainly in memory and attention tasks in healthy and diabetic individuals under the hypoglycemic condition. Only scarce neuronal death has been observed under moderate repetitive hypoglycemia but studies suggest that impaired hippocampal synaptic function might be one of the causes of cognitive failure. Recent studies have also implicated altered mitochondrial function and mitochondrial oxidative stress.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	332
2. Counterregulatory endocrine response to hypoglycemia	332
3. Severe hypoglycemia	333
3.1. Factors involved in neuronal damage induced by severe hypoglycemia	334
3.2. Effects of alternative energy substrates on hypoglycemic brain damage	334
3.3. Impaired cognitive function associated with severe hypoglycemia	335
4. Hypoglycemia without isoelectricity	337
4.1. Recurrent hypoglycemia: neuronal death and oxidative stress	338
4.2. Recurrent hypoglycemia and cognitive impairment	338
5. Treatments for glycemic control and strategies to prevent hypoglycemia	339
6. Conclusions	340
Acknowledgments	340
References	340

Abbreviations: Et, ethidium; FJB, fluorojade-B; GR, glutathione reductase; GPx, glutathione peroxidase; MnSOD, manganese-dependent superoxide dismutase; NOX, NADPH oxidase; GSSG, oxidized glutathione; PARP-1, poly-(ADP ribose) polymerase-1; ROS, reactive oxygen species; GSH, reduced glutathione.

* 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).

1. Introduction

The brain is a dynamic organ requiring a great amount of energy. Despite it corresponds to only 2% of the total body weight, it consumes 20% of the basal body metabolic rate (Attwell and Laughlin, 2001). The main energy substrate for brain is glucose, which is transported across the blood–brain barrier by facilitated diffusion. The main glucose transporters in the central nervous system (CNS) are GLUT1 and GLUT3. GLUT1 is present in 2 isoforms, a glycosylated isoform of 55 kDa located in microvessels, and the non-glycosylated isoform of 45 kDa located in neurons, astrocytes and microglia. The high affinity glucose transporter, GLUT3, has a higher catalytic capacity and is mainly present in neurons (Simpson et al., 2007, 2008). The physiological blood glucose levels vary between 70 and 110 mg/dl (or 3.9–6.1 mM; 1 mM = 18 mg/dl) and they are strictly regulated by endocrine responses. However, fluctuations in blood glucose concentration occur as a consequence of diverse causes. The most common cause of a reduction in blood glucose levels (hypoglycemia) is the intensive use of insulin or insulin releasing drugs for the treatment of diabetic patients. The presence of an insulinoma and defective hormonal secretion of glucagon and growth hormone are also causes of hypoglycemia (Cryer et al., 2003; Tesfaye and Seaquist, 2010).

Nowadays diabetes is one of the most relevant metabolic disorders for public health due the worrying increase of diabetic cases all over the world. According to the International Diabetes Federation nowadays there are 371 million of people living with diabetes all over the world and this number is expected to increase to 552 million by 2013. Diabetes is characterized by the failure in the production or the response to endogenous insulin. There are 2 types of diabetes: type 1 diabetes is produced by the loss of β pancreatic cells, which secrete insulin whereas type 2 diabetes is the consequence of decreased insulin response (resistance) accompanied by failure of β pancreatic cells (Wright et al., 2009).

Moderate hypoglycemia is present when blood glucose falls to 60–40 mg/dl; in the most extreme case, severe hypoglycemia is produced when blood glucose declines below 40 mg/dl. Severe hypoglycemia can lead to coma, characterized by unconsciousness and the cessation of the electrical brain activity (flat electroencephalogram or isoelectric period), which might induce permanent neuronal damage and even death if not promptly corrected by glucose infusion (Kalimo and Olsson, 1980).

During the last decades, the intensive use of insulin or other drugs that stimulate insulin secretion as the main treatment to prevent hyperglycemia and its long-term vascular associated complications has resulted in an increase in the incidence of hypoglycemia in diabetic patients (*Diabetes Control and Complications Trial (DDCT)*, 2006; Steil et al., 2006). Devices to continuously monitor glucose blood levels and to optimize the delivery of insulin or insulin analogues have not succeeded in completely preventing the occurrence of repeated episodes of hypoglycemia, despite their success in reducing hyperglycemia (Fatourehchi et al., 2009; Yeh et al., 2012, see Section 5 in the present review). Therefore, nowadays hypoglycemia remains to be major a complication of insulin therapy.

2. Counterregulatory endocrine response to hypoglycemia

In certain conditions the brain can use other substrates to obtain energy such as lactate, pyruvate and ketone bodies, but glucose remains the main brain energy substrate (Béllanger et al., 2011; Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993; Shety et al., 2012; Vannucci and Vannucci, 2001 see Section 3.2). Thus, blood glucose concentrations are highly regulated by endogenous mechanisms, known as the counterregulatory endocrine response,

triggered whenever hypoglycemia is present to keep blood glucose levels in the physiological range.

When blood glucose decreases below 70 mg/dl a series of mechanisms takes place in order to counterbalance glucose decline. The first response is the suppression of insulin release from β pancreatic cells when glucose concentration reaches 67 mg/dl. If glucose decreases further to 54 mg/dl the secretion of glucagon from pancreatic cells and epinephrine from the adrenal medulla is stimulated. Glucagon is a hormone produced in pancreatic cells, which increases plasma glucose levels by the stimulation of hepatic glucose production through glycogenolysis (degradation of glycogen to glucose) and gluconeogenesis (synthesis of glucose from pyruvate). Epinephrine also increases glycogenolysis and gluconeogenesis in the liver, stimulates lipolysis in adipose tissue and decreases insulin secretion while it elevates glucagon release from the pancreas. The secretion of two other hormones contributes to the counterregulatory response, growth hormone and cortisol, secreted at plasma glucose concentrations below 66 mg/dl. These hormones stimulate lipolysis in adipose tissue and ketogenesis and gluconeogenesis in the liver. The action of these hormones is slower and takes part in the response to long lasting hypoglycemia such as prolonged fasting or starvation (Beall et al., 2012; Cryer et al., 2003; Cryer, 2006; Tesfaye and Seaquist, 2010).

Two different groups of symptoms for hypoglycemia have been described. The first group includes sympathoadrenal or neurogenic symptoms, resulting from the activation of the autonomous nervous system and the release of norepinephrine and epinephrine, and includes sweating, hunger, tingling, palpitations, tremor and anxiety. These symptoms are critical for the perception of the hypoglycemic state. The neuroglycopenic symptoms (resulting from brain glucose deprivation), occur when the levels of glucose in blood fall to 2.5–3.5 mM (45–63 mg/dl) and include confusion, blurred vision, dizziness, irritability, difficulty to speak, feeling faint, drowsiness, difficulty of thinking, seizures and coma (Cryer, 2007; De Galan et al., 2006; Tesfaye and Seaquist, 2010; Warren and Frier, 2005).

It has been proposed that recurrent hypoglycemia or even one antecedent episode of hypoglycemia induces the failure of the counterregulatory hormonal response (Cryer et al., 2003; Cryer, 2006; Lin et al., 2010), leading to a vicious cycle and increasing the risk of severe hypoglycemia. In this case, the patients are unable to recognize the sympathoadrenal symptoms of hypoglycemia until the neuroglycopenic symptoms are present leading to hypoglycemia unawareness. Thus, recurrent hypoglycemia reduces the glucose levels that trigger the counterregulatory autonomic response during a subsequent hypoglycemic period. Hypoglycemia unawareness and failure in the autonomic response lead to the so-called hypoglycemia-associated autonomic failure (HAAF), which increases 25-fold or more the risk of severe hypoglycemia, which can culminate in coma, irreversible brain damage and even in the death of the patient (White et al., 1983; Cryer et al., 2003; Cryer, 2007). Clinical data suggests that about 25% of diabetic patients suffer from hypoglycemia unawareness (Geddes et al., 2008).

Hypoglycemia is recognized as a decline in blood glucose to levels below 50 mg/dl accompanied with neuroglycopenic symptoms, or below 40 mg/dl in the absence of symptoms. Severe hypoglycemia is recognized when assistance for treatment is needed (American Diabetes Association Work-group on Hypoglycemia, 2005). Hyperinsulinemia resulting from the continuous administration of insulin or insulin releasing drugs induces glucose uptake in fat, muscle and liver, inhibiting gluconeogenesis and glycogenolysis, as well as lipolysis and glucagon secretion from pancreatic cells. As a consequence, the first response to hypoglycemia (inhibition of insulin secretion) is lost and glucagon secretion suppressed. In addition, epinephrine secretion occurs at lower blood glucose levels (Beall et al., 2012).

Hypoglycemia is common in type 1 diabetic patients with a tight glycemic control and in advanced type 2 diabetic patients (Heller et al., 2007; Seaquist et al., 2013). Several studies have reported that 25–30% of diabetic patients suffer from hypoglycemic episodes, being more frequent in type 1 than type 2 diabetics (UK Hypoglycemia Study Group, 2007; Donnelly et al., 2005). According to the studies from different groups the incidence of severe hypoglycemia for type 1 diabetic patients ranges from 1.1 to 1.6 episodes/patient/year and up to 0.35 episodes/patient/year in type 2 diabetics (see Table 1 and references therein). In the case of moderate hypoglycemia 1.8–2.0 episodes per week have been reported in type 1 diabetics (Table 1 and references therein). The incidence of hypoglycemic episodes is dependent on the age and disease duration (Pedersen-Bjergaard et al., 2004; Weinstock et al., 2013). A mortality rate of 4–10% attributable to severe hypoglycemia has been reported for type 1 diabetic patients with long duration disease (from 7 to 30 years) (Patterson et al., 2007; Jacobson et al., 2007; Feltbower et al., 2008; Skriverhaug et al., 2006).

3. Severe hypoglycemia

As already mentioned, severe hypoglycemia occurs when blood glucose levels decrease below 50–40 mg/dl. When blood glucose falls further to 20 mg/dl, irreversible brain damage can take place in vulnerable brain regions. According to histological studies, hypoglycemic coma in humans induces neuronal damage in the cortex, particularly the insular cortex, the hippocampus, the caudate and the putamen (Kalimo and Olsson, 1980). A study by Fujioka and collaborators (1997) investigated the specific changes in human brain after profound hypoglycemia (glucose blood levels <2.5 mmol/l) associated with diabetes, through computerized tomography and magnetic resonance imaging (MRI), and reported lesions in the cortex, specifically in parietal-occipital and insular cortices, substantia nigra, hippocampus and the basal ganglia. Another study using MRI reported cortical atrophy

in 45% of type 1 diabetic patients with a history of recurrent severe hypoglycemia, while no changes were found in patients without repetitive severe hypoglycemia (Perros et al., 1997). Cortical atrophy was present in all cerebral lobes, but predominantly in the occipital and parietal lobes in one patient. Recent studies using MRI have reported lesions in the cortex (temporal, parietal, and occipital lobes), insula, hippocampus, putamen and caudate nucleus, in severely hypoglycemic diabetic individuals (Aoki et al., 2004; Ma et al., 2009; Lee et al., 2010). Lesions in the white matter were also identified in some patients (Ma et al., 2009). A recent study reported the long-term effects of hypoglycemia on brain structure in a type 1 diabetic patient experiencing multiple severe hypoglycemic episodes throughout life. Reduced grey matter volume in the hippocampus, thalamus and pallidum as compared to controls was observed through MRI. Significantly reduced white matter volume was also observed (Kirchhoff et al., 2013). Studies in children have reported similar results. Ho and collaborators (2008) in an MRI study, showed brain abnormalities in children with severe hypoglycemia particularly in the hippocampus. Also, a decrease in the gray matter volume was observed in comparison with children without hypoglycemic episodes.

Data from pioneer studies by Siesjo and collaborators in experimental animals are in agreement with the above-mentioned observations (Auer et al., 1985a,b; Kalimo et al., 1985). These studies clearly showed that insulin treatment leading to the reduction in blood glucose to levels below 20 mg/dl and a 30–60 min period of isoelectricity induces neuronal death in a selective manner. A positive correlation between the duration of the isoelectric period and the spread of neuronal damage was found. According to these studies the most vulnerable brain regions to hypoglycemic damage include the 2 and 3 superficial layers of the cerebral cortex, CA1, the subiculum and the dentate gyrus, in particular the crest of the dentate gyrus. In addition, neuronal damage was observed in the striatum, particularly in the dorsolateral region.

Table 1
Prevalence of hypoglycemia in diabetic patients according to some studies.

Reference and year	Treatment or cause	Type of hypoglycemia	Population	Frequency of hypoglycemia (e/p/y)	Total number of patients	Frequency (% patients with hypoglycemia)
Diabetes Control and Complications Trial (DDCT) (2006)	Intensive	Severe	Canada and North America	1.6*	711	38%
	Conventional	Severe		0.62*	730	15%
Pramming et al. (1991)	Insulin (injections)	Severe Moderate	Denmark	1.5* 1.6*, #	411	36%
Stahl and Berger (1999)	Sulfonylureas (Glibenclamide s.a)	Severe	Switzerland	0.002**	594	–
	Sulfonylureas (Glicazide l.a)	Severe	Switzerland	0.00085**	196	–
Leese et al. (2003)	Insulin (Injections)	Severe	United Kingdom	0.11*	908	7.7%
	Sulfonylurea (Oral)	Severe	United Kingdom	0.009**	835	7.87%
Pedersen-Bjergaard et al. (2004)	Insulin (Injections)	Severe	Denmark	1.3*	1076	36.7%
		Severe & Moderate		0.35* 2.0* #		
Donnelly et al. (2005)	Insulin (Injections)	Severe	Scotland	1.15*	9	2.67%
		Moderate		42.89*	336	28.57%
	Insulin (Injections)	Severe	Scotland	0.35**	5	2.11%
UK Hypoglycemia Study Group, Heller et al. (2004)	Insulin (Injections)	Moderate		16.36**	236	73.30%
		Severe	United Kingdom	1.1*	46	22%
	Sulfonylurea (Oral)	Moderate	United Kingdom	35.5*	46	87%
Weinstock et al. (2013)	Insulin (Injections)	Severe	United Kingdom	0.1**	103	7%
		Moderate		1.92**	103	39%
	Insulin pump	Severe &	United States	1* 1*	4973 2596	11.8% 10.6%

* Type 1 diabetes.

** Type 2 diabetes, e/p/y episodes/patient/year.

Episodes/patient/week, & with coma or seizures, s.a slow acting insulin analogue, l.a long acting insulin analogue.

3.1. Factors involved in neuronal damage induced by severe hypoglycemia

Many factors have been implicated in neuronal death induced by severe hypoglycemia. Pioneer studies suggested that neuronal damage resulted from an excitotoxic process initiated by the release of glutamate and particularly aspartate, at the onset of isoelectricity (Sandberg et al., 1986). Moreover, the administration of antagonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the non-NMDA glutamate receptor subtypes, and the elimination of glutamatergic cortical afferents to the striatum, reduced cell death in hypoglycemic rats (Butcher et al., 1987a,b; Nelligard and Wieloch, 1992; Sandberg et al., 1986; Wieloch, 1985). More recent studies by Swanson and collaborators have identified other contributors to the hypoglycemic cell-death cascade such as the activation of poly(ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) and the release of zinc from nerve terminals (Suh et al., 2003, 2007, 2008). In addition, this group has shown that superoxide production by NADPH oxidase (NOX), mainly during glucose reintroduction, is implicated in neuronal death (Suh et al., 2007). According to these studies in neuronal cultures and in *in vivo* rodent models of hypoglycemia, neuronal damage is triggered after glucose reintroduction by nitric oxide production, which induces the release of vesicular zinc. Zinc translocates to postsynaptic neurons and activates NOX and PARP-1, leading to the production of reactive oxygen species (ROS), NAD⁺ depletion and neuronal death. The production of ROS by nitric oxide synthase and NOX induces damage to DNA and the consequent activation of PARP-1, which consumes NAD⁺ necessary for glucose oxidation through the glycolytic pathway.

In addition to oxidative damage, we have observed that ROS production by NOX after glutamate administration *in vivo*, contributes to the activation of the calcium-dependent protease, calpain (Gomez-Gamboa et al., 2011), which is a well-known executor of excitotoxic neuronal death (Siman et al., 1989). Moreover, in recent studies we have observed that glucose deprivation in hippocampal cultured neurons leads to ROS production through the activation of several enzymatic pathways, including NOX, xanthine oxidase and phospholipase A₂ (Páramo et al., 2010), which in turn contributes to calpain activation (Páramo et al., submitted). Furthermore, inhibition of calpain activity prevents neuronal damage suggesting a role of this protease in glucose deprivation-induced neuronal death (Páramo et al., submitted for publication). On the other hand, Suh and collaborators have recently suggested that an inflammatory response also participates in hypoglycemic cell damage because microglial reactivity is observed in the rat hippocampus from 1 to 7 days after a 30 min period of hypoglycemic isoelectricity (Won et al., 2012b).

Other studies have suggested the participation of an apoptotic mechanism in hypoglycemic cell death associated with the depolarization of the mitochondrial membrane, the opening of the mitochondrial permeability transition pore, the release of cytochrome c and caspase-3 activation, as observed mainly after glucose reintroduction in hypoglycemic rats exposed to isoelectricity (Ouyang et al., 2000; Ferrand-Drake et al., 1999, 2003; Friberg et al., 1998). In addition, activation of calpain was observed 3 h after glucose reintroduction in animals suffering from insulin-induced hypoglycemic coma (Ferrand-Drake et al., 2003). Altogether, these observations suggest the contribution of multiple factors to neuronal death associated with severe hypoglycemia. Fig. 1 summarizes the different components of the hypoglycemic neuronal death cascade and their time-course of occurrence according to different studies.

The consequences of severe hypoglycemia have also been investigated in the diabetic condition. With this purpose several laboratories have relayed on diabetic animal models employing streptozotocin administration, a drug that destroys the insulin-

producing β -pancreatic cells. These studies have shown that brain damage induced by the hypoglycemic coma is more pronounced in the diabetic condition. Bree and collaborators (2009) showed that insulin-induced severe hypoglycemia in normal animals elicited brain damage in the cortex, CA1 and CA3 hippocampal regions, and that the diabetic condition increased the vulnerability to neuronal death of these specific brain areas. These results suggest that diabetes can be a critical factor aggravating neuronal damage in central nervous system disorders such as hypoglycemia. The mechanisms responsible for exacerbated hypoglycemic damage due to diabetes remain to be determined.

3.2. Effects of alternative energy substrates on hypoglycemic brain damage

Energy failure is also a crucial factor for neuronal death induced by the hypoglycemic condition. Even though glucose is the main energy substrate for brain, other energy substrates can be consumed in certain circumstances such as prolonged fasting, during the suckling period and upon severe hypoglycemia (Bélanger et al., 2011; Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993; Shety et al., 2012; Vannucci and Vannucci, 2001). Suh et al. (2005) demonstrated that pyruvate intraperitoneal administration at concentrations high enough to penetrate the brain simultaneously with glucose, markedly prevented neuronal death induced by 30 min of isoelectricity in the more vulnerable brain areas such as CA1, the subiculum, the dentate gyrus and the perirhinal cortex. Moreover, pyruvate administration also prevented cognitive impairment in these animals (see Section 3.2). Recently, Zhou and collaborators (2012) showed similar results. Sodium pyruvate plus glucose was intraperitoneally administered to terminate insulin-induced hypoglycemia in newborn rats at postnatal days, 2, 4 and 6. Treatment reduced the number of degenerating cells in the parasagittal and piriform cortices, the thalamus, the hypothalamus and the dentate gyrus. Moreover, cognitive function was also improved by pyruvate treatment in these animals as tested at 6 weeks of age (see Section 3.2). Consistent with these findings we have previously observed that pyruvate reduces glutamate neurotoxicity administered in conditions of energy failure, induced by the inhibition of the mitochondrial electron transport chain or the glycolytic pathway in *in vivo* and *in vitro* studies (García and Massieu, 2003; Massieu et al., 2000, 2001).

On the other hand, several studies have suggested that lactate produced in glial cells is released and transported to neurons where it can be used as a metabolic substrate during high-energy demand (Belanger et al., 2011; Pellerin and Magistretti, 1994; Pellerin, 2010). Based on this hypothesis, Won and collaborators (2012a) showed that intraperitoneal injection of lactate in combination with glucose infusion to hypoglycemic rats experiencing 30 min of isoelectricity, notably reduces neuronal death in CA1, the subiculum and the dentate gyrus. In addition, it was observed that ROS production in CA1 was prevented by lactate administration. Lactate treatment also prevented neuronal death and the production of ROS induced by glucose deprivation in cortical cultured neurons.

In addition to pyruvate and lactate, the ketone bodies, acetoacetate and β -hydroxybutyrate are important brain energy substrates during prolonged fasting and during the suckling period in mammals (Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993; Owen et al., 1967). It has been shown that immature rats fed with a ketogenic diet that elevates plasma levels of β -hydroxybutyrate, show reduced neuronal damage induced by severe hypoglycemia in the cerebral cortex (Yamada et al., 2005). In addition, we have previously shown that administration of β -hydroxybutyrate prevents lipoperoxidation in hypoglycemic adult rats exposed to prolonged severe hypoglycemia (Haces et al., 2008). Acetoacetate and β -

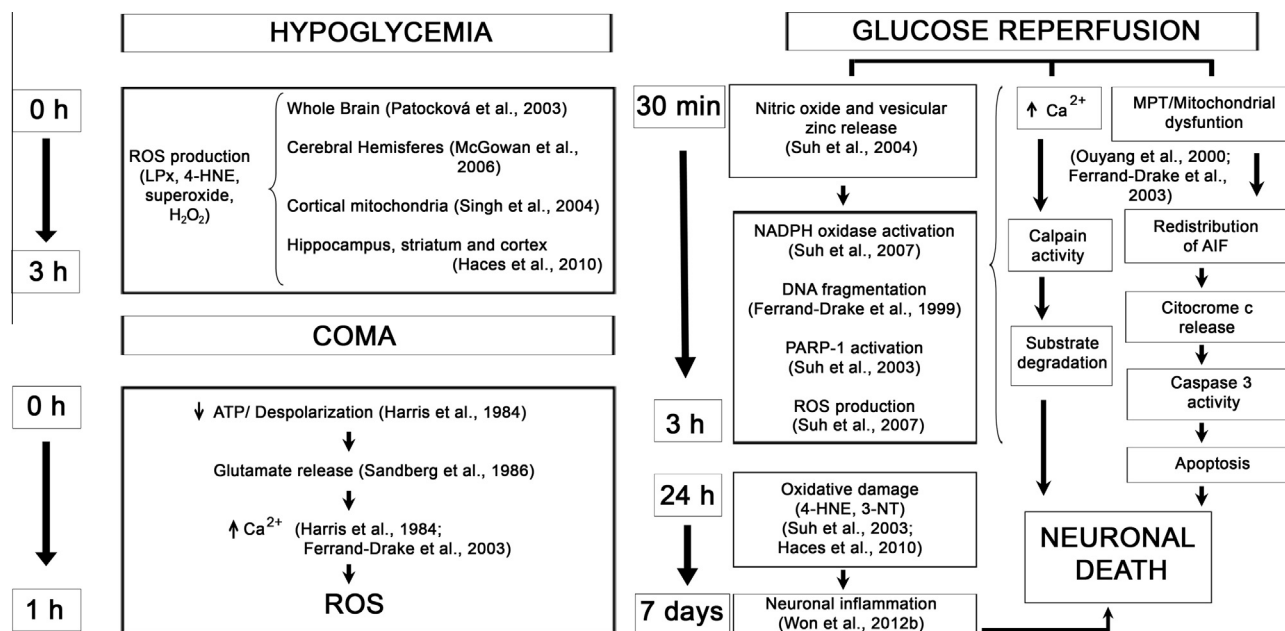


Fig. 1. Factors involved in neuronal death associated with severe hypoglycemia and their time-course of occurrence. Reactive Oxygen Species (ROS), Poly-(ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1), Mitochondrial permeability transition pore (MPT), Nitric Oxide Synthase (NOX), 3-Nitrotyrosine (3-NT), 4-Hydroxynonenal (4-HNE), Lipid peroxidation (LPx), Apoptosis Inducing Factor (AIF). (Refer the above mentioned references for further details).

hydroxybutyrate also reduced the death of cultured neurons exposed to mitochondrial or glycolysis inhibitors by a mechanism involving the restoration of ATP concentrations (García and Massieu, 2003; Haces et al., 2008; Massieu et al., 2003). These observations support the role of ketone bodies as energy substrates alternative to glucose. However, in a recent study Schutz et al. (2011) showed that β -hydroxybutyrate administration to 13-days old pups induced the death of oligodendrocytes and increased the mortality after resuscitation with glucose, possibly because of delayed onset of coma and prolongation of the hypoglycemic period.

The protective effect of these compounds has been attributed to their role as alternative substrates providing energy through the conversion to acetyl-CoA and their incorporation into the citric acid cycle, however, ketone bodies also exert an antioxidant activity acting as ROS scavengers (Haces et al., 2008). Similarly, pyruvate protection might be explained by its H_2O_2 scavenging capacity (Desagher et al., 1997). A recent study in humans by Page and coworkers (2009) showed the effect of fatty acid ingestion in diabetic type 1 patients during a hypoglycemic episode. Medium-chain triglycerides were given orally to patients during the hypoglycemic episode (180 min), and afterwards they were evaluated in a cognitive task battery. Results showed that ingestion of medium-chain triglycerides elevated the levels of free fatty acids and β -hydroxybutyrate in blood and prevented the cognitive deficit observed during hypoglycemia, in tests of digit symbol coding, map searching, and verbal memory. This study also showed that *in vitro* synaptic activity was preserved in the presence of β -hydroxybutyrate in hippocampal slices incubated in low glucose, in agreement with previous studies (Izumi et al., 1997). Altogether, the aforementioned observations suggest that other energy substrates can be used by brain during hypoglycemia in diabetic patients, which might offer a therapeutic alternative to prevent the cognitive decline occurring during hypoglycemic episodes.

Other actions of ketone bodies might contribute to their protective effect. Ma et al. (2007) reported that ketone bodies can activate ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) inducing membrane hyperpolarization and reducing neuronal firing (Ma

et al., 2007; Tanner et al., 2011). This mechanism has been suggested to contribute to the antiepileptic effect of ketone bodies. K_{ATP} channels are normally inhibited by intracellular ATP leading to the firing of action potentials. It is hypothesized that decreased glucose consumption in the presence of ketone bodies will lead to a reduction in glycolytic ATP production near the membrane, which will activate K_{ATP} channels hyperpolarizing the membrane and reducing excitability (Tanner et al., 2011). The contribution of this mechanism of action to the protective effect elicited by ketone bodies against neuronal death induced by severe hypoglycemia has not been explored. On the other hand, it has been recently demonstrated that ketone bodies inhibit chloride-dependent glutamate uptake into synaptic vesicles in neurons, and in turn reduce the release of glutamate. Inhibition of glutamate release by ketone bodies has been related to seizure suppression induced by 4-aminopyridine in an *in vivo* study (Juge et al., 2010). This mechanism might also contribute to the protective effect of ketone bodies against severe hypoglycemia-induced brain injury.

3.3. Impaired cognitive function associated with severe hypoglycemia

Many studies in humans and experimental animals have associated hypoglycemia with altered cognition, affecting complex more than simple cognitive skills modulated by the hippocampus. Xu and collaborators (2011) described a case report of a woman who suffered from severe hypoglycemia and profound neuroglycopenia, after the administration of 44 units of insulin leading to a fall of blood glucose levels to 1.7 mmol/l. The patient recovered the consciousness after 2 days, but showed difficulties in recognition, impaired time and place orientation and altered electroencephalogram activity deriving in mild encephalopathy without seizures. The main consequences in this case were the presence of neurological, cognitive and psychological sequelae, mainly difficulties in speech and a considerable alteration in memory, as observed 2 months after the hypoglycemic event; the Minimal State Examination remained with slow scores after 2 months. These data suggested permanent impaired cognitive function possibly accompanied by brain damage.

On the other hand, previous studies indicate that cognitive deterioration at different domains occurs in healthy individuals at blood glucose levels of 2.6–3.3 mmol/l (Amiel, 1998; Warren and Frier, 2005). The presence of severe hypoglycemia in diabetic and non-diabetic patients produces a decline in the performance of cognitive tasks such as the reaction time, verbal fluency, arithmetical ability and verbal and visual memory (Amiel, 1998; Maran et al., 2000; Widom and Simonson, 1990). According to several studies the decline in cognitive function is observed after the activation of the counterregulatory response and the presence of neuroglycopenic symptoms (Bakatselos, 2011). However, Evans and colleagues (2000) observed that the induction of hypoglycemia (blood glucose of 2.66 mM) to non-diabetic patients immediately altered cognitive function before the counterregulatory neuroendocrine response was initiated and symptoms perceived.

Several human studies have evaluated memory, logical reasoning and attention under hypoglycemic conditions in patients without diabetes, employing tasks such as the four choice reaction time [at blood glucose levels of 2.8–3.1 mmol/l] (Maran et al., 1995; Hopkins et al., 1997), stroop tests to evaluate attention [at blood glucose levels of 2.9–3.1 mmol/l], immediate and late recall [at glucose levels of 2.5 mmol/l], and finger tapping [blood glucose levels <2.2–2.4 mmol/l] (Fanelli et al., 1993). The data obtained indicate that cognitive abilities are differentially affected, since functions such as memory result more profoundly altered. In agreement, Sommerfield and collaborators (2003) showed that moderate hypoglycemia impairs memory functions in both healthy and diabetic adults. According to their observations, short-term memory is altered when blood glucose levels decline to 2.5 mmol/l.

It has been difficult to obtain reproducible results about altered attention as a consequence of hypoglycemia. Some studies in diabetic humans using the digit symbol substitution test have reported impaired performance in hypoglycemic individuals with blood glucose levels of 2.6 mmol/l, while other studies reported no impairment in individuals showing lower blood glucose levels [2.0 mmol/l] (Ewing et al., 1998; Wirsen et al., 1992). Discrepancies are likely explained by methodological differences, which make difficult to make comparisons between the studies. Difficulties in controlling the blood glucose levels of patients, might have also contributed to the variability of the results. On the other hand, Draelos and collaborators (1995) investigated the effect of hypoglycemia on different cognitive domains in diabetic adults using a battery of neuropsychological tests, which included sensory perceptual processing, language, learning and memory, attention and simple motor skills. They observed decreased performance in all the cognitive tests as evaluated at blood glucose concentrations of 2.2 mmol/l, particularly in attention and learning skills tests. These results are in agreement with those of Gold and collaborators (1995) who reported deterioration in attention and verbal memory in diabetic patients showing hypoglycemic episodes. In contrast, other studies did not find an impairment of functions such as fine motor speed, reaction time, reading comprehension, memory, logical reasoning, attention and intelligence in diabetic individuals (Holmes et al., 1986; Widom and Simonson, 1990; Jacobson et al., 2007).

Alterations in cognitive function due to hypoglycemia have been observed also in children. Ryan et al., 1990 evaluated the effect of hypoglycemia on cognitive function on diabetic children, using the insulin glucose clamp technique to preserve the hypoglycemic state. The cognitive evaluations were performed under hypoglycemic (3.1–3.6 mmol/l) and euglycemic (5.5 mmol/l) conditions. A significant decline in trail making test (mental flexibility), attention to retail and decision-making was observed during the mild hypoglycemic state (3.3–3.6 mmol/l). Recovery of the cognitive functions was not observed after restoration of euglycemia,

suggesting a long-term effect of mild hypoglycemia in attention and reaction time tests. Alterations in attention, intelligence, and memory, have also been reported in children experiencing severe hypoglycemia (Hannonem et al., 2003; Tupola et al., 2004; Hershey et al., 2005). According to data from the literature, hypoglycemia during childhood turns to be an essential factor affecting specific cognitive skills such as memory (Perantie et al., 2008). Overall, the above-mentioned observations suggest that memory, learning, intelligence and attention are the most vulnerable cognitive domains to hypoglycemia in children (Becker and Ryan, 2005; Blasetti et al., 2011).

The cognitive deficits described in many of the studies cited above might be mainly attributed to profound hypoglycemia and neuroglycopenia rather than permanent brain dysfunction or brain damage, because patients were tested during the hypoglycemic condition. In addition, no tomography or MRI data suggesting altered brain structure were included in these studies. A correlation between severe hypoglycemia, brain damage and cognitive decline has been difficult to establish because MRI is not routinely performed in patients admitted in the emergency department, severely affected by hypoglycemia, because the hypoglycemic condition is commonly transient and usually corrected by glucose administration. A few studies using MRI, however, have evaluated cognitive performance in diabetic patients suffering from recurrent hypoglycemia. Perros et al. (1997), reported cortical atrophy in a group of type 1 diabetic patients with a history of recurrent severe hypoglycemia, while no changes were observed in diabetic patients not suffering from repetitive severe hypoglycemia. However, no association between cortical atrophy and cognitive function was found, although a trend to show lower scores in the group with repetitive hypoglycemia was observed. However, the number of patients included in this study was very limited to be conclusive. A recent case report of a type 1 diabetic patient severely affected by multiple episodes of severe hypoglycemia, showed by MRI, a reduction in the grey matter volume in the hippocampus, thalamus and pallidum, which correlated with severe memory impairment and anterograde amnesia (Kirchhoff et al., 2013).

In agreement with the above-described observations, data from animal models of severe hypoglycemia have reported a significant decline in memory in rats 6 weeks after the induction of severe hypoglycemia (45 min of isoelectricity) (Suh et al., 2003). In this case, cognitive deficits can be directly attributed to brain damage since severe neuronal death was observed in the hippocampus of these animals. The authors also showed that PARP-1 inhibition reduced memory impairment, which correlated with the preservation of neurons in the hippocampus. Similarly, the administration of pyruvate in combination with glucose reduced the decline in cognitive function, as assessed by the Morris water maze task after a single episode of severe hypoglycemia, which correlated with a 70–90% reduction in neuronal death in CA1, the subiculum and the dentate gyrus (Suh et al., 2005).

Mood disorders have also been associated with severe hypoglycemia in humans and animal models. One study performed by Park and coworkers (2012), showed that acute hypoglycemia can produce mood changes in mice. They observed depressive-like behaviors 24 h after acute severe hypoglycemia, while no changes in a memory recognition test were found. In human studies Gold and collaborators (1995) evaluated the effect of acute hypoglycemia on mood changes in non-diabetic individuals. Their results showed that acute hypoglycemia alters the mood state producing tense tiredness and reduction of the hedonic tone. In a later study Strachan and collaborators (2000) concluded that acute hypoglycemia in diabetic individuals leads to depressive behaviors and alterations in other mood states, which could be the result of previous episodes of severe hypoglycemia.

4. Hypoglycemia without isoelectricity

Episodes of moderate hypoglycemia not progressing to coma are frequent in type 1 diabetic patients who can show two episodes of moderate hypoglycemia per week (Cryer et al., 2003). Due to the improved delivery of insulin or insulin releasing drugs, it is more common to find cases of moderate hypoglycemia than severe hypoglycemia in diabetic patients. Even though moderate hypoglycemia does not represent an immediate threat for patients, the consequences of long-term exposure to repetitive periods of moderate hypoglycemia on neuronal damage and cognitive function are still not well understood.

As mentioned in Section 3, severe hypoglycemia accompanied by a 30–60 min period of isoelectricity, clearly leads to massive neuronal death in vulnerable brain regions. However, several studies have shown that prolonged hypoglycemia in the absence of isoelectricity can also induce neuronal death restricted mainly to the cerebral cortex. Tkacs and collaborators (2005) showed that one episode of insulin-induced hypoglycemia leading to blood glucose concentrations of 30–35 mg/dl for 75 min produced significant neuronal damage in the prefrontal medial cortex, piriform cortex and orbital cortex. In a former study, Tkacs and collaborators (2000) also showed that three episodes of hypoglycemia associated with blood glucose concentrations of 30–35 mg/dl increased the number of cells positive to TUNEL, a marker of apoptosis, in the arcuate nucleus of the hypothalamus. Consistent with these observations Ennis and collaborators (2008) reported degenerating cells positive to the neuronal death marker Fluoro-Jade B (FJB), 24, 72 h and 1 week after a single episode of hypoglycemia, leading to blood glucose concentrations of 30 mg/dl for 120 min in developing (14 and 28 postnatal days) and adults rats. FJB-positive cells were found particularly in the cerebral cortex, although some were also observed in the hippocampus and the striatum. Although the hypothalamus has an important role in glucose sensing and homeostasis, it remained intact at all ages examined. These results suggest that non-coma hypoglycemia in developing rats, produces selective brain injury, mainly to the cerebral cortex. Consistent with these observations in a previous study we also reported the presence of degenerating cells positive to FJB in the brain of hypoglycemic rats, 24 h after a period of severe hypoglycemia (blood glucose levels below 20 mg/dl during 3 h) mainly in the frontal, parietal, insular and temporal cortices (Haces et al., 2010, see also Fig. 2). Altogether, these observations suggest that prolonged hypoglycemia associated with blood glucose levels below 30 mg/dl can lead to the death of discrete populations of cortical neurons even in the absence of isoelectricity. The mechanisms eliciting the death of neurons in these conditions have been little explored, but oxidative stress has been proposed as a contributing factor.

Oxidative stress is produced by the imbalance between the production of ROS and their clearance by the antioxidant defense (Halliwell, 2006). The presence of oxidative stress has been suggested to occur during the hypoglycemic period before isoelectricity appears. Patocková et al. (2003) showed in the whole mouse brain increased lipoperoxidation after 2 h of severe hypoglycemia (glucose levels below 1 mM) before the initiation of coma. They showed a positive correlation between the severity of hypoglycemia and lipoperoxidation levels, since blood glucose levels above 1 mM did not cause an increase in lipoperoxidation. Similarly, Singh et al., 2004 reported augmented lipoperoxidation and decreased reduced glutathione (GSH) content at the time of the hypoglycemic coma in broad regions of the rat brain, while McGowan et al. (2006) reported increased mitochondrial production of superoxide and hydrogen peroxide in the brain of newborn piglets after 2 h of severe hypoglycemia (glucose levels of 1 mM). Consistent with these observations, we have observed increased lipid peroxidation in homogenates from the hippocampus, the cortex

and the striatum, but not from the cerebellum, after severe and prolonged hypoglycemia (glucose levels of 20 mg/dl for more than 3 h) in rats before the onset of the isoelectric period. In contrast, increased levels of nitrosylated proteins were observed during glucose reintroduction (Haces et al., 2010), in agreement with the studies of Suh et al. (2003). In a recent study Cardoso and colleagues (2010) studied the effect of acute hypoglycemia (glucose levels of 33 mg/dl during 1 h) on mitochondrial energy and oxidative status in diabetic animals treated with streptozotocin. They observed increased lipoperoxidation in cortical but not hippocampal mitochondria, from diabetic hypoglycemic animals as compared to the control group. In addition, cortical mitochondria showed a decrease in the GSH/GSSG ratio and in glutathione reductase (GR) activity, while glutathione peroxidase (GPx) and manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) activities increased. In contrast to the cortex, hippocampal mitochondria showed no significant changes in lipoperoxidation, GR and GPx enzyme activities, while MnSOD activity decreased. These observations suggest a differential response of the antioxidant defense to severe hypoglycemia in diabetic animals, showing the largest changes in the cortex. In agreement with this study, Bhardwaj and collaborators (1998) showed alterations in the antioxidant defense in insulin-treated hypoglycemic rats (40 mg/dl). GPx was significantly increased in cerebral hemispheres, while GR was decreased in cerebral hemispheres and cerebellum. Moreover, hypoglycemia increased catalase levels in cerebral hemispheres, cerebellum and brain stem and SOD in cerebellum and cerebral hemispheres. With respect to the activities of the mitochondrial electron transport chain enzymes, these were markedly decreased, suggesting energy failure during the hypoglycemic condition. Further studies are needed in order to understand whether the differential response of the antioxidant defense is related to the vulnerability of the different brain regions to hypoglycemic neuronal damage.

On the other hand, in a previous *in vitro* study in hippocampal cultured neurons, we have reported that glucose deprivation rapidly induces ROS production through the activation of superoxide producing enzymatic pathways including xanthine oxidase, phospholipase A₂ and NADPH oxidase (NOX) (Páramo et al., 2010). Inhibitors of all these enzymes, and the antioxidant trolox, reduce ROS production and cell death in these conditions (Páramo et al., 2010). These observations lead us to conclude that in addition to mitochondria other ROS producing pathways are activated during glucose deprivation.

Altogether, the above-mentioned observations demonstrate that a single episode of hypoglycemia not leading to coma stimulates ROS production in brain regions vulnerable to hypoglycemic damage. It remains to be determined whether ROS production contribute to the death of neurons (mainly cortical) vulnerable to non-coma severe hypoglycemia. Fig. 2F. Shows the number of ROS producing cells, as monitored by ethidium fluorescence, in the frontal cortex of animals experiencing profound hypoglycemia without coma immediately after and 20 h after an episode of 4 h hypoglycemia as compared to control animals. Images of brain sections from representative animals are shown in Fig. 2A–C. Results suggest that ROS are produced during the hypoglycemic period (B) and after glucose reperfusion (C). Brain sections from hypoglycemic animals were processed for the identification of degenerating neurons using FJB. As shown in Fig. 2F, at 4 h after insulin administration no degenerating cells are present, while at 20 h an increase in the number of death cells is observed in the frontal cortex of hypoglycemic animals (Fig. 2E and F). Images of representative animals are shown in Fig. 2D and E. As previously suggested these results show that hypoglycemic neuronal death is delayed and takes place after glucose reperfusion.

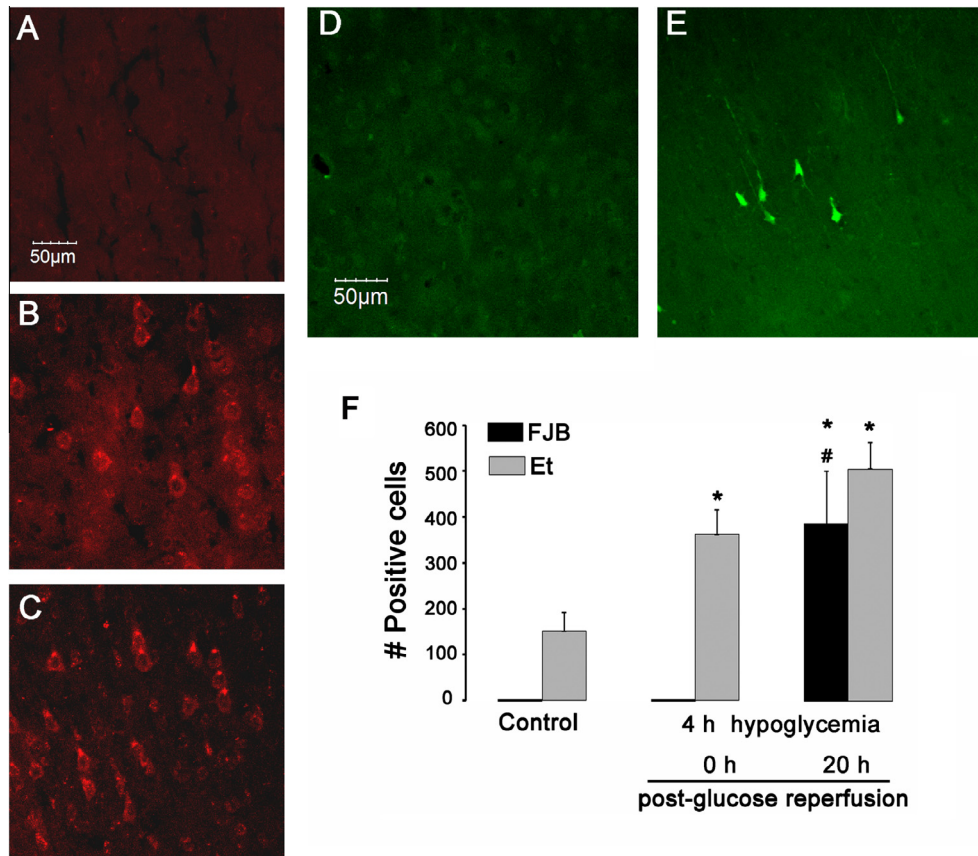


Fig. 2. Production of reactive oxygen species and neuronal death in the frontal cortex of hypoglycemic animals treated with insulin. Animals were treated with vehicle solution (controls) or 24 U insulin to induce a 4 h period of hypoglycemia (glucose levels of 20 mg/dl or below). The oxidation-sensitive fluorescent marker, dihydroethidine, was intraperitoneally injected (3 mg/kg) 1 h after insulin administration and 30 min after glucose reintroduction. The animals were sacrificed 4.5 h or 24 h after insulin administration and brains were processed for histological evaluation. ROS-producing cells are observed as red fluorescent (ethidium-positive, Et) in hypoglycemic animals (B and C), while control animals showed basically no fluorescent cells (A). Fluoro-Jade B (FJB) staining shows positive damaged cells in the group with glucose reintroduction evaluated 20 h after the hypoglycemic period (E), but not in control animals (D) or animals without glucose reintroduction evaluated 4 h after hypoglycemia (F). Graph (F) shows the number of positive cells to Et and FJB in the different groups of animals. The data represent means \pm SEM from 4 to 6 animals per group. * $P \leq 0.05$ relative to control, # $P \leq 0.05$ relative to the 4 h group (without glucose reintroduction).

4.1. Recurrent hypoglycemia: neuronal death and oxidative stress

The presence of multiple hypoglycemic episodes in diabetic patients results from the failure of the counterregulatory endocrine response (Cryer et al., 2003), and they can occur after a severe hypoglycemic episode has been present (Cryer et al., 2003; Lin et al., 2010). The consequences of moderate repetitive hypoglycemia on brain damage are still poorly understood. Yamada and collaborators (2004) studied the effect of repetitive hypoglycemia on long-term potentiation (LTP), a cellular mechanism underlying learning and memory processes. It was found that recurrent hypoglycemia impaired LTP in the hippocampus of young rats, while it caused no neuronal death. Consistent with these observations, a more recent study performed by Moore and collaborators (2010) showed that repetitive moderate hypoglycemia produces scarce neurodegeneration in rats. Positive cells to FJB were observed in clusters mainly in the parasagittal cortex and barely in the temporal cortical areas, like the perirhinal cortex.

Recently Won et al. (2012b) showed that recurrent moderate hypoglycemia (insulin administration during 3 days) in diabetic rats (treated with streptozotocin) causes scarce neuronal death in the cortex but not in the hippocampus. However, they observed oxidative damage, as assessed by the lipoperoxidation product 4-hydroxynonenal, in the hippocampal CA1 dendritic layer and microglial reactivity. In agreement, in a recent study, Cardoso

and collaborators (2012) reported that recurrent hypoglycemia (twice daily insulin administrations for 2 weeks) in diabetic rats (previously treated with streptozotocin) potentiated the increase in lipid peroxidation and the decrease in aconitase activity, used as an index of oxidative stress, in mitochondria from diabetic animals. According to the results, recurrent hypoglycemia differentially alters mitochondria bioenergetics and the antioxidant defense response in the cortex and the hippocampus, being the hippocampus the most affected.

Altogether, the described findings suggest that synaptic alterations, oxidative damage and an inflammatory reaction in the hippocampus might underlay cognitive impairment in diabetic animals showing recurrent hypoglycemia, rather than neuronal death.

4.2. Recurrent hypoglycemia and cognitive impairment

As mentioned in Section 3.3 substantial evidence supports that acute hypoglycemia alters cognitive function. However, data on the consequences of moderate recurrent hypoglycemia on cognitive functions are still controversial. McNay and Sherwin (2004) performed one of the first studies in a rodent model of moderate recurrent hypoglycemia. They evaluated the effect of repetitive hypoglycemia in a spatial memory test in diabetic and non-diabetic rats. The experimental protocol consisted in 3 moderate

hypoglycemic episodes (55–30 mg/dl) in a week, and cognitive functions were monitored either under euglycemia or hypoglycemia. The data showed that recurrent moderate hypoglycemia significantly improved performance in the spatial memory test when evaluated under euglycemia; however under hypoglycemia the animals performed worst in comparison with control animals. They also showed that, short-term recurrent hypoglycemia altered glucose levels in the extracellular fluid of the hippocampus, suggesting increased glucose uptake in hypoglycemic animals, possibly occurring as an adaptive response.

Later, in 2006 McNay and collaborators evaluated the effect of long-term (11 months) moderate recurrent hypoglycemia (blood glucose levels of 46 mg/dl), induced by insulin administration once a week, on a spatial memory test. The behavioral analysis was made at 4, 8 and 12 months. The results showed that long-term moderate recurrent hypoglycemia improved animals performance in comparison to the control group, when evaluated at 4 months in the euglycemic condition. At 8 and 12 months the animals still showed an improvement in the memory task. However, under hypoglycemic conditions rats showed a worse performance in comparison to the control group. Using hippocampal slices from 12 month-old rats exposed to recurrent hypoglycemia, the inhibitory synaptic function was recorded in the CA1 region using a paired pulse inhibition (PPI) protocol. Synaptic inhibitory activity was reduced under low glucose conditions (bath glucose concentration of 2 mmol/l) in control and recurrent hypoglycemic groups, although it was more severely affected in the latter. This result suggests that the inhibitory synaptic function is sensitive to glucose levels, and that it can be altered after long-term moderate recurrent hypoglycemia.

In agreement with these results, Puente and collaborators (2010) investigated the effect of acute hypoglycemia induced after the exposure to recurrent hypoglycemia on neuronal damage and cognitive function. Results showed that the induction of repetitive episodes of moderate hypoglycemia (during 3 consecutive days) leading to blood glucose levels of 40–25 mg/dl, reduced brain damage in vulnerable brain regions such as the cortex and the hippocampus and reduced the decline in cognitive impairment induced by a subsequent period of severe hypoglycemia (60–90 min of isoelectricity). The results from this study suggest that antecedent hypoglycemia provides protection against neuronal damage induced by severe hypoglycemia, which might underlay the observed improvement in memory, as assessed by the water maze test. In this study recurrent hypoglycemia was induced for a short period of time, which might not represent the clinical condition of diabetic patients who suffer from repetitive periods of hypoglycemia throughout life.

5. Treatments for glycemic control and strategies to prevent hypoglycemia

Intensive insulin therapy (multiple insulin daily injections or continuous subcutaneous insulin infusion through an insulin pump) aimed to reduce at minimum the vascular long-term complications associated with type-1 diabetes, has been extensively used in the past two decades. Despite the success of this therapy in the control of glycaemia and reduction of the vascular complications of the disease, it is expensive and demands the continuous self-monitoring of blood glucose. In addition, it does not reduce the incidence of hypoglycemia, which remains to be a life-threatening condition (*Diabetes Control and Complications Trial (DDCT)*, 2006; Steil et al., 2006). The development of new devices to continuously monitor glucose blood levels and deliver insulin or insulin analogues have partially improved the glycemic control, but has not eliminated the risk of repeated hypoglycemic episodes (Fato-

urechi et al., 2009; Castle et al., 2010; Pickup et al., 2011; Yeh et al., 2012).

Rapid acting insulin analogues available for more than 10 years have shown improvement of the glycemic control but limited reduction in the frequency of hypoglycemic episodes (Gale, 2000). Similarly, long-acting insulin analogues better control glycaemia and diminish, although not completely eliminate, the incidence of hypoglycemia, particularly nocturnal (DeVries et al., 2007; Little et al., 2011). Lately, the ultra-long-acting insulin analogue, degludec, has demonstrated a good glycemic control similar to other long-acting insulin analogues, but better reduction of nocturnal hypoglycemic episodes in type 1 diabetic patients (Birke-land et al., 2011; Heller et al., 2012).

New alternative treatments are under study such as the so-called artificial endocrine pancreas. This is a computer controlled automated device that measures blood glucose concentrations every 5 min and subcutaneously delivers insulin and glucagon according to the measured glucose concentration. In comparison with previous devices, this automated system includes a counter-regulatory hormonal component, which consists in the injection of glucagon. A recent report using this system in a group of 11 type 1 diabetic patients showed very efficient glycemic control and no hypoglycemic events in 50% of the patients (El-Kathib et al., 2010). On the other hand, studies have shown that pancreas transplantation decreases or completely eliminates, in insulin-requiring patients, the time spent in hypoglycemia (Rickels, 2012). In this case the mechanisms implicated in the glycemic control include the partial restoration of glucagon secretion, the recovery of the sympathoadrenal response, and a regulatory decrease in endogenous insulin secretion. Pancreas transplantation reduces the administration of exogenous insulin, which in turn decreases the threat of iatrogenic hypoglycemia (Leitao et al., 2008). Therefore, whole pancreas transplantation or islet cells transplantation might represent a viable treatment for type-1 diabetic patients experiencing recurrent hypoglycemia. Table 2 summarizes some of the new treatments for the glycemic control in diabetic patients and its impact on the incidence of hypoglycemia.

Other strategies to prevent recurrent hypoglycemia have been recently recommended to patients and clinicians by a workgroup of the American Diabetes Association and the Endocrine Society (see Seaquist et al., 2013). These include patient's education, dietary intervention, exercise management, medication adjustment, glucose monitoring and clinical surveillance (Seaquist et al., 2013). It is advised that diabetic patients and their relatives integrate to training programs aimed to recognize the symptoms of a hypoglycemic episode and react to resolve it with the oral administration of carbohydrates or glucagon. Patients should be aware of the risks of experiencing hypoglycemia and must be instructed about the modes of action of the medicaments they have been prescribed, and about the strategies to avoid the precipitating factors of hypoglycemia (irregular meals, alcohol ingestion etc.). It is important for the patient to follow planned meal and medication regimens and always carry carbohydrates; to prevent nocturnal hypoglycemia patients should take a snack at bed-time. Blood glucose monitoring and snack intake before exercising, is advisable to reduce the risk of post-exercise hypoglycemia. Adjustment of the treatment to avoid hypoglycemia unawareness and restore the autonomic response requires a close contact between the patient and the clinician. In addition, continuous monitoring of blood glucose is essential for preventing the risk of recurrent hypoglycemia; automatic continuous monitoring devices should be considered as an option. Finally, clinicians must assess the risk of hypoglycemia in their patients and be sure about the incidence of asymptomatic and symptomatic hypoglycemic episodes, ensuring that they are properly treated.

On the other hand, investigation in animal models of severe hypoglycemia has also been focused on the search of alternative

Table 2
Treatments for glycemic control and their impact on hypoglycemia.

References	Year	Treatment	Description
Boland et al.	1999	Multiple daily injections of insulin or insulin pump therapy	Multiple subcutaneous insulin infusion. Good glycemic control. High risk of hypoglycemia
Heller et al.	2004	Rapid-acting insulin analogues (Insulin Aspart)	Reduce the frequency of nocturnal hypoglycemic episodes
Home et al.	2010	Long-acting insulin Glargine	Reduces the frequency of nocturnal hypoglycemia
Heller et al.	2012	Degludec	
El-Khatib F.	2010	Artificial pancreas	Senses and regulates the hormonal endocrine response (insulin-glucagon). Low risk of hypoglycemia
Rickels MR	2012	Islet cells or whole pancreas transplantation	Restoration of the counterregulatory response and insulin secretion. Low risk hypoglycemia
Maxwell and McFarland	2013	Inhibitor of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) (Linagliptin)	Increases the levels of the active incretin, glucagon-like peptide (GLP-1). Increases glucose-dependent insulin secretion and suppresses glucagon secretion. No increased risk of hypoglycemia
Taylor and Harris	2013	Sodium glucose cotransporter-2 (SGT-2) inhibitors (Dapagliflozin, Canagliflozin)	Increase glucose excretion by inhibiting the renal reabsorption of glucose. Low risk of hypoglycemia

therapeutic options. Animal studies using acute models of hypoglycemia have demonstrated that neuronal death is triggered by glucose reintroduction after a period of coma, and that neuronal death is observed from 24 h to 1 week after the coma period. Neuronal damage is induced in part by the production of ROS, which is largely stimulated by glucose infusion (Suh et al., 2007). Limiting ROS production and restoring blood glucose to levels not exceeding the physiological range, prevents neuronal death (Suh et al., 2007). On the other hand, the administration of pyruvate and lactate in combination with glucose reduces the death of hippocampal neurons (Suh et al., 2005; Won et al., 2012a; Zhou et al., 2012). Delayed administration of pyruvate 1 h after glucose reperfusion is still protective but not when it is administered 3–6 h after glucose infusion (Suh et al., 2005), suggesting a therapeutic window as close as possible to coma onset. These results suggest the therapeutic potentiality of antioxidants, lactate and pyruvate administration combined with glucose to limit the adverse consequences of glucose reperfusion. On the other hand, it has been recently shown that the administration of minocycline to hypoglycemic rats 6 h after the coma and daily during 1 week, results in reduced microglial reactivity, neuronal death and cognitive impairment (Won et al., 2012c). This observations support the therapeutic potentiality of the delayed administration of this anti-inflammatory compound for the treatment of profound hypoglycemia. Further investigation is needed in order to extrapolate these findings to clinical applications.

6. Conclusions

Overall, the studies described throughout this review lead us to conclude that acute and selective brain damage is clearly induced after a single episode of severe hypoglycemia accompanied by isoelectricity, both in humans and animal rodent models. Studies have shown that neuronal damage in the hippocampus is involved in the cognitive alterations observed after severe hypoglycemia. Although the mechanisms leading to neuronal death are not completely understood, many factors have been identified at the cellular level, including oxidative stress, zinc release, activation of PARP-1 and mitochondrial dysfunction. It has also been demonstrated that the diabetic condition importantly aggravates neuronal damage and cognitive failure induced by severe hypoglycemia, although the mechanisms underlying this effect have not been elucidated. On the other hand, several studies have also observed discrete neuronal damage, mainly in the cerebral cortex, after severe hypoglycemia without coma, placing the cortex as one of the most vulnerable brain regions to non-coma hypoglycemic damage. The mechanism responsible of the damage to this

discrete population of cells is still unknown but a role of oxidative stress has been suggested.

Finally, the consequences of moderate and recurrent hypoglycemia to cognitive function are still controversial, but human studies suggest impaired performance mainly in memory and attention tasks in healthy and diabetic individuals, when tested under the hypoglycemic condition. Neuronal damage under moderate repetitive hypoglycemia is scarce but studies suggest that impaired hippocampal synaptic function might be one of the causes of cognitive failure associated with recurrent hypoglycemia.

Acknowledgments

LM was supported by CONACYT S-112179 and PAPIIT IN211710-3 grants. Authors thank Gabriel Orozco for his help in confocal microscopy.

References

- Amiel, S., 1998. Cognitive function testing in studies of acute hypoglycaemia: rights and wrongs. *Diabetologia* 41, 713–719.
- Aoki, T., Sato, T., Hasegawa, K., Ishizaki, R., Saiki, M., 2004. Reversible hyperintensity lesion on diffusion-weighted MRI in hypoglycemic coma. *Neurology* 63, 392–393.
- Attwell, D., Laughlin, S., 2001. An energy budget for signaling in the gray matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133–1145.
- Auer, R.N., Kalimo, H., Olsson, Y., Siesjö, B.K., 1985a. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light and electron microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 67, 13–24.
- Auer, R.N., Kalimo, H., Olsson, Y., Siesjö, B.K., 1985b. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light and electron microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol.* 67, 25–36.
- Bakatselos, S., 2011. Hypoglycemia unawareness. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, 92–96.
- Beall, C., Ashford, M.L., McCrimmon, A., McCrimmon, R., 2012. The physiology and pathophysiology of the neural control of the counterregulatory response. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 202, 215–223.
- Becker, D., Ryan, C., 2005. Hypoglycemia: a complication of diabetes therapy in children. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 198–202.
- Bélangier, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738.
- Bhardwaj, S.K., Sharma, M.L., Gulati, G., Chhabra, A., Kaushik, R., Sharma, P., Kaur, G., 1998. Effects of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from the rat brain, liver and kidney. *Mol. Chem. Neuropathol.* 34, 157–168.
- Birkeland, K., Home, P., Wendis, U., et al., 2011. Insulin degludec in type 1 diabetes: a randomized controlled trial of a new-generation ultra-long-acting insulin compared with insulin glargine. *Diabetes Care* 34, 661–665.
- Blasetti, A., Chiuri, R., Tocco, A., Di Giulio, C., Mattei, P., Ballone, E., Chiarelli, F., Verrotti, A., 2011. The effect of recurrent severe hypoglycemia on cognitive performance in children with type 1 diabetes: a meta-analysis. *J. Child Neurol.* 26, 1383–1391.
- Boland, E., Grey, M., Oesterle, A., Fredrickson, L., Tamborlane, W., 1999. Continuous subcutaneous insulin infusion. A new way to lower risk of severe hypoglycemia, improve metabolic control, and enhance coping in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22, 1779–1784.

- Bree, A.J., Puente, E.C., Daphna-Iken, D., Fisher, S.J., 2009. Diabetes increases brain damage caused by severe hypoglycemia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, 194–201.
- Butcher, S.P., Jacobson, I., Sandberg, M., Hagberg, H., Hamberger, A., 1987a. 2-Amino-5-phosphonovalerate attenuates the severe hypoglycemia-induced loss of perforant path-evoked field potentials in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 76, 296–300.
- Butcher, S.P., Sandberg, M., Hagberg, H., Hamberger, A., 1987b. Cellular origins of endogenous amino acids released into the extracellular fluid of the rat striatum during severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 48, 722–728.
- Cardoso, S., Santos, M.S., Seica, R., Moreira, P.I., 2010. Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 942–951.
- Cardoso, S., Santos, R.X., Correia, S.C., Carvalho, C., Santos, M.S., Balderiras, I., Oliveira, C.R., Moreira, P.I., 2012. Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiol. Dis.* 49, 1–12.
- Castle, J., Engle, J., Youssef, E., Massoud, R., Ward, W., 2010. Factors influencing the effectiveness of glucagon for preventing hypoglycemia. *J. Diab. Sci. Technol.* 6, 1305–1310.
- Cryer, P.E., 2006. Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J. Clin. Invest.* 116, 1470–1473.
- Cryer, P.E., 2007. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J. Clin. Invest.* 117, 868–870.
- Cryer, P.E., Davis, S.N., Shamoon, H., 2003. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26, 1902–1912.
- De Galan, B.E., Schouwenberg, B., Tack, C., Smits, P., 2006. Pathophysiology and management of recurrent hypoglycaemia and hypoglycaemia unawareness in diabetes. *Neth. J. Med.* 64, 269–279.
- Desagher, S., Glowinski, J., Prémont, J., 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17, 9060–9067.
- DeVries, J., Nattrass, M., Pieber, T., 2007. Refining basal insulin therapy: what have we learned in the age of analogues? *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23, 441–454.
- Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), 2006. Insights from the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study on the use of intensive glycaemic treatment to reduce the risk of complications of type 1 diabetes. *Endocr. Pract.* 12, 41–43.
- Donnelly, L., Morris, A., Frier, B., Ellis, J., Donnan, P., Durrant, R., Band, M., Reekie, G., Leese, G., 2005. Frequency and predictors of hypoglycaemia in Type 1 and insulin-treated Type 2 diabetes: A population-based study. *Diabet. Med.* 22, 749–755.
- Draeas, M., Jacobson, A., Weinger, K., Widom, B., Ryan, C., Finckelstein, D., Simonson, D., 1995. Cognitive function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus during hyperglycemia and hypoglycemia. *Am. J. Med.* 98, 135–144.
- El-Kathib, F., Russell, S., Nathan, D., Sutherland, R., Damiano, E., 2010. A bihormonal closed-loop artificial pancreas for type 1 diabetes. *Sci. Transl. Med.* 2, 1–12.
- Ennis, K., Tran, P., Seaquist, E.R., Rao, R., 2008. Postnatal age influences hypoglycemia-induced neural injury in the rat brain. *Brain Res.* 1224, 119–126.
- Evans, M.L., Pernet, A., Lomas, J., Jones, J., Amiel, S.A., 2000. Delay in onset of awareness of acute hypoglycemia and restoration of cognitive performance during recovery. *Diabetes Care* 23, 893–897.
- Ewing, F.M.E., Deary, I.J., McCrimmon, R.J., Strachan, M.W.J., Frier, B., 1998. Effect of acute hypoglycemia on visual information processing in adults with type 1 diabetes mellitus. *Physiol. Behav.* 64, 653–660.
- Fanelli, C., Epifano, L., Rambotti, A., 1993. Meticulous prevention of hypoglycaemia normalizes the glycemic thresholds and magnitude of most of neuroendocrine responses to, symptoms of, and cognitive function during hypoglycaemia in intensively treated patients with short term IDDM. *Diabetes* 42, 1683–1689.
- Fatourehchi, M., Kudva, Y., Murad, M., Elamin, M., Tabini, C., Montori, V., 2009. Clinical review: hypoglycemia with intensive insulin therapy: a systematic review and meta-analysis of randomized trials of continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily injections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 729–740.
- Feltbower, R., Bodansky, H.J., Patterson, C., Parslow, R.C., Stephenson, C.R., Reynolds, C., Mc Kinney, P.A., 2008. Acute complications and drug misuse are important causes of death for children and young adults with type 1 diabetes: results from the Yorkshire register of diabetes in children and young adults. *Diabetes Care* 31, 922–926.
- Ferrand-Drake, M., Friberg, H., Wieloch, T., 1999. Mitochondrial permeability transition induced DNA-fragmentation in the rat hippocampus following hypoglycemia. *Neuroscience* 90, 1325–1338.
- Ferrand-Drake, M., Zhu, C., Gidö, G., Hansen, A., Karlsson, J., Bahr, B., Zamzami, N., Kroemer, G., Chan, P., Wieloch, T., Blomgren, K., 2003. Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J. Neurochem.* 85, 1431–1442.
- Friberg, H., Ferrand-Drake, M., Bengtsson, F., Halestrap, A.P., Wieloch, T., 1998. Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.* 18, 5151–5159.
- Fujioka, M., Okuchi, K., Hiramatsu, K., Sakaki, T., Sakaguchi, S., Ishii, Y., 1997. Specific changes in human brain after hypoglycemic injury. *Stroke* 28, 584–587.
- Gale, E., 2000. A randomized, controlled trial comparing insulin lispro with human soluble insulin in patients with type 1 diabetes on intensified insulin therapy. The UK trial group. *Diabet. Med.* 3, 209–214.
- García, O., Massieu, L., 2003. The glutamate uptake inhibitor, L-trans-pyrrolidine 2,4-pyrrolydine dicarboxylate, becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of the mitochondrial toxin 3-nitropropionate. Involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *J. Neurosci. Res.* 74, 956–966.
- Geddes, J., Schopman, J., Zammitt, N., Frier, B., 2008. Prevalence of impaired awareness of hypoglycaemia in adults with type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 25, 501–504.
- Gold, A., Macleod, K., Deary, I., Frier, B.M., 1995. Hypoglycemia-induced cognitive dysfunction in diabetes mellitus: effect of hypoglycemia unawareness. *Physiol. Behav.* 58, 501–511.
- Guemez-Gamboa, A., Estrada-Sánchez, A.M., Montiel, T., Páramo, B., Massieu, L., Morán, J., 2011. Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 1020–1035.
- Haces, M.L., Hernández-Fonseca, K., Medina-Campos, O.N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., Massieu, L., 2008. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp. Neurol.* 211, 85–96.
- Haces, M.L., Montiel, T., Massieu, L., 2010. Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165, 28–38.
- Halliwel, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658.
- Hannonen, R., Tupola, S., Ahonen, T., Riikonen, R., 2003. Neurocognitive functioning in children with type 1 diabetes with and without episodes of severe hypoglycemia. *Dev. Med. Child Neurol.* 45, 262–268.
- Harris, R., Wieloch, T., Symon, L., Siesjo, B., 1984. Cerebral extracellular calcium activity in severe hypoglycemia: relation to extracellular potassium and energy state. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2, 187–193.
- Heller, S., Colagiuri, S., Vaaler, S., Wolfenbutter, K., Koelendorf, H., Friberg, K., Windfeld, K., Lindholm, A., 2004. Hypoglycaemia with insulin aspart: a double-blind randomised, crossover trial in subjects with Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 21, 769–775.
- Heller, S., Choudhary, P., Davies, C., Emery, C., Campbell, M.J., Freeman, J., Amiel, S.A., Malik, R., Frier, B.M., Allen, K., Zammitt, N., Macleod, K., Lonnen, K., Kerr, D., Richardson, T., Hunter, S., McLaughlin, D., 2007. UK Hypoglycaemia study group. Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration. *Diabetologia* 50, 1140–1147.
- Heller, S., Buse, J., Fisher, M., Garg, S., Marre, M., Maerker, L., Renard, E., Russell-Jones, D., Philotheou, A., Ocampo, A., Pei, H., Bode, B., 2012. Insulin degludec, an ultra-longacting basal insulin, versus insulin glargine in basal-bolus treatment with mealtime insulin aspart in type 1 diabetes (BEGIN Basal-Bolus Type 1): a phase 3, randomised, open-label, treat-to-target non-inferiority trial. *Lancet* 379, 1489–1497.
- Hershey, T., Perantie, D., Warren, S.L., Zimmerman, E.C., Sadler, M., White, H.M., 2005. Frequency and timing of severe hypoglycaemia affects spatial memory in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 28, 2372–2377.
- Ho, M., Weller, N.J., Ives, F., Carne, C.L., Murray, K., Vanden Driessen, R., Nguyen, T., Robins, P.D., Bulsara, M., Davis, E.A., Jones, T.W., 2008. Prevalence of structural central nervous system abnormalities in early-onset type 1 diabetes mellitus. *J. Pediatr.* 153, 385–390.
- Holmes, C., Koepke, K., Thompson, R., 1986. Simple versus complex performance impairments at three blood glucose levels. *Psychoneuroendocrinology* 11, 353–357.
- Home, P.D., Fritsche, A., Schinzel, S., Massi-Benedetti, M., 2010. Meta-analysis of individual patient data to assess the risk of hypoglycaemia in people with type 2 diabetes using NPH insulin or insulin glargine. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12, 772–779.
- Hopkins, D., Korzon-Burakowski, A., Lomas, J., 1997. Symptoms counterregulatory hormone responses and cognitive function during hypoglycaemia in NIDDM. *Diabetologia* 40, 27–31.
- Izumi, Y., Benz, A.M., Katzuki, H., Zorumski, C.F., 1997. Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J. Neurosci.* 17, 9448–9457.
- Jacobson, A., Musen, G., Ryan, C., Silvers, N., Cleary, P., Waberski, B., Burwood, A., Weinger, K., Dahms, W., Harth, J., 2007. Long-term effects of diabetes and its treatment on cognitive function. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study research group. *N. Engl. J. Med.* 356, 1842–1852.
- Juge, N., Gray, J., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Robert, H., Roger, E., Nicoll, A., Moriyama, Y., 2010. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 1, 99–112.
- Kalimo, H., Olsson, Y., 1980. Effects of severe hypoglycemia on the human brain. Neuropathological case reports. *Acta Neurol. Scand.* 62, 345–356.
- Kalimo, H., Auer, R.N., Siesjo, B.K., 1985. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. III. Light and electron microscopic findings in the rat caudate-putamen. *Acta Neuropathol.* 67, 37–50.
- Kirchhoff, B., Lugar, H., Smith, S., Meyer, E., Perantie, D., Kolody, B., Koller, J., Arbelaez, A., Shimony, J., Hershey, T., 2013. Hypoglycaemia – induced changes in regional brain volume and memory function. *Diabet. Med.* 30, 151–156.
- Lee, B., Jin, E., Hwang, H., Yoo, H., Jeong, J., 2010. A case of hypoglycemic brain injuries with cortical laminar necrosis. *J. Korean Med.* 25, 961–965.

- Leese, G., Wang, J., Broomhall, J., Kelly, P., Mardsen, A., Morrison, W., Frier, B., Morris, A., 2003. Frequency of severe hypoglycemia requiring emergency treatment in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26, 1176–1180.
- Leitao, C., Tharavani, T., Cure, P., Pileggi, A., Baidal, D.A., Ricordi, C., Alejandro, R., 2008. Restoration of hypoglycemia awareness after islet transplantation. *Diabetes Care* 31, 2113–2115.
- Lin, Y.Y., Hsu, C.W., Sheu, W., Chu, S., Wu, C., Tsai, S., 2010. Risk factors for recurrent hypoglycemia induced in hospitalized diabetic patients admitted for severe hypoglycemia. *Yonsei Med. J.* 51, 367–374.
- Little, S., Shaw, J., Home, P., 2011. Hypoglycemia rates with basal insulin analogs. *Diabetes Technol. Ther.* 13, 53–64.
- Ma, W., Berg, J., Yellen, G., 2007. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. *J. Neurosci.* 14, 3618–3625.
- Ma, J., Kim, Y., Yoo, W., Ihn, Y., Kim, J., Song, H., Kim, B., 2009. MR imaging of hypoglycemic encephalopathy: lesion distribution and prognosis prediction by diffusion-weighted imaging. *Neuroradiology* 10, 641–649.
- Maran, A., Lomas, J., Macdonald, I.A., Amiel, S.A., 1995. Lack of preservation of higher brain function during hypoglycaemia in patients with intensively treated – IDDM. *Diabetologia* 38, 1412–1418.
- Maran, A., Crepaldi, C., Trupiani, S., 2000. Brain function rescue effect of lactate following hypoglycaemia is not an adaptation process in both normal and type 1 diabetic subjects. *Diabetologia* 43, 733–741.
- Massieu, L., Gómez-Román, N., Montiel, T., 2000. In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165, 257–267.
- Massieu, L., Del Río, P., Montiel, T., 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106, 669–677.
- Massieu, L., Haces, M.L., Montiel, T., Hernández-Fonseca, K., 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-induced neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120, 365–378.
- Maxwell, L., McFarland, M., 2013. Clinical utility and tolerability of linagliptin in diabetic patients. *Drug Health Patient Saf.* 5, 67–78.
- McGowan, J., 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.
- McNay, E.C., Sherwin, R.S., 2004. Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes* 53, 418–425.
- McNay, E.C., Williamson, A., McCrimmon, R., Sherwin, R.S., 2006. Cognitive and neural hippocampal effects of long-term moderate recurrent hypoglycemia. *Diabetes* 55, 1088–1095.
- Moore, H., Craft, T., Grimaldi, L.M., Badic, B., Brunelli, S.A., Vannucci, S.J., 2010. Moderate recurrent hypoglycemia during early development leads to persistent changes in affective behavior in the rat. *Brain Behav. Immun.* 24, 839–849.
- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A., 1993. Glucose and ketone bodies 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.
- Ouyang, Y., Ping He, Q., Zhang, X., Wang, G., Siesjo, B., Hu, B., 2000. Alteration of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in rat brain after hypoglycemic coma. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1550–1556.
- Owen, O.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G., Cahill, G.F., 1967. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46, 1589–1595.
- Page, K.A., Williamson, A., Yu, N., McNay, E.C., Dzuira, J., McCrimmon, R.J., Sherwin, R.S., 2009. Medium-chain fatty acids improve cognitive function in intensively treated type 1 diabetic patients and support in vitro synaptic transmission during acute hypoglycemia. *Diabetes* 58, 1237–1244.
- Páramo, B., Hernández-Fonseca, K., Estrada-Sánchez, A., Jiménez, N., Hernández Cruz, A., Massieu, L., 2010. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167, 1057–1069.
- Páramo, B., Montiel, T., Rivera-Martínez, M., Morán, J., Massieu, L., submitted for publication. Glucose deprivation-induced neuronal death involves calpain activation mediated by oxidative stress.
- Park, M., Yoo, S., Choe, B., Dantzer, R., Freund, G., 2012. Acute hypoglycemia causes depressive-like behaviors in mice. *Metab. Clin. Exp.* 61, 229–236.
- Patocková, J., Marhol, P., Tumova, E., Krsiak, M., Rokyta, R., Stípek, S., Crkowska, J., Andel, M., 2003. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin with hypoglycemia. *Physiol. Res.* 52, 131–135.
- Patterson, C., Dahlquist, G., Harjutsalo, V., Joner, G., Feltbower, R.G., Svensson, J., Schoeber, E., Gyürüs, E., Castle, C., Urbonaité, B., Rosenbauer, J., Iotova, V., Thornsson, A., Soltész, A., 2007. Early mortality in EURODIAB population-based cohorts of type 1 diabetes diagnosed in childhood since 1989. *Diabetologia* 50, 2439–2442.
- Pedersen-Bjergaard, U., Pramming, S., Thorsteinsson, B., 2004. Recall of severe hypoglycaemia and self-estimated state of awareness in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 19, 232–240.
- Pellerin, L., 2010. Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab.* 36, 59–63.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10625–10629.
- Perantie, D., Lim, A., Wu, J., Weaver, P., Warren, S., Sadler, M., White, N., Hershey, T., 2008. Effects of prior hypoglycemia and hyperglycemia on cognition in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr. Diabetes* 9, 87–95.
- Perros, P., Deary, I., Sellar, R., Best, J.J., Frier, B.M., 1997. Brain abnormalities demonstrated by magnetic resonance imaging in adult IDDM patients with and without a history of recurrent severe hypoglycemia. *Diabetes Care* 20, 1013–1018.
- Pickup, J., Freeman, S., Sutton, A., 2011. Glycaemic control in type 1 diabetes during real time continuous glucose monitoring compared with self-monitoring of blood glucose: meta-analysis of randomised controlled trials using individual patient data. *BMJ* 7, 343–3805.
- Pramming, S., Thorsteinsson, B., Bentson, I., Binder, C., 1991. Symptomatic hypoglycaemia in 411 type 1 diabetic patients. *Diabet. Med.* 3, 217–222.
- Puente, E.C., Silverstein, J., Bree, A.J., Musikantow, D.R., Wozniak, D.F., Maloney, S., Daphna-Iken, D., Fisher, S., 2010. Recurrent moderate hypoglycemia ameliorates brain damage and cognitive dysfunction induced by severe hypoglycemia. *Diabetes* 59, 1055–1062.
- Rickels, M.R., 2012. Recovery of endocrine function after islet and pancreas transplantation. *Curr. Diab. Rep.* 5, 587–596.
- Ryan, C., Atchison, J., Puczynski, S., Puczynski, M., Arslanian, S., Becker, D., 1990. Mild hypoglycaemia associated with deterioration of mental efficiency in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Pediatr.* 117, 32–38.
- Sandberg, M., Nystrom, B., Hamberger, A., 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: In vivo dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 47, 178–184.
- Schutz, P.W., Wong, P.K.H., O'Kusky, J., Innis, S.M., Stockler, S., 2011. Effects of D-3-hydroxybutyrate treatment on hypoglycemic coma in rat pups. *Exp. Neurol.* 227, 180–187.
- Sequist, E., Anderson, J., Childs, B., Cryer, P., Dagogo-Jack, S., Fish, L., Heller, S., Rodríguez, H., Rosenzweig, J., Vigersky, R., 2013. Hypoglycemia and diabetes: a report of the workgroup of the American diabetes association and endocrinology society. *Diabetes Care* 36, 1384–1395.
- Shety, P.K., Sadgrove, M.P., Galeffi, F., Turner, D.A., 2012. Pyruvate incubation enhances glycogen stores and sustain neuronal function during subsequent glucose deprivation. *Neurobiol. Dis.* 45, 177–187.
- Siman, R., Noszek, C., Kegerise, C., 1989. Calpain 1 activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J. Neurosci.* 9, 1579–1590.
- Simpson, I., Carruthers, A., Vannucci, S., 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791.
- Simpson, I., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K., Travis, A., Vanucci, S., 2008. The facilitative glucose transporter 3: twenty years of distinction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, 242–253.
- Singh, P., Jain, A., Kaur, G., 2004. Impact of hypoglycemia and diabetes on SNC: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* 260, 153–169.
- Skrivarhaug, T., Bangstad, H., Stene, L., Sandvik, L., Hanssen, K., Jøner, G., 2006. Longterm mortality in a nationwide cohort of childhood-onset type 1 diabetic patients in Norway. *Diabetologia* 2, 298–305.
- Sommerfeld, A., Deary, I., McAulay, V., Frier, B., 2003. Short-term, delayed and working memory are impaired during hypoglycemia in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26, 390–396.
- Stahl, M., Berger, W., 1999. Higher incidence of severe hypoglycaemia leading to hospital admission in type 2 diabetic patients treated with long-acting versus short-acting sulphonylureas. *Diabet. Med.* 16, 586–590.
- Steil, G., Rebrin, K., Darwin, C., Hariri, F., Saad, M.F., 2006. Feasibility of automating insulin delivery for the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes* 55, 3344–3350.
- Strachan, M., Deary, I., Ewing, F., Frier, B., 2000. Recovery of cognitive function and mood after severe hypoglycemia in adults with insulin-treated diabetes. *Diabetes Care* 23, 305–312.
- Suh, S., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., Liu, J., Swanson, R., 2003. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J. Neurosci.* 23, 10681–10690.
- Suh, S., Aoyama, K., Matsumori, Y., Liu, J., Swanson, R., 2005. Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes* 54, 1452–1458.
- Suh, S.W., Gum, E.T., Hamby, A.M., Chan, P.H., Swanson, R.A., 2007. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 117, 910–918.
- Suh, S.W., Hamby, A.M., Gum, E.T., Shin, B.S., Won, S.H., Sheline, C.T., Chan, P.K., Swanson, R.A., 2008. Sequential release of nitric oxide, zinc and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1697–1706.
- Tanner, G., Lutas, A., Martínez-Francois, J., Yellen, G., 2011. Single KATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. *J. Neurosci.* 31, 8689–8696.
- Taylor, S.R., Harris, K.B., 2013. The clinical efficacy and safety of sodium glucose cotransporter-2 inhibitors in adults with type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*. <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1303>.
- Tesfaye, N., Sequist, E.R., 2010. Neuroendocrine responses to hypoglycemia. *Ann. Acad. Sci.* 1212, 12–28.
- Tkacs, N.C., Dunn-Meynell, A., Levin, B., 2000. Presumed apoptosis and reduced arcuate nucleus neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA in non-coma hypoglycemia. *Diabetes* 49, 820–826.

- Tkacs, N.C., Pan, Y., Raghupathi, R., Dunn-Meynell, A., Levin, B., 2005. Cortical Fluoro-Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1645–1655.
- Tupola, S., Salonen, I., Hannonen, R., et al., 2004. Comparison of regional cerebral perfusion, EEG and cognitive functions in type 1 diabetic children with and without severe hypoglycaemia. *Eur. J. Pediatr.* 163, 335–336.
- Vannucci, R.C., Vannucci, S.J., 2001. Hypoglycemic brain injury. *Semin. Neonatol.* 6, 147–155.
- Warren, R.E., Frier, B.M., 2005. Hypoglycaemia and cognitive function. *Diabetes Obes. Metab.* 7, 493–503.
- Weinstock, R., Xing, D., Maahs, D., Michels, A., Rickels, M.R., Peters, A.L., Bergenstal, R., Harris, B., Dubose, S., Miller, K., Beck, R., 2013. Severe hypoglycemia and diabetic ketoacidosis in adults with type 1 diabetes: Results from the T1D exchange clinic registry. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 10, 1–10.
- White, N., Skor, D., Cryer, P., Levandoski, L., Bier, D., Santiago, J., 1983. Identification of type I diabetic patients at increased risk for hypoglycemia during intensive therapy. *N. Engl. J. Med.* 308, 485–491.
- Widom, B., Simonson, D., 1990. Glycemic control and neuropsychologic function during hypoglycemia in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 112, 904–912.
- Wieloch, T., 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-Methyl-D-Aspartate antagonist. *Science* 230, 681–683.
- Wirsen, A., Tallrot, G., Lindgren, M., Agardh, C.D., 1992. Neuropsychological performance differs between type 1 diabetic and normal men during insulin-induced hypoglycaemia. *Diabetes Med.* 9, 156–165.
- Won, S.J., Jang, B.G., Yoo, B.H., Sohn, M., Lee, M.W., Choi, B.Y., Kim, J.H., Song, H.K., Suh, S.W., 2012a. Prevention of acute/severe hypoglycemia-induced neuron death by lactate administration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1086–1096.
- Won, S.J., Yoo, B.H., Kauppinen, T.M., Choi, B.Y., Kim, J.H., Jang, B.G., Lee, M.W., Sohn, M., Liu, J., Swanson, R.A., Suh, S.W., 2012b. Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. *J. Neuroinflammation* 9, 1–45.
- Won, S., Kim, J., Yoo, B., Sohn, M., Kauppinen, T., Park, M., Kwon, H., Liu, J., Suh, S., 2012c. Prevention of hypoglycemia-induced neuronal death by minocycline. *J. Neuroinflammation* 9, 225.
- Wrighten, S.A., Piroli, G., Grillo, C., Reagan, L., 2009. A look inside the diabetic brain: contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 444–453.
- Xu, C., Yogaratman, J., Lua, R., Naik, S., Khoo, C., Sasidaran, S., Sim, K., 2011. Persistent, severe hypoglycemia-induced organic brain syndrome with neurological sequelae: a case report. *Gen. Hosp. Psychiatry* 33, 411–412.
- Yamada, K.A., Rensing, N., Izumi, Y., De Erausquin, G.A., Gazit, V., Dorsey, D.A., 2004. Repetitive hypoglycemia in young rats impairs hippocampal long-term potentiation. *Pediatr. Res.* 55, 372–379.
- Yamada, K.A., Rensing, N., Thio, L., 2005. Ketogenic diet reduces hypoglycemia-induced neuronal death in young rats. *Neurosci. Lett.* 385, 210–214.
- Yeh, H., Brown, T., Maruthur, N., Ranasinghe, P., Berger, Z., Suh, Y., Wilson, L., Harberl, E., Brick, J., Bass, E.B., Golden, S.H., 2012. Comparative effectiveness and safety of methods of insulin delivery and glucose monitoring for diabetes mellitus. A systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 157, 336–347.
- Zhou, D., Qian, J., Chang, H., Xi, B., 2012. Pyruvate administered to newborn rats with insulin-induced hypoglycemic brain injury reduces neuronal death and cognitive impairment. *Eur. J. Pediatr.* 171, 103–109.

Recurrent moderate hypoglycemia exacerbates oxidative damage and neuronal death leading to cognitive dysfunction after the hypoglycemic coma

Gabriela Languren, Teresa Montiel, Leticia Ramírez-Lugo, Israela Balderas, Gustavo Sánchez-Chávez, Francisco Sotres-Bayón, Federico Bermúdez-Rattoni and Lourdes Massieu

Abstract

Moderate recurrent hypoglycemia (RH) is frequent in Type 1 diabetes mellitus (T1DM) patients who are under intensive insulin therapy increasing the risk for severe hypoglycemia (SH). The consequences of RH are not well understood and its repercussions on neuronal damage and cognitive function after a subsequent episode of SH have been poorly investigated. In the current study, we have addressed this question and observed that previous RH during seven consecutive days exacerbated oxidative damage and neuronal death induced by a subsequent episode of SH accompanied by a short period of coma, in the parietal cortex, the striatum and mainly in the hippocampus. These changes correlated with a severe decrease in reduced glutathione content (GSH), and a significant spatial and contextual memory deficit. Administration of the antioxidant, N-acetyl-L-cysteine, (NAC) reduced neuronal death and prevented cognitive impairment. These results demonstrate that previous RH enhances brain vulnerability to acute hypoglycemia and suggests that this effect is mediated by the decline in the antioxidant defense and oxidative damage. The present results highlight the importance of an adequate control of moderate hypoglycemic episodes in T1DM.

Keywords

Diabetes, antioxidants, cognitive impairment/decline, glucose, hippocampus, hypoglycemia, risk factors, selective neuronal death

Received 3 March 2017; Revised 17 August 2017; Accepted 1 September 2017

Introduction

Glucose is the major metabolic substrate in brain and its continuous supply from blood is mandatory for its correct functioning. Repeated episodes of moderate hypoglycemia are frequently observed in 70–80% of Type-1 (T1DM) and 40% of Type-2 (T2DM) diabetes mellitus patients due to insulin therapy.^{1,2} Recurrent moderate hypoglycemia (RH; <70 – >55 mg/dl blood glucose) increases the risk for severe hypoglycemia (SH; <55 mg/dl), which has been reported in 36% and 7% of T1DM and T2DM patients, respectively, with an incidence of one episode per patient per year.^{3–5} Hypoglycemia is alleviated by the hormonal autonomic counter-regulatory response, which stimulates glycogenolysis and glyconeogenesis.^{6,7} This response is

blunted in T1DM patients, who are unable to respond to the autonomic signs of hypoglycemia (hypoglycemia unawareness).^{4,7,8} A single episode of hypoglycemia induces defective glucose counter-regulation, favoring recurrent hypoglycemia (RH) and increasing the patient's vulnerability to SH.^{6,9} Conversely, patients

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

Corresponding author:

Lourdes Massieu, Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México CP 04510, México.
Email: lmassieu@ifc.unam.mx

treated for SH are at risk for RH.¹⁰ SH can progress to seizures and the hypoglycemic coma in approximately 25% of the episodes.¹¹ A prolonged period of hypoglycemic coma induces oxidative stress and neuronal death^{12,13} and associates with cognitive dysfunction in rodents and humans.^{10,14–16} However, the effect of previous episodes of RH on brain damage induced by SH, is poorly understood.

Moderate hypoglycemia is more common than SH in T1DM patients, particularly in children and adolescents. Although not an immediate threat, a repeated history of RH might cause cognitive dysfunction.^{17,18} Studies show that RH in healthy animals induces synaptic alterations, oxidative stress and limited neuronal death in the cerebral cortex^{13,19,20} and even improvement of spatial memory.^{20–22} In diabetic animals, RH associates with increased cognitive deficit and oxidative damage, suggesting that diabetes exacerbates the damaging effects of hypoglycemia.^{13,23–25} Conversely, diabetes is associated with oxidative stress^{26,27} and cognitive decline, which might be enhanced by hypoglycemia.^{28–31}

The repercussions of RH on brain function after a subsequent episode of SH are not well understood. In the present study, we have addressed this question in healthy animals, precluding the influence of diabetic pathology. Results indicate that animals exposed to RH do not show neuronal death, oxidative damage or cognitive decline despite a partial decrease in the content of reduced glutathione (GSH) and increased lipoperoxidation (LPO). However, RH notably augmented oxidative damage and the number of dead cells in the cortex, the striatum and mainly in the hippocampus of animals exposed to a subsequent short period of hypoglycemic coma. These animals showed a large decrease in GSH content and severe cognitive impairment. Treatment with the antioxidant, N-acetyl-L-cysteine (NAC), significantly reduced neuronal death and prevented cognitive decline. The present results demonstrate that in non-diabetic animals, previous RH can enhance brain vulnerability to SH and suggest that this effect is mediated by a decrease in the antioxidant defense and oxidative damage.

Material and methods

Three-month-old male Wistar rats (280–300 g) obtained from Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México were treated according to The National Institute of Health Guide for the care and use of laboratory animals (NIH publication No.80-23 revised 1996), and experimental protocols were approved by the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of the IFC (LMT101-16). All efforts were made to minimize the number

of animals used. Animals were housed in individual cages under standard dark/light cycle and temperature conditions with food and water *ad libitum*. Experiments are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting in Vivo Experiments). A sample size of six to seven animals per group was used to achieve reliable statistical power and minimize the number of animals used.

Induction of recurrent moderate hypoglycemia

RH was induced (in the home cage) in non-anesthetized non-fasted animals receiving a daily intraperitoneal (i.p.) injection of 6.5 insulin units (IU, Humulin 70/30, Eli Lilly, Indianapolis, USA) between 11 and 12:00 a.m. during seven consecutive days, while control animals were injected with vehicle solution (0.1% acetic acid) (Supplementary Figure 1(a)). Moderate hypoglycemia was defined as blood glucose between 40 and 55 mg/dl, without loss of consciousness or seizures. Blood glucose was measured from the tail vein using a One Touch Ultra meter, every 60 min after insulin injection, and was maintained at 2.2–3.0 mM (40–55 mg/dl) for 2.5–3 h (Supplementary Figure 1(a)). Rats spontaneously recovered euglycemia after food addition. Twenty-four hours after the last hypoglycemic episode, animals were euthanized under pentobarbital overdose anesthesia and brains were prepared for histology (see below). Independent groups were used for behavioral tests (see below).

Induction of hypoglycemic coma (SH)

One week before the induction of hypoglycemia, animals were implanted with epidural electrodes under 2.5–3.0% isoflurane anesthesia for two channel (right and left hemispheres) electroencephalographic recordings (EEG). Meloxicam (1 mg/kg i.p) was used as post-surgery anesthesia. Before SH induction, food was restricted to four pellets overnight. For EEG recording, animals were maintained in acrylic special cages. The experimental animals were randomly distributed among the different experimental groups as follows: (1) SH: animals received an i.p injection of 32 IU (Humulin 70/30, Eli Lilly, Indianapolis, USA) and after 2–3 h of SH (blood glucose levels <1.0 mM), they lost their righting reflex and hypoglycemia was left to progress to EEG isoelectricity (coma) for 7–10 min. Animals were immediately rescued with an i.p. (300 μ l) bolus of 25% glucose in Krebs-Henseleit Buffer followed by a continuous intravenous perfusion at a rate of 1.5 ml/h during 3 h through the tail vein using a perfusion pump (Harvard Apparatus 22, South Natick, MA, USA) (Supplementary Figure 1(b)). (2) RH/SH: animals were treated with moderate

RH during seven days and 24 h after the last episode SH was induced and left to progress to 7–10 min coma. Immediately afterwards, rats were rescued with glucose as described above (Supplementary Figure 1(c)). (3) NAC: animals were identically treated to those of the RH/SH group, except that they received one subcutaneous administrations of 100 mg/kg NAC in distilled water (Sigma–Aldrich St. Louis MO, USA) 1 h after glucose reperfusion and one daily injection during the following four days (five total administrations at 2:00 p.m.). Experimental protocols are described in Supplementary Figure 1. Twenty-four hours after all treatments, animals were anesthetized (pentobarbital overdose) and intracardially perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.3; brains were extracted and fixed during 24 h in paraformaldehyde and transferred to a 20–30% sucrose gradient (24 and 72 h, respectively) and 25 μm coronal slides were obtained in a cryostat for histological analysis. Independent groups were treated and randomly distributed for behavioral tests; they were euthanized at the indicated times. Animals showing seizures (less than 10%) were discarded. One animal from the NAC group was discarded due to the lack of exploratory activity in the open field test.

Evaluation of neuronal death

Neuronal death ($n=68$ total animals, distributed as follows: $n=7$ per group evaluated at 24 h; $n=6$ per group evaluated at 5 days and $n=7$ per group evaluated at 16 days after the different treatments) was evaluated using Fluoro Jade B (FJB) for the identification of degenerating neurons, as described.³² Sections were imaged under a fluorescence microscope (Leica DM1000) using a FITC filter (395–590 nm). The total number of FJB-positive cells in the parietal cortex and the striatum was quantified in 18 coronal sections of 25 μm (3.20 to -4.20 from bregma), while 4 sections were used for the hippocampus. In this case, cells were counted in an area of 200 μm^2 of the different hippocampal subregions (CA1, CA3, dentate gyrus (DG) and hilus) using the Image J program. Data are expressed as the total number of degenerating cells in these four sections. Cell damage was confirmed by Nissl staining at 24 h ($n=7$ per group) and five days ($n=4$ per group), and the number of condensed darkly stained cells or pyknotic nuclei were counted in consecutive brain sections to those labeled with FJB. In the case of the NAC experiment, FJB and Nissl-positive cells were counted in three areas of 200 μm^2 of the DG comprising the inferior and superior blades and the crest of the DG. To monitor DNA fragmentation, the TUNEL Roche In Situ Cell Death Detection Kit was

used following the manufacturer instructions (Roche Applied Science, USA). Briefly, adjacent sections were blocked with 3% peroxide in methanol for 10 min at room temperature. Slides were incubated in a mixture containing sodium citrate 0.1%/triton 0.1% for 10 min followed by TUNEL reaction mixture (5 μl TdT enzyme, 5 μl Biotin-dUTP, 90 μl TdT buffer) for 90 min at 37°C. Slides were washed and counterstained with Hoechst (0.001% in PBS) for 10 min at room temperature to facilitate the identification of TUNEL-positive cells.

Immunohistochemistry

Twenty-four hours after the treatments ($n=7$ per group), oxidative protein modification was detected using polyclonal anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, USA) and monoclonal anti-3-Nitrotyrosine (Cayman Company, Ann Arbor Michigan, USA) antibodies. Coronal 25 μm sections were incubated with anti-4-HNE or anti-3-NT antibodies (1:200 dilution) for 72 h at 4°C and anti-mouse DyLight 594 or anti-rabbit DyLight 488 (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. West Grove, Pennsylvania, USA, 1:250 dilution) secondary antibodies, for 2 h at room temperature. Three sections per animal were examined and representative images were obtained by confocal microscopy (Leica TCS SP5) using a scanning mode for laser 488 and 546 nm. As a control for antibody specificity, brain sections were incubated with the secondary antibody in the absence of the primary antibody and immunoreactivity was observed.

LPO levels

Twenty-four hours after the treatments ($n=7$ per experimental group and $n=10$ control group), brain homogenates from parietal cortex, hippocampus and striatum were obtained to determine malondialdehyde (MDA) levels using the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) method as described in Haces et al.³³ Briefly brain tissues were homogenized in 0.5 ml of 1.15% KCL/0.4 mM sodium azide and incubated at 37°C for 20 min. Suspensions were centrifuged at 14,000 rpm, mixed with thiobarbituric acid at 0.75% (Merck, Darmstadt Germany) and incubated at 50°C for 20 min. The protein concentration was determined by Bradford's method and data are expressed as nmol MDA/mg of protein.

Reduced GSH determination

Reduced GSH ($n=3-7$) was determined using the fluorometric o-phthalaldehyde (OPA) method as

described by Senft et al.³⁴ 12 and 24 h after the treatments. Briefly, parietal cortex, hippocampus and striatum were dissected, weighed and homogenized in detection buffer containing 20 mM HCl, 5 mM DTPA and 10 mM ascorbic acid; samples were rapidly centrifuged at 20,000 rpm for 20 min. For GSH determination, 5% trichloroacetic acid, 7.5 mM N-ethylmaleimide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 100 μ l o-phthaldialdehyde (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (used as derivatizing agent to react with GSH) were added to 5 μ l supernatant. After mixing, samples were incubated at room temperature for 30 min. Fluorescence was read at 365 nm excitation and 430 nm emission. GSH concentrations were calculated and expressed as nmol/mg tissue based on standard curve.

Behavioral tests

Water maze

Forty-eight hours after the treatments, animals were habituated in an isolated testing room for 30 min. Rats ($n=7$ per group, 28 total animals) were trained (9:00 a.m.) during five days (five trials per day) in a circular pool divided in four quadrants where a platform was hidden 1 cm under the water at constant temperature (21°C) as described in Delint-Ramírez et al.³⁵ Twenty-four hours after the last day of training (7 days and 15 days after the SH), the memory test was performed. The platform was removed and animals were allowed to swim during 60 s. The latency and number of crossings through the quadrant where the platform was initially placed were recorded with the Ethovision video tracking.

Contextual fear conditioning

At 48 h after the treatments, different series of animals (treated and non-treated with NAC, $n=6-9$ per group, 33 total animals) were trained for contextual fear conditioning (9:00 a.m.) and they were tested 24 h later. This was carried out in standard operant chambers (Coulbourn Instruments) located inside sound-attenuating boxes (Med Associates) in an isolated testing room. The floor of the chambers consisted of stainless steel bars that delivered scrambled electric footshock. Between experiments, shock grids and floor trays were cleaned with soap and water, and the walls with wet paper towels as described in Sotres-Bayon et al.³⁶ On day 1, rats habituated during 5 min to the chamber were immediately followed by fear conditioning to the context consisting of five 2 s, 0.8 mA foot shocks. The interval between successive foot shocks was variable with an average of 2 min. The next day (day 2), rats were tested

for contextual fear conditioning memory during 10 min. Behavior was recorded with digital video cameras. Freezing was used as a measure of conditioned fear. Freezing was defined as the absence of all movement except for those related to breathing. The amount of time spent freezing to the context was expressed as a percentage of the total time in the chamber.

Open field

Twenty-four hours after contextual fear conditioning memory test (10:00 a.m.), rats were placed at the center of a wooden open arena (90 cm length \times 90 cm width \times 60 cm height) with a textured floor illuminated by 22 lux of intensity. Grid lines drawn on the floor of the arena (30 \times 30 cm) divided it into a peripheral region (within 60 cm of the walls) and a central region (30 \times 30 cm) of approximately equal area. Behavior was recorded for 10 min with a digital video camera and analyzed with commercially available video tracking software (ANY-maze, Stoelting). The total distance traveled (cm) was taken as an index of the locomotor activity and the number of entries to the center of open field as an anxiety index.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of the mean) and analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least multiple comparison test, except for neuronal damage comparisons between NAC-treated and non-treated groups, which were compared by Student's *t* test. Behavioral tests were analyzed by the Kruskal-Wallis non-parametric test for Water Maze and Tukey for fear conditioning.

Results

Changes in blood glucose and EEG recordings

No significant differences were found in mean basal blood glucose concentration (99.66 ± 1.20 mg/dl) among the different animal groups. In animals exposed to RH blood, glucose declined to 40 mg/dl 30 min after insulin administration and remained between 40 and 45 mg/dl during the following 3 h. Glucose was recovered after food addition (Supplementary Figure 2(a)). The daily mean blood glucose concentration reached during the 3-h period of moderate hypoglycemia was 40 mg/dl (Supplementary Figure 2(b)). In animals exposed to SH alone and to RH/SH, glucose concentration rapidly declined after 30 min insulin administration and remained ≤ 20 mg/dl during the next 2.5–3.0 h up to isoelectricity. It partially recovered 1 h after glucose reperfusion and at 24 h it reached control values in

all animals groups (Supplementary Figure 2(a)). Basal cerebral activity was recorded for 30 min before insulin administration and no differences were observed between the groups. After 2–3 h, the EEG characteristic changes of hypoglycemia reported in previous studies were observed.³³ When glucose was close to 20 mg/dl, electrical brain activity slowed and was completely absent during the coma period. Normal brain activity was recovered 1 h after glucose reperfusion (Supplementary Figure 2(c)).

Neuronal death induced by the hypoglycemic coma is exacerbated by previous RH

Figures 1 to 2 show the number of degenerating cells at 24 h and 16 days after the induction of coma. No degenerating cells were observed in animals from the control and RH groups in any of the regions studied (Figures 1(a) and (c) and 2(a)). Twenty-four hours after

the animals were exposed to the hypoglycemic coma (9.5 ± 0.54 min) alone (SH), degenerating cells were observed in the parietal cortex and the dorsolateral striatum (Figure 1), while in the hippocampus, degenerating cells were observed only in the crest of DG in 50% of these animals (Figure 2(a), (b) and (d)). Animals examined 16 days after the coma (8.0 ± 0.36 min), showed a lower number of FJB-positive cells in the parietal cortex and the striatum (Figure 1(b) and (d)), while in the crest of the DG, FJB-positive cells were no longer visible (Figure 2(c)).

Animals exposed to coma (9.5 ± 0.20 min) and previously treated with RH (RH/SH), exhibited a significant increase in the number of degenerating cells in the parietal cortex and the striatum as compared to those treated with SH alone at 24 h. This increase was also observed when animals were examined 16 days after RH/SH (7.28 ± 0.42 min of coma) (Figure 1(b) and (d)). Representative micrographs showing FJB-positive

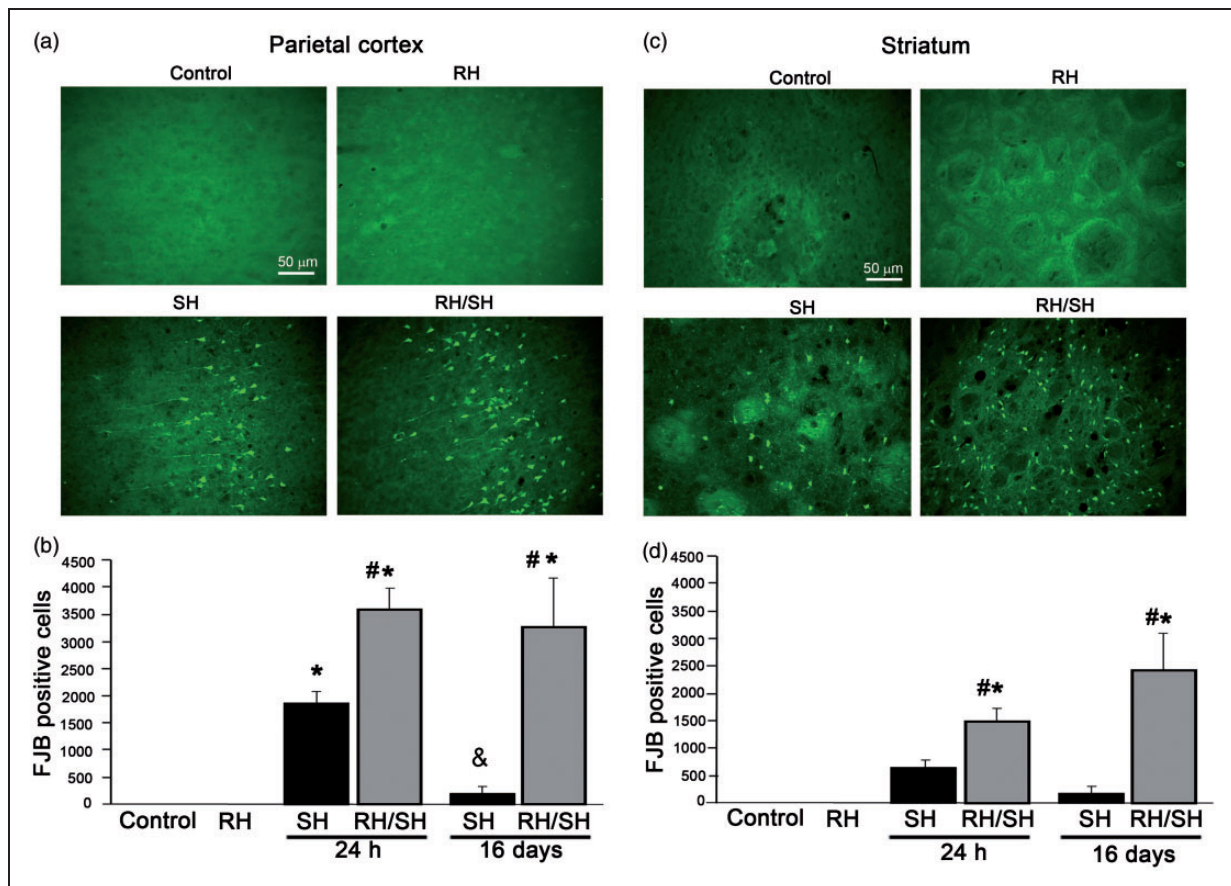


Figure 1. Neuronal death induced by the hypoglycemic coma in the parietal cortex and the striatum is exacerbated by antecedent RH. Neuronal death was evaluated 24 h and 16 days after the treatments and the number of FJB-positive cells was counted. Representative micrographs showing no FJB-positive in control and RH-treated animals and degenerating cells in the parietal cortex (a) and the striatum (c) of animals exposed to SH and RH/SH. (b–d) Cell death was exacerbated in animals exposed to RH/SH at 24 h and 16 days after the treatments. Data are expressed as mean \pm SEM from seven animals per group. * $p < 0.0001$ relative to control and RH, # $p < 0.0001$ relative to SH.

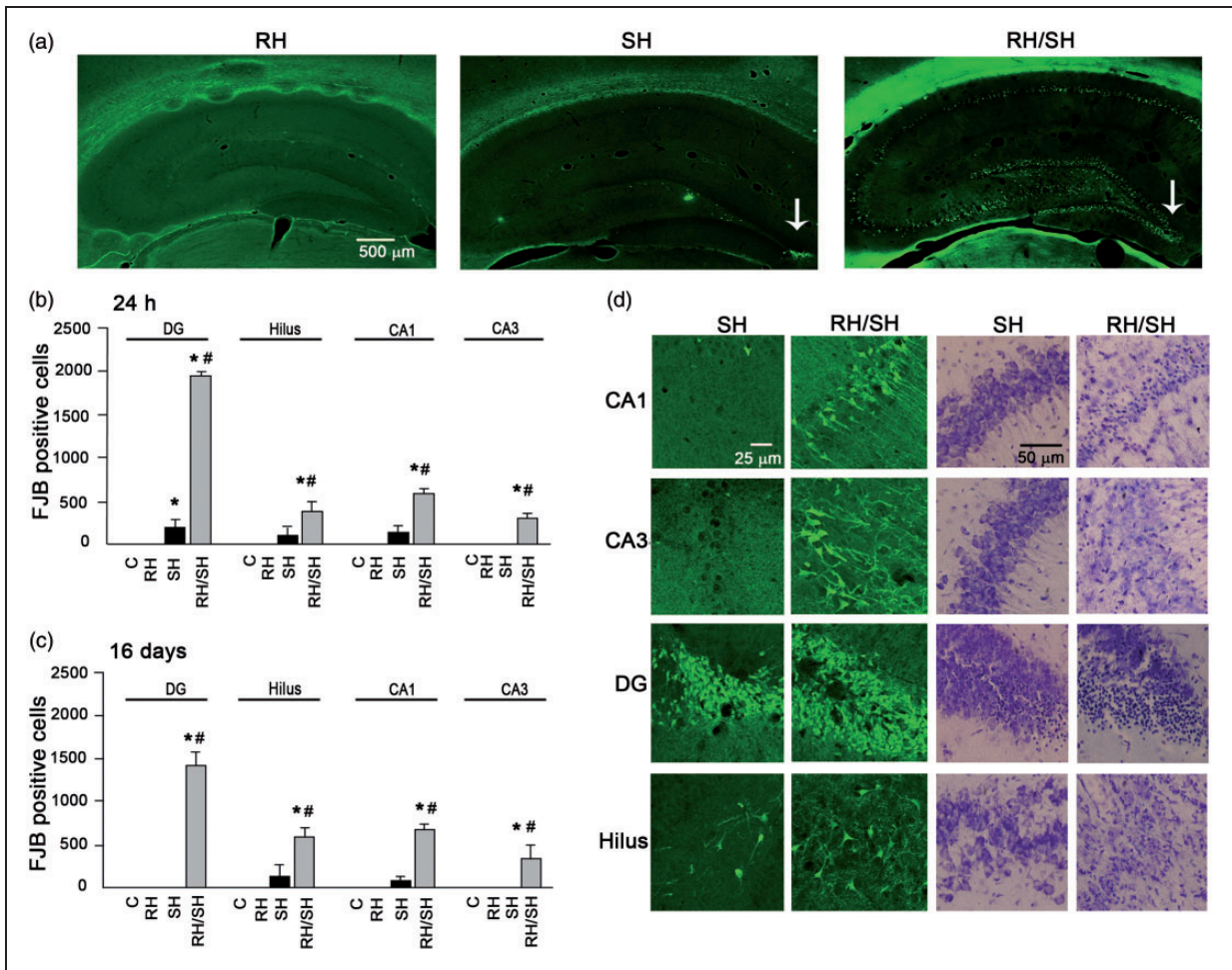


Figure 2. Neuronal death induced by the hypoglycemic coma in the hippocampus is exacerbated by antecedent RH. Neuronal death was evaluated 24 h or 16 days after the different treatments in brain sections stained with Nissl or FJB. (a) Representative micrographs showing degenerating cells only in the crest of the DG of animals exposed to SH and extensive neuronal death in animals from the RH/SH group. (b–c) Quantitative data showing exacerbated neuronal death in animals exposed to RH/SH at 24 h or 16 days. (d) Representative micrographs showing FJB-positive and pyknotic cells in the different hippocampal subregions of rats exposed to the different treatments. Data are expressed as mean \pm SEM from seven animals per group. * $p < 0.0001$ relative to control and RH, # $p < 0.0001$ relative to SH.

cells of animals exposed to the different treatments are shown in Figure 1(a) and (c). Similarly, the hippocampus showed a dramatic elevation in the number of degenerating neurons, which were present not only in the crest of the DG but also in the superior and inferior blades of the DG, the hilus, CA1 and CA3 (Figure 2(a)). This increase was statistically different relative to the SH group at 24h and 16 days in all hippocampal regions (Figure 2(b) and (c)). These results were corroborated by the quantification of pyknotic cells in Nissl-stained sections (Supplementary Figure 3). Representative micrographs showing degenerating neurons in animals exposed to the different treatments are shown in Figure 2(a) and (d). The presence of pyknotic cells correlated with FJB

labeling in the parietal cortex, the striatum (not shown) and the hippocampus (Figure 2(d)). Similarly, TUNEL-positive nuclei, indicative of DNA fragmentation were found in the parietal cortex, the striatum (Supplementary Figure 4) and the hippocampus (Figure 3(a)) of animals of the RH/SH group, while in animals exposed to coma alone, TUNEL-positive nuclei were observed only in the DG (Figure 3(b)). In control and RH groups, no TUNEL-positive nuclei were observed in any region (Supplementary Figure 4). Altogether, these observations indicate that RH increases the vulnerability to neuronal death in the parietal cortex, the striatum and mainly in the hippocampus of animals exposed to a subsequent short period of coma.

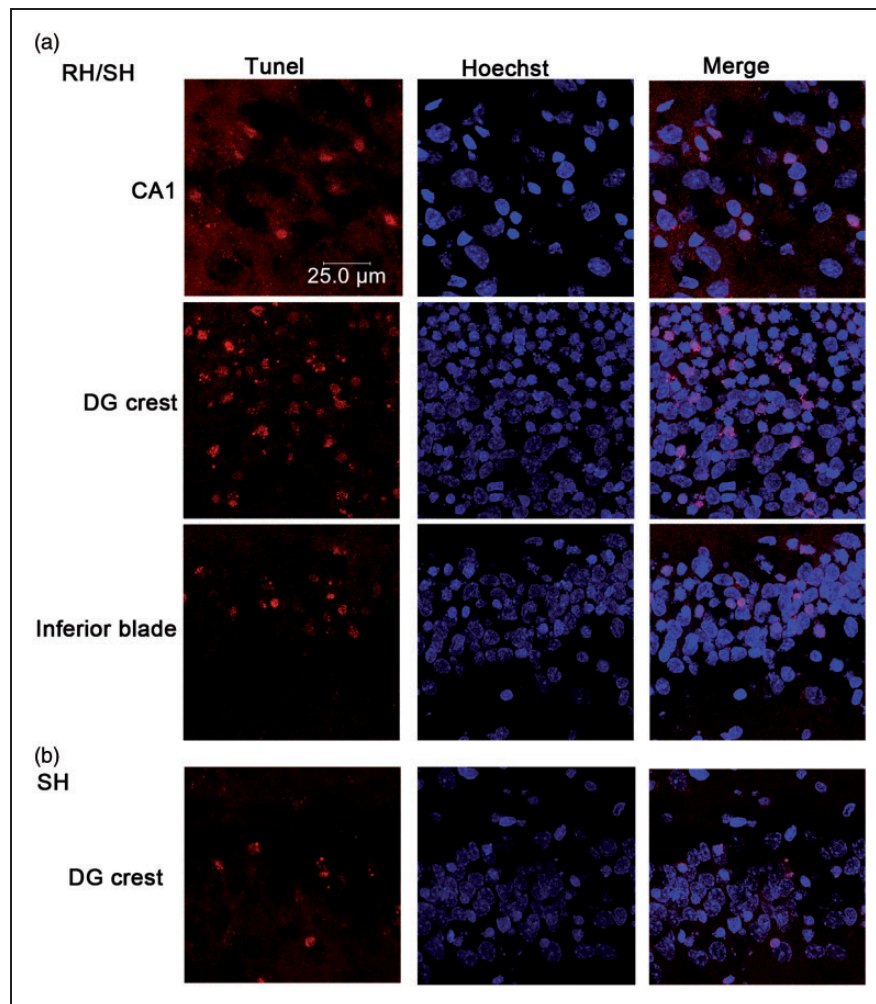


Figure 3. DNA fragmentation induced by the hypoglycemic coma is exacerbated by RH. The presence of DNA fragmentation was examined by the TUNEL assay and Hoechst was used as counterstain. (a) Representative micrographs showing TUNEL-positive cells in CA1 and the DG of rats treated with RH/SH. (b) In rats exposed to SH alone TUNEL-positive were detected only in the crest of the DG.

RH aggravates cognitive impairment induced by the hypoglycemic coma

According to the above-described results, RH notably enhanced neuronal death induced by the hypoglycemic coma in the hippocampus. Therefore, we aimed to test whether animals exposed to RH/SH showed memory impairment using two hippocampal-dependent memory tests. Figure 4(a) shows that during the five days of training in the water maze, the latency to locate the platform decreased similarly in all experimental groups indicating no difference in learning acquisition. At seven days after the coma, the SH and the RH/SH groups exhibited a significant decrease in number of crossings relative to controls, while animals exposed to RH alone showed no significant decrease (Figure 4(b)). At 15 days after the coma, only animals

from the RH/SH showed a significant decrease in the number of crossings suggesting a long-term change in spatial memory (Figure 4(c)).

Figure 4(d) shows the performance of animals on the contextual fear conditioning. No statistical differences were found during contextual fear acquisition (day 1) since a similar percent freezing was observed in all groups. In the retrieval test (day 2), only the RH/SH group showed a significant decrease in the percent freezing relative to the control and the RH groups (Figure 4(d) right panel). No changes in locomotor activity and anxiety were found in any of the groups (Figure 4(e) and (f)). These data are in agreement with the spatial memory test and suggest that RH preceding the hypoglycemic coma exacerbates cognitive decline, which correlates with the presence of degenerating neurons in the hippocampus.

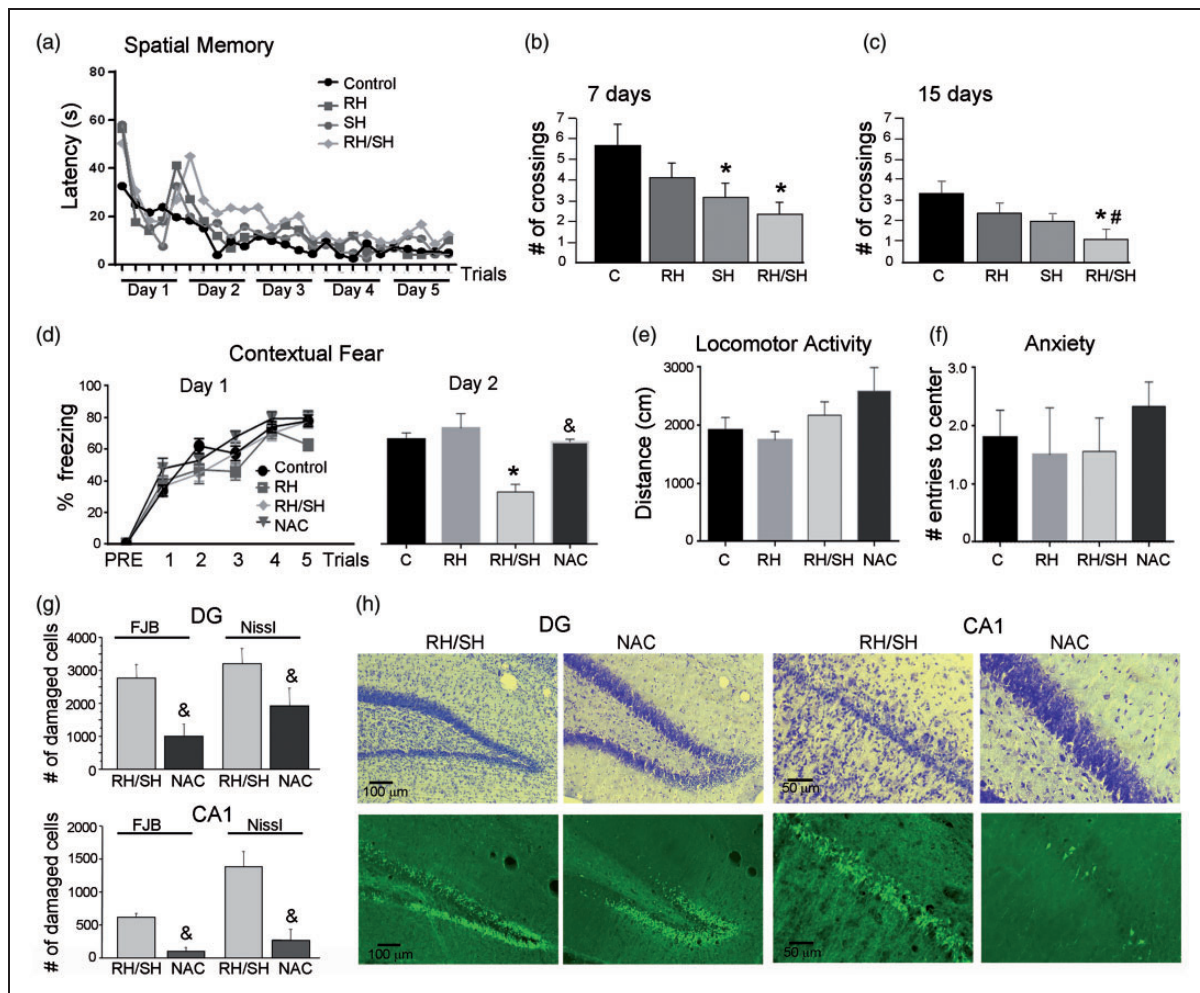


Figure 4. Previous RH aggravates cognitive impairment induced by the hypoglycemic coma. Spatial memory test (Water maze) was performed 7 and 15 days after the treatments. (a) Learning curve of animals exposed to the different treatments. (b) At day 7, animals of the SH and RH/SH groups showed a decrease in the number of crossings. (c) At 15 days, only animals of the RH/SH group showed a significant decrease in the number of crossings. Data are expressed as mean \pm SEM from seven animals per group. * $p < 0.01$ relative to control # $p < 0.05$ relative to SH. Contextual fear conditioning test was performed 48 h after the treatments. (d) No statistical differences between the groups were observed in the acquisition phase (day 1). The RH/SH group showed a significant decrease, while the NAC group showed no change in the percent freezing relative to control and RH groups during retrieval (day 2). Data are expressed as mean \pm SEM from six to nine animals per group. * $p < 0.0001$ relative to control and RH # $p < 0.05$ relative RH/SH. (e) No significant changes were observed between groups in (e) locomotor activity and (f) anxiety tests. (g) Number of damaged cells (FJB-positive group and pyknotic Nissl stained) in the dentate gyrus (DG) and CA1 of animals of the RS/SH and the NAC groups, 24 h after the fear-conditioning test. Data are expressed as mean \pm SEM from four to six animals per group. # $p < 0.002$ relative to RH/SH). (h) Representative images showing the protective effect induced by NAC administration against cell damage (FJB-positive cell and pyknotic cells in Nissl stained section) induced in the DG and CA1 after exposure to RH/SH.

RH preceding the hypoglycemic coma induces oxidative damage

Oxidative stress has been highly implicated in neuronal death induced by the hypoglycemic coma.^{12,32,33,37} Therefore, we aimed to evaluate the presence of the LPO product 4-HNE and 3-NT residues in proteins by immunohistochemistry. 4-HNE positive cells were observed in the parietal cortex, the striatum and all

hippocampal subregions of animals of the RH/SH group, while in the control, RH and SH groups, 4-HNE immunoreactivity was not observed (Figure 5). As shown in the Figure 6, 3-NT-positive cells were observed mainly in the parietal cortex, DG and hilus of animals exposed to RH/SH. In contrast, no 3-NT immunoreactivity was observed in control, and RH groups, and only a few cells were observed in the parietal cortex of some animals of the SH group (Figure 6).

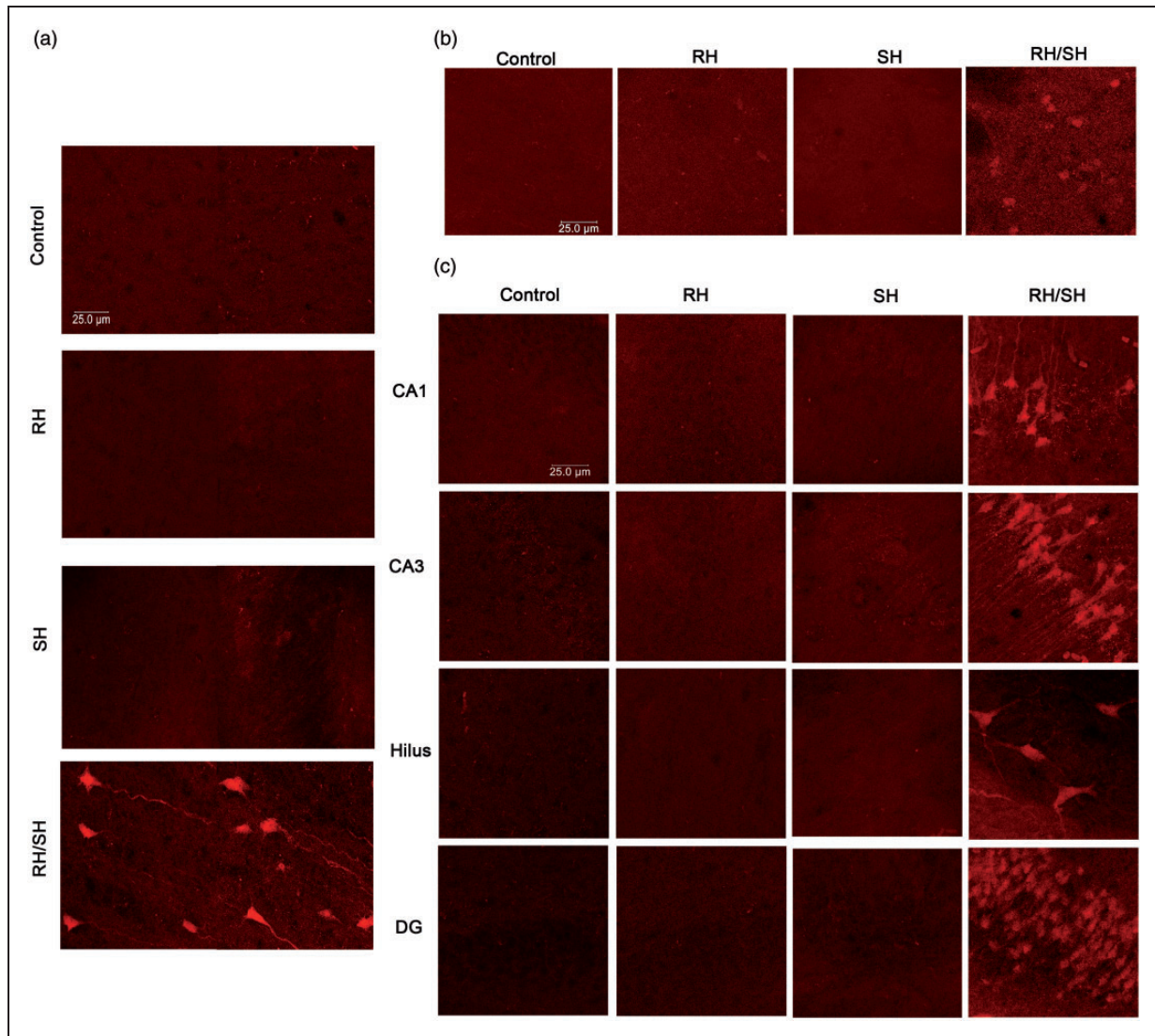


Figure 5. Immunoreactivity to 4-HNE in the brain of animals exposed to RH/SH. Representative fluorescent images showing the presence of 4-HNE-positive cells in (a) parietal cortex, (b) striatum and (c) hippocampus of animals treated with RH/SH. No 4-HNE-positive cells were detected in control, RH and SH groups.

Results suggest that RH facilitates oxidative damage to proteins in animals exposed to a subsequent short period of coma, which correlates with the presence of cell death.

Then we aimed to investigate whether a decrease in reduced GSH, the major antioxidant defense in brain, was involved in oxidative damage observed in animals treated with RH/SH. As observed in Figure 7, RH induced a partial (from 23 to 30%) but significant decrease in GSH, while animals of the RH/SH group showed a further decrease (from 49 to 58%) in GSH in all brain regions, the largest change was observed in the hippocampus (58%). The changes in GSH content were observed at 12 h after the end of treatments and were maintained at 24 h in all regions.

These results suggest that a reduction in GSH contributes to enhanced oxidative damage in animals from the RH/SH group. Supporting this hypothesis, we observed that treatment with the antioxidant NAC, completely prevented cognitive decline in the contextual fear conditioning test (Figure 4(d)) and reduced hippocampal neuronal damage (Figure 4(g) and (h)). The number of pyknotic neurons and neurons positive to FJB was significantly reduced in the DG, CA1 (Figure 4(g) and (h)), CA3 and hilus (not shown). In the RH group, a significant increase in LPO was observed in all brain regions studied (Supplementary Figure 5); however, as in the case of GSH, increased LPO did not correlate with oxidative damage in these animals.

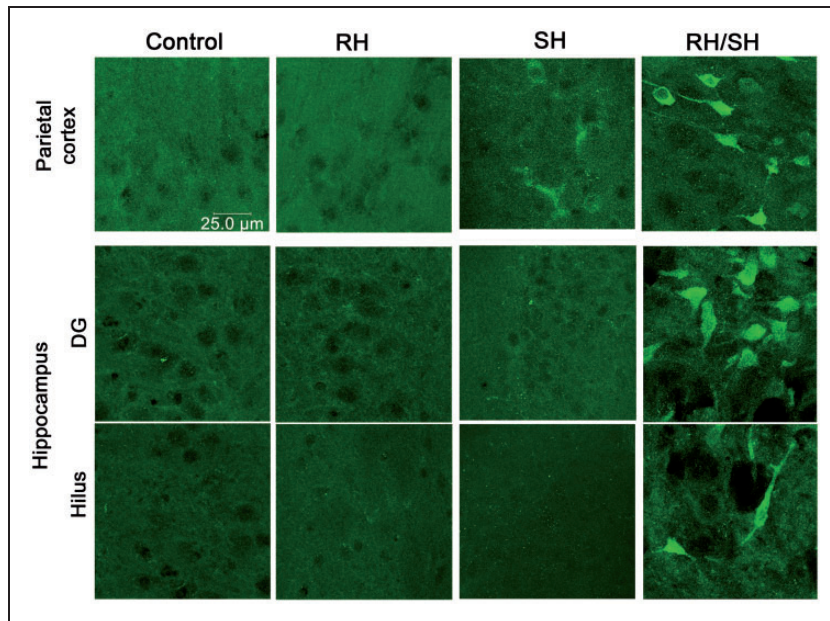


Figure 6. Immunoreactivity to 3-NT in the brain of animals exposed to RH/SH. Representative fluorescent images showing the presence of 3-NT-positive cells in the parietal cortex and the hippocampus of animals treated with RH/SH. No 3-NT-positive cells were detected in control and RH groups and only a few cells were observed in the parietal cortex of animals of the SH groups.

Discussion

T1DM is a long-term disease frequently diagnosed during infancy and a 3–4% annual increase rate in children and adolescents has been estimated in Europe.^{3,18} T1DM patients under strict insulin treatment can show one to two episodes per week of moderate hypoglycemia, which increases the risk for SH (one episode per year) due to a blunted counter-regulatory hormonal response and hypoglycemia unawareness.^{1–5} Mild to moderate hypoglycemia has been described as blood glucose < 70 mg/dl and > 55 mg/dl without loss of consciousness, while SH is considered when blood glucose falls below 50 mg/dl, is accompanied by seizures, altered consciousness or coma and requires external assistance for treatment with carbohydrates or glucagon.^{3,37,38} Hypoglycemic episodes can last for several hours (from 1 to 5 h), as those reported during nocturnal hypoglycemia.³⁹ T1DM patients are exposed to mild RH for a life-time, and although at moderate levels, hypoglycemia has not been considered a potential threat, its consequences on brain function either alone or when it is followed by an episode of SH, are unknown so far. In the present study, we have addressed this question in a short-term period and as such, the frequency of moderate hypoglycemia was increased to seven consecutive episodes. To mimic T1DM patient's condition, moderate hypoglycemia periods were induced by decreasing blood glucose to 55–40 mg/dl during 2.5–3 h, without loss of

consciousness or seizures and spontaneous recovery of euglycemia after food addition. SH was induced by the fall in blood glucose to 20 mg/dl or below accompanied by 7–10 min of EEG isoelectricity (coma state).

The most important finding of the present study is that previous RH exacerbates oxidative damage and neuronal death, leading to memory impairment in animals subsequently exposed to a short period of coma. In previous studies, we have demonstrated that short 5–10 min coma episodes induce neuronal death mainly in the parietal cortex but not in the hippocampus except for the crest of the DG.^{32,33} In the present study, we demonstrate that animals exposed to a brief period of coma, which were previously treated with RH, show enhanced neuronal death in the parietal cortex and the striatum, but notably in the hippocampus, where degenerating and pyknotic cells are present in all hippocampal subregions. Degenerating neurons were observed even 16 days after the coma and correlated with deficient spatial memory. Cognitive decline was confirmed by defective performance in the contextual fear-conditioning retrieval test and interestingly we observed that in both spatial and contextual memory tests, mainly the consolidation of memory was impaired. When animals were exposed to coma alone (SH), only a transitory memory decline was present, consistent with the lack of degenerating neurons in the hippocampus, except for a small population of cells in the crest of the DG. Previous studies have implicated oxidative stress in neuronal death after

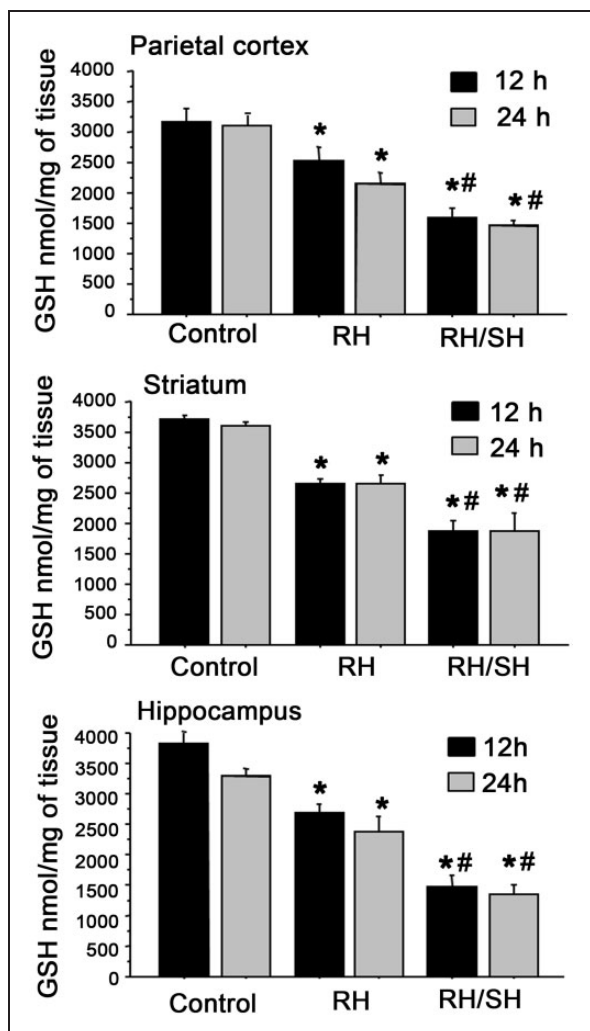


Figure 7. Changes in GSH content after RH and RH/SH. Animals were exposed to the different treatments and 12 and 24 h later reduced GSH levels were measured in different brain regions. Animals exposed to RH show a significant moderate decrease in reduced GSH in all brain regions, which is further decreased in animals from the RH/SH group ($n = 3-7$ animals per group). Data are expressed in means \pm SEM. * $p < 0.01$ relative to control; # $p < 0.01$ relative to RH.

a prolonged period of hypoglycemic coma.^{12,13,40,41} In agreement, we observed immunoreactive cells to 4-HNE and 3-NT in brain regions showing dead cells in animals treated with RH/SH. 4-HNE and 3-NT react with proteins altering their function.^{42,43} Thus, neuronal death correlates with oxidative alteration of proteins, which might be caused by a deficient antioxidant defense, based on the significant reduction in GSH content in all brain regions. Supporting this conclusion, it was observed that animals treated with NAC showed a significant reduction in the number of degenerating neurons and pyknotic cells in the hippocampus and no memory deficit in the contextual fear-conditioning

test. GSH is the main antioxidant defense in the nervous system and its decrease is associated with oxidative stress and cell damage.^{44,45} In addition, NAC has been demonstrated to have antioxidant actions and to restore GSH levels in rodents' brain after systemic administration.⁴⁶ Furthermore, it was recently reported that treatment with NAC prevents neuronal damage induced by a prolonged period of hypoglycemic coma.⁴¹ Besides a deficient antioxidant defense, decreased glucose brain metabolism might also contribute to exacerbated hypoglycemic neuronal death induced by antecedent RH. A previous study has shown that three consecutive episodes of antecedent hypoglycemia result in decreased glucose oxidation in the brain of animals tested under acute hypoglycemia.⁴⁷

The observed enhancement of hypoglycemic neuronal damage induced by antecedent RH, is in agreement with previous studies showing that exposure to RH in diabetic rats exacerbates brain injury induced by a short period of acute ischemia. This effect correlates with mitochondrial superoxide production implicating oxidative stress.⁴⁸ In contrast, a previous study showed that previous RH during three days elicited a preconditioning effect, reducing the number of degenerating neurons and preventing cognitive impairment induced by acute hypoglycemia in non-diabetic animals.⁴⁹ However, in that study, the presence of seizures possibly highly contributed to neuronal death, masking the effect of RH on hypoglycemic damage. In addition, a lower number of moderate hypoglycemic periods was used.

Rats treated with RH alone showed a partial decrease in GSH, which correlated with increased LPO but no oxidative damage, cell death or cognitive decline. The absence of neuronal death in this group of animals might result from the lack of glucose infusion since they were allowed to recover euglycemia after food addition. It is well known that glucose reperfusion plays a major role in neuronal death, mainly when blood glucose exceeds physiological levels resulting in hyperglycemia.^{40,50,51} Previous data have reported a decrease in GSH content even after a single episode of moderate hypoglycemia,⁵² and some studies have shown that RH in healthy animals produces an increase in LPO and 4-HNE immunoreactivity, without leading to significant neuronal death or cognitive decline.^{13,19,25} Furthermore, studies have reported that RH in healthy animals can even improve cognitive performance due to synaptic changes and brain metabolic adaptations.^{20,21,22,53}

In summary, the present results demonstrate that previous RH can have an adverse effect on subsequent SH in healthy animals, and suggests that this effect is mediated by the decline in the antioxidant defense and oxidative damage. It is expected that the consequences of RH treatment used in the present conditions could

be aggravated under diabetic conditions. Recent studies have demonstrated that the effects of RH on oxidative stress and the antioxidant defense are exacerbated in diabetic animals, enhancing cognitive decline.^{13,24,25,54} Furthermore, depletion of Nrf2, a major transcription factor regulating the antioxidant defense, exacerbates RH-induced oxidative damage to proteins and cognitive decline in control and diabetic animals.²⁵

The present observations demonstrate that RH renders the brain and particularly the hippocampus, more vulnerable to oxidative damage and neuronal death induced by a subsequent episode of hypoglycemic coma, ultimately leading to cognitive dysfunction. These observations highlight the relevance of the history of hypoglycemic episodes in T1DM patients and help us to estimate the consequences of RH on a subsequent episode of SH.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by CB239607 CONACYT grant to LM, CB250870 and 176639 CONACYT grants to FB-R and FS-B. GL was supported by CONACYT fellowship 363968.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Ruth Rincón-Heredia for her valuable help in confocal imaging, Gianfranco Chávez Marchetta for his help in Water Maze assays and Francisco Pérez Eugenio for computer facilities. GL performed this study in partial fulfillment of the requirements of the Programa de Doctorado en Psicología at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Authors' contributions

LM and GL conceived the study, analyzed all data and wrote the manuscript. GL performed all experiments; TM performed all hypoglycemic treatments, contributed to data analysis and provided technical assistance; LR-L and FS-B participated in the contextual fear-conditioning experiments, data analysis and results interpretation; IB and FB-R participated in water maze experiments, data analysis and results interpretations; GS-C provided technical assistance and participated in manuscript revision. All authors participated in discussions and critically reviewed the manuscript.

Supplementary material

Supplementary material for this paper can be found at the journal website: <http://journals.sagepub.com/home/jcb>

References

1. Donnelly LA, Morris AD, Frier BM, et al. Frequency and predictors of hypoglycaemia in Type 1 and insulin-treated type 2 diabetes: a population-based study. *Diab Med* 2005; 22: 749–755.
2. Heller S, Colagiuri S, Vaaler S, et al. Hypoglycaemia with insulin aspart: a doubleblind randomised, crossover trial in subjects with Type 1 diabetes. *Diab Med* 2004; 21: 769–775.
3. Blasetti A, Di Giulio C, Tocco AM, et al. Variables associated with severe hypoglycemia in children and adolescents with Type 1 diabetes: a population-based study. *Pediatr Diab* 2011; 12: 4–10.
4. Frier BM. Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10: 711–722.
5. Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, et al. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: an integrated view. *Neurochem Int* 2013; 63: 331–343.
6. Cryer PE. Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116: 1470–1473.
7. Tesfaye N and Seaquist ER. Neuroendocrine responses to hypoglycemia. *Ann Acad Sci* 2010; 1212: 12–28.
8. Beall C, Michael L, McCrimmon A, et al. The physiology and pathophysiology of the neural control of the counter-regulatory response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 202: 215–223.
9. Jensen VF, Bogh IV and Lykesfeldt J. Effect of insulin-induced hypoglycemia on the central nervous system: evidence from experimental studies. *J Neuroendocrinol* 2014; 26: 123–150.
10. Lin YY, Hsu CW, Sheu W, et al. Risk factors for recurrent hypoglycemia induced in hospitalized diabetic patients admitted for severe hypoglycemia. *Yonsei Med J* 2010; 51: 367–374.
11. Strachan MWJ. Frequency, causes and risk factors for hypoglycaemia in type 1 diabetes. In: Frier BM, Heller SR and McCrimmon R (eds) *Hypoglycaemia in clinical diabetes*, 3rd ed. eBook. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2014, pp.63–95.
12. Suh SW, Hamby AM, Gum ET, et al. Sequential release of nitric oxide, zinc and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1697–1706.
13. Won SJ, Yoo BH, Kauppinen TM, et al. Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 1–45.
14. Suh S, Aoyama K, Matsumori Y, et al. Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes* 2005; 54: 1452–1458.
15. Fujioka M, Okuchi K, Hiramatsu K, et al. Specific changes in human brain after hypoglycemic injury. *Stroke* 1997; 28: 584–587.
16. Xu C, Yogaratman J, Lua R, et al. Persistent, severe hypoglycemia-induced organic brain syndrome with neurological sequelae: a case report. *Gen Hosp Psychiatr* 2011; 33: 411–412.

17. Perantie DC, Lim A, Wu J, et al. Effects of prior hypoglycemia and hyperglycemia on cognition in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diab* 2008; 9: 87–95.
18. Franchini S, Comegna L, Prezioso G, et al. Hypoglycemia in children with type 1 diabetes: unawareness is a concrete risk. *Curr Med Res Opin* 2016; 32: 1487–1491.
19. Yamada KA, Rensing N, Izumi Y, et al. Repetitive hypoglycemia in young rats impairs hippocampal long-term potentiation. *Pediatr Res* 2004; 55: 372–379.
20. McNay EC, Williamson A, McCrimmon R, et al. Cognitive and neural hippocampal effects of long-term moderate recurrent hypoglycemia. *Diabetes* 2006; 55: 1088–1095.
21. McNay EC and Sherwin RS. Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes* 2004; 53: 418–425.
22. Osborne DM, ÓLeary KE, Fitzgerald DP, et al. Context-dependent memory following recurrent hypoglycaemia in non-diabetic rats is mediated via glucocorticoid signaling in the dorsal hippocampus. *Diabetologia* 2016; 60: 182–191.
23. Bree AJ, Puente EC, Daphna-Iken D, et al. Diabetes increases brain damage caused by severe hypoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: 194–201.
24. Cardoso S, Santos RX, Correia SC, et al. Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiol Dis* 2012; 49: 1–12.
25. McNeilly AD, Gallagher JR, Dinkova-Kostova AT, et al. Nrf2-mediated neuroprotection against recurrent hypoglycemia is insufficient to prevent cognitive impairment in a rodent model of Type 1 diabetes. *Diabetes* 2016; 65: 3151–3160.
26. McGrowder DA, Anderson-Jackson L and Crawford T. Biochemical evaluation of oxidative stress. In: Escher AP and Li A (eds) *Type 1 diabetes*. Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher, 2013; pp.223–248. <http://dx.doi.org/10.5772/45927>.
27. Kumar P, Rao N, Bhusan Pal B, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress induces apoptosis by inhibiting PI3-kinase/Akt and ERK 1/2 MAPK mediated signaling pathway causing downregulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 53: 302–319.
28. Gold A, Macleod K, Deary I, et al. Hypoglycemia-induced cognitive dysfunction in diabetes mellitus: effect of hypoglycemia unawareness. *Physiol Behav* 1995; 58: 501–511.
29. Kirchhoff BA, Lugar HM, Smith SE, et al. Hypoglycemia-induced changes in regional brain volume and memory function. *Diab Med* 2013; 30: 151–156.
30. Moheet A, Mangia S and Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1353: 60–71.
31. Kirchhoff BA, Jundt DK, Doty T, et al. A longitudinal investigation of cognitive function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diab* 2016; 12414: 1–7.
32. Julio Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, et al. Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 851–860.
33. Haces ML, Montiel T and Massieu L. Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neurosci* 2010; 165: 28–38.
34. Senft AP, Dalton TP and Shertzer HG. Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-Phthalaldehyde. *Anal Biochem* 2000; 280: 80–86.
35. Delint-Ramírez I, Salcedo-Tello P and Bermúdez-Rattoni F. Spatial memory formation induced recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J Neurochem* 2008; 106: 1658–1668.
36. Sotres-Bayón F, Sierra-Mercado D, Paredilla-Delgado, et al. Gating of fear in prefrontal cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron* 2012; 76: 804–812.
37. Ryan C, Gurtunca N and Becker D. Hypoglycemia: a complication of diabetes therapy in children. *Pediatr Clin N Am* 2005; 52: 1705–1733.
38. Festa A, Heller S, Seaquist E, et al. Association between mild and severe hypoglycemia in people with type 2 diabetes initiating insulin. *J Diab Complicat* 2017; 31: 1047–1052.
39. Yale J. Nocturnal hypoglycemia in patients with insulin-treated diabetes. *Diab Res Clin Pract* 2004; 65S: S41–S46.
40. Suh SW, Gum ET, Hamby AM, et al. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 2007; 117: 910–918.
41. Kho AR, Choi BY, Kim JH, et al. Prevention of hypoglycemia-induced hippocampal neuronal death by N-acetyl-L-Cysteine (NAC). *Amino Acids* 2016; 49: 367–378.
42. Ullery C and Marnett LJ. Protein modification by oxidized phospholipids and hydrolytically released lipid electrophiles: investigating cellular response. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818: 2424–2442.
43. Radi R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 2013; 46: 550–559.
44. Dringen R, Gutterer JM and Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000; 16: 4912–4916.
45. Baxter PS and Hardingham PE. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defenses by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med* 2016; 100: 147–152.
46. Reyes R, Cittolin-Santos G, Kim J, et al. Neuronal glutathione content and antioxidant capacity can be normalized *In Situ* by N-acetyl Cysteine concentrations attained in human cerebrospinal fluid. *Neurotherapeutics* 2016; 13: 217–225.
47. Jiang L, Herzog RI, Mason GF, et al. Recurrent antecedent hypoglycemia alters neuronal oxidative metabolism in vivo. *Diabetes* 2009; 58: 1266–1274.

48. Dave KR, Tamariz J, Desai KM, et al. Recurrent hypoglycemia exacerbates cerebral ischemic damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Stroke* 2011; 42: 1404–1411.
49. Puente EC, Silverstein J, Bree AJ, et al. Recurrent moderate hypoglycemia ameliorates brain damage and cognitive dysfunction induced by severe hypoglycemia. *Diabetes* 2010; 59: 1055–1062.
50. Ennis K, Dotterman H, Stein A, et al. Hyperglycemia accentuates and ketonemia attenuates hypoglycemia-induced neuronal injury in the developing rat brain. *Pediatr Res* 2015; 77: 84–90.
51. Rao R, Ennis K, Mitchell P, et al. Recurrent moderate hypoglycemia suppresses brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex and impairs sensorimotor gating in the post-hypoglycemia period in young rats. *Dev Neurosci* 2016; 38: 74–82.
52. Rao A, Quach H, Smith E, et al. Changes in ascorbate, glutathione and α -tocopherol concentrations in the brain regions during normal development and moderate hypoglycemia in rats. *Neurosci Lett* 2014; 568: 67–71.
53. Canada S, Weaver S, Sharpe S, et al. Brain glycogen supercompensation in the mouse after recovery from insulin-induced hypoglycemia. *J Neurosci Res* 2011; 4: 585–591.
54. Choi BY, Kim JH, Kim HJ, et al. Pyruvate administration reduces recurrent/moderate hypoglycemia-induced cortical neuron death in diabetic rats. *PLoS One* 2013; 8: 1–15.