

Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia

Ma. Luisa Haces del Blanco, Lourdes Massieu-Trigo*

RESUMEN

La concentración fisiológica de la glucosa sanguínea en los humanos (80-90 mg/dl) se mantiene en este rango a través de mecanismos sistémicos altamente regulados. Cuando estos mecanismos no operan adecuadamente, la glucosa sanguínea disminuye dando lugar a un estado de hipoglucemia. La disminución de glucosa por debajo de los 20 mg/dl induce un estado de coma hipoglucémico caracterizado por el cese o aplanamiento de la actividad cerebral eléctrica. Dicho estado puede revertirse a través de la administración intravenosa de glucosa. Como consecuencia de un episodio hipoglucémico ocurre daño neuronal debido a que el cerebro es altamente dependiente del aporte sanguíneo de glucosa; la cual es la fuente de energía principal necesaria para su correcto funcionamiento. Una gran variedad de funciones celulares se alteran en condiciones de deficiencia energética; como tales: el mantenimiento de los gradientes iónicos, la liberación y recaptura de neurotransmisores, la regulación de la concentración intracelular de calcio y la función mitocondrial. Muchas evidencias señalan la anticipación del glutamato como excitotoxina en la muerte neuronal hipoglucémica y recientemente; se ha propuesto que el estrés oxidativo juega un papel importante en este proceso. En esta revisión analizamos los factores que contribuyen al desarrollo de daño cerebral en hipoglucemia.

Recibido: 1º octubre 2004. Aceptado: 22 octubre 2004.

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. Correspondencia: Ma. Luisa Haces del Blanco. Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-253, 04510, México D.F., México. E-mail. mlhaces@ifc.unam.mx

Palabras clave: hipoglucemia, daño neuronal, estrés oxidativo, excitotoxicidad.

MECHANISMS INVOLVED IN NEURONAL DAMAGE ASSOCIATED TO HYPOGLYCEMIA

ABSTRACT

In physiological conditions blood glucose concentration (80-90 mg/dl) is maintained through highly regulated systemic mechanisms. Disruption of these mechanisms leads to hypoglycemia, whose decreases to levels lower to 20 mg/dl blocks the electrical activity of the brain. This condition is known as hypoglycemic coma and can be overcome by intravenous administration of glucose. Subsequently to the hypoglycemic episode, it occurs brain damage determined by the high dependency of brain on glucose blood supply, which is the main energy source necessary for its normal functioning. Many neuronal functions are compromised during energy failure such as the maintenance of ionic gradients, the release and reuptake of neurotransmitters, the intracellular buffering of calcium, and the mitochondrial function. Excitotoxic glutamate activity in hypoglycemic neuronal damage is well documented, and a role of oxidative stress in this process has recently raised. The contribution of these processes to hypoglycemic brain damage is the main subject of this review.

Key words: hypoglycemia, brain damage, oxidative stress, excitotoxicity.

La concentración fisiológica de glucosa en sangre oscila entre 80-90 mg/dl (normoglucemia) y se modifica en diversas situa-

ciones. La ingesta de alimentos induce un aumento en los niveles de glucosa alrededor de 200 mg/dl (hiperglucemia), mientras que en el ayuno prolongado su nivel disminuye hasta 60-40 mg/dl (hipoglucemia moderada). Si el nivel de glucosa disminuye aún más (menor 20 mg/dl) se puede presentar una hipoglucemia severa que se acompaña del cese de la actividad eléctrica del cerebro o de coma hipoglucémico. Existen mecanismos compensatorios encargados de mantener los niveles de glucosa dentro del rango fisiológico, uno de ellos es la liberación de insulina que ocurre como respuesta a la hiperglucemia. La insulina es una hormona pancreática que provoca una disminución en la concentración sanguínea de glucosa, ya que aumenta su captura en diversos tipos celulares, y en especial en el hígado en donde favorece la síntesis de glucógeno y de ácidos grasos, considerándose por eso una hormona anabólica. Por su parte, la hipoglucemia provoca la liberación de hormona de crecimiento, cortisol y epinefrina. Esta última, induce la liberación de glucagón hacia la sangre y la acción conjunta de todas ellas favorecen principalmente la liberación hepática de glucosa (figura 1).

El cerebro depende del aporte continuo de glucosa para su buen funcionamiento, de tal manera que cuando éste se interrumpe, por ejemplo durante la isquemia o la hipoglucemia, se puede presentar daño neuronal. La vulnerabilidad de las distintas regiones cerebrales a la muerte en estas dos situaciones es la misma, siendo más sensibles la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, pero la distribución del daño es diferente¹. Por ejemplo, en el hipocampo en condiciones de hipoglucemia se lesionan zonas mediales de la región CA1 y el subículo, mientras que éste es resistente a la isquemia.

La hipoglucemia es un estado generalmente transitorio, aunque puede presentarse en forma crónica, tanto en adultos como en infantes con trastornos hormonales, como es la deficiencia de glucagón o alteraciones en la hormona del crecimiento, entre otras. Los pacientes diabéticos dependientes de insulina (diabetes tipo 1) también están expuestos a estados de hipoglucemia, ya que al administrarse la insulina pueden excederse en la dosis y provocar así una disminución excesiva en los niveles sanguíneos de glucosa. La hipoglucemia también puede presentarse como consecuencia de un insulínoma que al sintetizar y liberar insulina de manera excesiva, produce la hipoglucemia. Se ha demostrado que la hipoglucemia moderada afecta los procesos de memoria en humanos², y que episodios repetidos

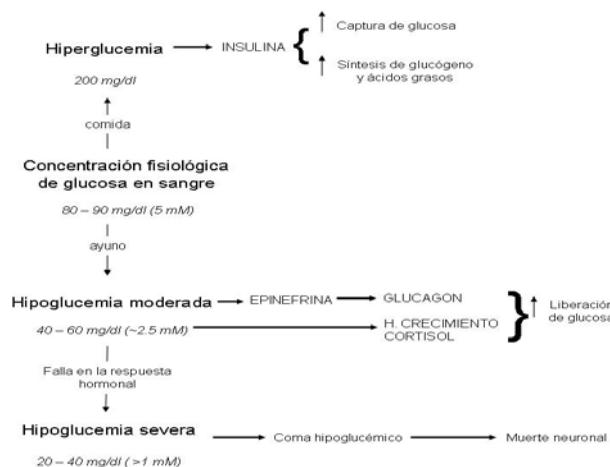


Figura 1. La concentración fisiológica de glucosa es de 80-90 mg/dl. Tras la ingesta de alimento la glicemia puede alcanzar niveles alrededor de 200 mg/dl, lo que se conoce como hiperglucemia. El organismo responde a este estado con la secreción pancreática de insulina la cual promueve la captura de glucosa en diversos tipos celulares, tales como en células hepáticas, promoviendo que sus niveles regresen a los valores basales. Por el contrario, en períodos de ayuno prolongado, los niveles sanguíneos de glucosa disminuyen causando lo que se conoce como hipoglucemia moderada ante la cual, el organismo induce la liberación de hormona de crecimiento, cortisol y epinefrina. Esta última, estimula la liberación pancreática de glucagón, que junto con las hormonas antes mencionadas, aumentan la liberación de glucosa principalmente en el hígado. Si alguno de estos mecanismos reguladores falla, los niveles de glucosa pueden llegar a ser menores a 20 mg/dl, induciendo el cese de la actividad eléctrica cerebral y la muerte neuronal subsecuente.

de hipoglucemia severa, frecuentes en los pacientes diabéticos tipo 1, causan déficit cognoscitivo irreversible³, el cual correlaciona con el daño a estructuras cerebrales como el hipocampo⁴.

Para estudiar el daño neuronal asociado a la hipoglucemia se han desarrollado diversos modelos animales. El modelo *in vivo* más utilizado es la inyección sistémica de insulina en ratas, la cual provoca una disminución progresiva de la concentración sanguínea de glucosa hasta alcanzar niveles menores a 20 mg/dl e induce un estado de coma o periodo isoeléctrico. Si éste se prolonga por más de 15 min se produce muerte neuronal. Para restablecer la normoglucemia y la actividad cerebral, y por consiguiente evitar la muerte del animal; se administra glucosa por vía intravenosa. El daño subsiguiente al coma hipoglucémico tiene una relación directa con la duración de éste, entre mas largo sea el periodo isoeléctrico mayor extensión tendrá la lesión⁵. Por otra parte, se han desarrollado modelos *in vitro* en cultivos celulares de tejido cerebral, en los cuales se mimetiza la condición hipoglúcémica mediante la privación de

glucosa. Sin embargo, las conclusiones derivadas de los estudios *in vitro* no siempre son extrapolables a lo que ocurre en sistemas *in vivo*. Estos dos tipos de modelos han sido muy útiles para estudiar los mecanismos de muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa. A continuación se describen las observaciones más concluyentes en este campo.

Los aminoácidos excitadores, la excitotoxicidad y el daño hipoglucémico

El glutamato es el neurotrasmisor excitador distribuido más ampliamente en el sistema nervioso central, cuya liberación de la presinapsis ocurre por exocitosis a través de la fusión vesicular dependiente de Ca^{2+} . Una vez en el espacio sináptico el glutamato se une a dos variedades de receptores postsinápticos; los receptores ionotrópicos que son en sí canales iónicos y los receptores metabotrópicos que están acoplados a cascadas intracelulares de segundos mensajeros.

Los receptores ionotrópicos se han clasificado de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, y se han denominado de acuerdo a su agonista específico: el receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor a kainato y el receptor al ácido a-amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propionico (AMPA). A estos dos últimos se les agrupa como receptores no-NMDA. Los receptores no-NMDA son principalmente permeables a Na^+ , mientras que los NMDA son permeables a Ca^{2+} y a Na^+ . Estos últimos en condiciones de reposo mantienen bloqueado su canal iónico por un ión Mg^{2+} . Esto los hace dependientes de voltaje pues es necesario que la membrana se despolarice para que se libere dicho ión y permita el paso de Ca^{2+} . La despolarización puede ser consecuencia de la activación de los receptores no-NMDA. Un agonista de los receptores NMDA es el aspartato que también es un aminoácido con función de neurotransmisor excitador en el cerebro.

En los años cincuentas, se describieron las propiedades tóxicas del glutamato⁶; sin embargo, el término de excitotoxicidad no fue acuñado sino hasta 1969 por Olney. La excitotoxicidad se refiere a la capacidad del glutamato y otros aminoácidos excitadores, de causar neurodegeneración por la estimulación prolongada de sus receptores pos-sinápticos⁷. Este tipo de toxicidad se ha descrito en diversos tipos de lesiones como las causadas por un accidente vascular cerebral, por el coma hipoglucémico o por una hemorragia cerebral. Los mecanismos de muerte en estas condiciones no se han

esclarecido completamente, pero se sabe que el Ca^{2+} , al igual que los aminoácidos excitadores, interviene en su desarrollo⁸.

Dadas las propiedades tóxicas del glutamato, su concentración extracelular está finamente regulada a través de su captura del espacio sináptico por transportadores específicos, una vez que se libera de la terminal sináptica. Estos transportadores se localizan principalmente en la membrana plasmática de los astrocitos, y también se encuentran en neuronas. La captura de glutamato es dependiente Na^+ y por tanto está acoplada al gradiente electroquímico de Na^+/K^+ , que le sirve de fuerza motriz para transportar dicho aminoácido al interior de la célula⁹. El proceso de captura es por tanto dependiente de energía pues el mantenimiento del gradiente de Na^+/K^+ depende del funcionamiento de las bombas Na^+/K^+ que son dependientes de ATP.

El papel del glutamato y del aspartato en el daño hipoglucémico ha sido objeto de estudio de varios grupos y ha quedado establecido el papel preponderante de la excitotoxicidad en el daño producido por la disminución de los niveles de glucosa. Hasta la fecha se sabe por estudios de microdialisis que estos aminoácidos excitadores son liberados desde que se inicia el periodo isoeléctrico¹⁰. En estos experimentos se observó que la cantidad de aspartato liberado es mayor que la de glutamato y esto se debe a que el glutamato es utilizado como sustrato metabólico en esta condición, y por tanto su disponibilidad como transmisor se ve limitada favoreciéndose la vesiculación y la liberación del aspartato¹¹⁻¹³. La acumulación de los aminoácidos excitadores en el espacio sináptico puede deberse básicamente a dos eventos: que su liberación esté aumentada o que los sistemas de captura estén comprometidos. Ambas posibilidades son factibles, pues al colapsarse el gradiente electroquímico, la membrana presináptica se despolariza y se activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje incrementándose la concentración intracelular de este ión. El aumento de Ca^{2+} intracelular favorece la liberación por exocitosis de neurotrasmisor. Por otra parte, si el estado energético no es el óptimo por la ausencia de glucosa, se altera el proceso de captura que es dependiente de energía. Todavía no se ha establecido cual de estos eventos es más importante en la hipoglucemia. Experimentos *in vitro* sugieren la disfunción de los transportadores de glutamato/aspartato ya que si se restablece la concentración de glucosa después de un periodo de privación, el glutamato extracelular vuelve a sus niveles normales siendo este proceso depen-

diente de Na^{+14} . Al parecer los sistemas de captura no funcionan adecuadamente en condiciones de hipoglucemia debido a la deficiencia energética.

La acumulación de aminoácidos excitadores en el espacio sináptico, debido al bloqueo de sus transportadores, en sí no es suficiente para provocar muerte neuronal. Se ha demostrado que la acumulación *in vivo* de estos aminoácidos, después de la administración de un inhibidor de la captura de glutamato, no causa daño en condiciones normales¹⁵, pero sí cuando el metabolismo energético está inhibido^{16,17}. Estos trabajos apuntan a que el estado energético celular es fundamental en el desarrollo de la lesión excitotóxica por lo que mas adelante se discutirá su papel en el daño hipoglucémico.

Otra evidencia que apoya a la excitotoxicidad como el mecanismo de daño subsecuente a la hipoglucemia, es la observación de que la muerte neuronal en el estriado inducida en condiciones de hipoglucemia, se previene cuando se eliminan las vías glutamatérgicas cortico-estriatales¹⁸. Esto sugiere que la liberación de glutamato por las terminales glutamatérgicas es necesaria para que se produzca la lesión hipoglucémica. Por otra parte, la administración de antagonistas de los receptores NMDA previene la muerte neuronal¹⁹ aún cuando éstos se administren después del periodo isoeléctrico²⁰. Este efecto no está relacionado con la inducción de hipotermia descrita para algunos antagonistas de estos receptores²¹. Estos resultados también han sido obtenidos en experimentos *in vitro*, donde se ha demostrado que diversos antagonistas glutamatérgicos previenen el daño de manera dosis dependiente en condiciones de privación de glucosa²². Los receptores no-NMDA posiblemente también intervienen en el desarrollo del daño pues el tratamiento con sus antagonistas reduce el área lesionada²⁰, aunque en menor proporción. Su participación quizás está relacionada con la despolarización necesaria para activar los receptores NMDA. Estas evidencias sin duda son contundentes para sugerir que el glutamato y la activación de sus receptores juega un papel importante y temprano en el desarrollo del daño hipoglucémico.

El estado energético celular en la hipoglucemia

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de aminoácidos excitadores en el espacio extracelular después de inhibir sus transportadores, no causa muerte neuronal en la rata o en neuronas cultivadas energéticamente competentes, pero cuando el metabolismo energético es deficiente se induce muerte

excitotóxica. El cerebro tiene la capacidad de adaptarse a la disminución del suministro de glucosa; sin embargo, ésta es limitada. La adaptación del cerebro ocurre básicamente por dos eventos: el aumento en el flujo sanguíneo cerebral y el uso de reservorios de sustratos alternativos a la glucosa.

Un aumento del flujo sanguíneo durante la hipoglucemia ha sido demostrado por varios grupos^{23,24}, pero aún se encuentra en discusión el mecanismo por el cual que éste ocurre. Existen estudios que apoyan la participación del óxido nítrico como factor relajante de las células endoteliales en condiciones de hipoglucemia²⁵, pero ésto ha sido puesto en duda por otros autores²⁶.

Al parecer el metabolismo energético en la hipoglucemia sólo se altera en condiciones muy severas o muy prolongadas, pues el consumo de O_2 se mantiene durante la hipoglucemia lo que sugiere que otros sustratos están siendo utilizados para obtener energía^{23,27,28}. La cantidad de glucógeno en las neuronas es limitada y clásicamente se piensa que éste se agota en los primeros 5 minutos del periodo isoeléctrico²³. Estudios recientes sugieren que el glucógeno puede ser utilizado como sustrato metabólico por períodos de tiempo más extensos cuando el aporte de glucosa cerebral es inadecuado²⁹, o cuando se presentan episodios repetidos de hipoglucemia. Los aminoácidos constituyen también un sustrato endógeno que se agota rápidamente¹¹ ya que se pueden incorporar al ciclo de Krebs alterando su concentración tisular durante la hipoglucemia tanto *in vivo* como *in vitro*^{13,30}. Otros sustratos que se utilizan son los fosfolípidos, lo que conduce a un aumento en la concentración de ácidos grasos libres, entre ellos el ácido araquidónico cuyo metabolismo genera radicales libres, los cuales son tóxicos para la célula³¹. La lipólisis es un proceso dependiente de Ca^{2+} , y el aumento de este ión promueve el metabolismo de los fosfolípidos lo que puede alterar las propiedades de la membrana plasmática, y por lo tanto las de las proteínas que están embebidas en ella.

La concentración de ATP se mantiene constante incluso durante la hipoglucemia moderada, y no es sino hasta que se presenta el estado de coma acompañado de los primeros cambios en las concentraciones iónicas (entrada de K^+ y Ca^{2+}), que los niveles de ATP disminuyen en un 40%^{30,31}. Éstos disminuyen progresivamente conforme avanza el estado de coma, sugiriendo que éste se acompaña de una deficiencia de sustratos metabólicos tal, que ocasiona un déficit energético severo en el tejido cerebral³². La concentración de ATP ha sido medida

también en estudios *in vitro* durante la privación de glucosa, y se ha observado una disminución importante no sólo de ATP sino de fosfocreatina³³. La disminución de los niveles energéticos compromete el funcionamiento de la bomba Na⁺/K⁺, impidiendo que la célula se repolarice y que los mecanismos de amortiguamiento de Ca²⁺ funcionen adecuadamente. Así, se genera una sobrecarga de Ca²⁺ en la mitocondria, la cual pierde su polaridad y su capacidad de producir ATP. Se ha observado que los niveles de ATP se mantienen disminuidos en el cerebro incluso 3 h después del restablecimiento de glucosa, subsecuente al coma hipoglucémico³⁰.

Ca²⁺ y el daño hipoglucémico

Dado que entre los receptores a glutamato los del tipo NMDA son los mayormente permeables a Ca²⁺, éstos son los que juegan un papel más importante en la muerte neuronal excitotóxica. En condiciones normales, la concentración intracelular de Ca²⁺ está finamente regulada; es decir, existen incrementos transitorios de su concentración pero rápidamente ésta regresa a su nivel basal. Los mecanismos responsables de esta regulación incluyen proteínas citoplasmáticas con varios sitios de unión a Ca²⁺ (ej. calsecuestrina), bombas de Ca²⁺ situadas en la membrana plasmática; que lo destruyen de manera dependiente de ATP, así como la captura o secuestro de este ión en algunos organelos intracelulares (retículo endoplásmico y mitocondria). Cuando se pierde la homeostasis de Ca²⁺ intracelular debido a la falla en sus sistemas de extrusión o almacenamiento ocurre muerte neuronal. La activación dependiente de Ca²⁺ de proteasas, endonucleasas, fosfolipasas y de la óxido nítrico sintasa contribuirá al daño neuronal³⁴ (figura 2). La importancia del óxido nítrico será discutida más adelante.

Se conoce que la concentración extracelular de Ca²⁺ y de K⁺ disminuye desde el inicio del periodo isoeléctrico³¹, mientras que el Ca²⁺ intracelular continúa aumentando durante el coma, para después regresar a su nivel basal tras la inyección de glucosa³⁵. Por otro lado, trabajos; *in vitro* de privación de glucosa han demostrado que en neuronas cultivadas ocurre un gran aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular que está relacionado directamente con el daño neuronal³⁶. El aumento citosólico de Ca²⁺ y su escaso amortiguamiento provocan la entrada masiva de este ión a la mitocondria y esto desencadena la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, una interrupción de la síntesis de ATP y la apertura del

poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). El MTP es un poro situado en la membrana interna de la mitocondria que permite la salida de moléculas de un tamaño menor a 1500 KDa y que se ha involucrado en el daño asociado a eventos isquémicos e hipoglucémicos³⁷. La composición del MTP aún no es muy clara aunque se acepta que el translocador de nucleótidos de adenina y el canal de aniones dependiente de voltaje forman parte de su estructura.

Papel de la mitocondria

La mitocondria es un organelo intracelular donde se llevan a cabo importantes procesos metabólicos como el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, que tienen como fin último la síntesis de ATP. Esta síntesis está íntimamente ligada al potencial de membrana mitocondrial, y cuando éste se disipa la ATP sintetasa puede actuar en forma inversa y degradar ATP. Por su parte, la fosforilación oxidativa es una fuente constante de especies reactivas de oxígeno (ROS), que en condiciones normales son controladas por las defensas antioxidantes celulares. Cuando su generación aumenta éstas pueden contribuir de manera importante a la muerte neuronal hipoglucémica, como se discutirá más adelante. Como se mencionó anteriormente la entrada excesiva de Ca²⁺, por el uniportador de este ión, despolariza a la mitocondria e induce la apertura del MPT. Se ha observado que el tratamiento con un inhibidor específico de este poro reduce el daño asociado a la hipoglucemia³⁸ sugiriendo la participación de la disfunción mitocondrial en el daño neuronal. Por otro lado, se sabe que la mitocondria libera factores proapoptóticos cuando se abre el MPT como son el citocromo C y el factor inductor de la apoptosis (AIF)^{39,40}. Se ha reportado liberación de citocromo C y de AIF, así como activación de caspasa 3 asociadas a la hipoglucemia *in vivo*⁴¹ (figura 2). Además, la despolarización mitocondrial induce el desacople de la cadena transportadora de electrones y con ello la generación de radicales libres, cuyo exceso llevará a la célula a un estado de estrés oxidativo. Por otro lado, se ha observado una disminución de la actividad de los complejos I y IV de dicha cadena, en todas las regiones cerebrales asociada a la hipoglucemia inducida en un modelo *in vivo*⁴². La disfunción mitocondrial puede deberse a la presencia de radicales libres, ya que éstos pueden dañar a los diferentes componentes de la cadena respiratoria⁴³. La despolarización mitocondrial ha sido observada también *in*

vitro en condiciones de privación de glucosa⁴⁴.

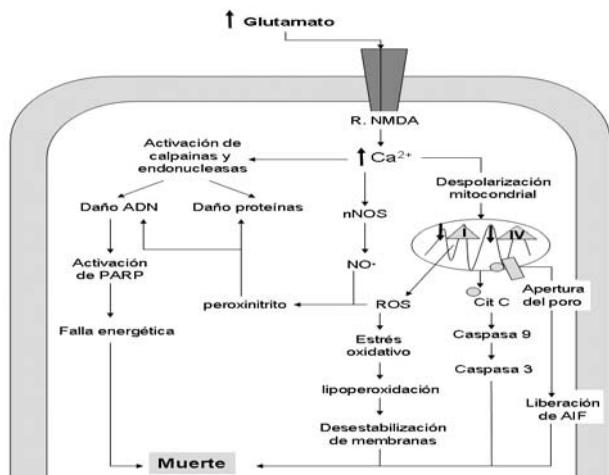


Figura 2. El aumento en la concentración extracelular de glutamato, así como la sobreactivación de sus receptores, principalmente los de tipo NMDA, induce muerte neuronal de tipo excitotóxico después de un periodo de hipoglucemia severa. La unión del glutamato a los receptores tipo NMDA los hace permeables a Ca²⁺ y el aumento intracelular de este ión activa diversas enzimas. Por un lado se activan endonucleasas y proteasas, como las calpainas. Las primeras provocan daño al ADN y las segundas se han asociado a la activación de algunas cascadas de muerte. Se activa a su vez la óxido nítrico sintasa (nNOS) la cual produce óxido nítrico (NO). El aumento de Ca²⁺ es amortiguado por la mitocondria, pero si ésta se sobrecarga de Ca²⁺, interrumpe la síntesis de ATP y se induce la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). A través del MPT pueden salir moléculas involucradas en algunas vías de muerte, como son el factor induktor de la apoptosis y el citocromo C. El citocromo C, forma parte de un complejo junto con la caspasa 9, que al ensamblarse se autoactiva y es capaz de activar a la caspasa 3, que es efectora de la muerte apoptótica. La actividad de la cadena transportadora de electrones, en especial la de los complejos I y IV disminuye, además de que aumenta la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS reaccionan en el citosol con el NO produciendo peroxinitrito, el cual es capaz de causar daño al ADN. El daño al ADN activa a la enzima poli-ADP ribosa polimerasa, la cual al sobreactivarse consume NAD y ATP induciendo una falla energética. Las ROS generan un estado de estrés oxidativo que favorece la lipoperoxidación que contribuye al daño hipoglucémico.

La apoptosis: activación de caspasas y calpainas en la hipoglucemia

La apoptosis es un tipo de muerte ordenado dependiente de energía, en el cual la integridad de la membrana plasmática se conserva evitando una respuesta inflamatoria. Hay activación de proteasas específicas ya sea de caspasas o de calpainas que hidrolizan distintos sustratos⁴⁵. Además, existen otras proteínas involucradas en las cascadas de muerte apoptótica, así como en su regulación; la familia de Bcl-2, la familia de los AIF y la de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), entre otras⁴⁶. Las caspasas se clasifican en iniciadoras y ejecutoras, las más estudiadas son la caspasa 9 que es iniciadora y

la caspasa 3 que es ejecutora. La caspasa 9 que forma parte de un complejo proteico constituido por la asociación del citocromo C, dATP, el AIF-1 y la procaspasa 9, que al unirse se auto-activa y así puede activar a la procaspasa 3. Durante el coma hipoglucémico no hay ATP para formar dicho complejo, pero después, es decir, después de la administración de glucosa los niveles de ATP se recuperan y se activa la caspasa 9. La actividad de la caspasa 3 ocurre hasta 3 h después de iniciado el periodo de recuperación. En cambio la liberación del citocromo C ocurre a los 30 min de iniciado el periodo isoeléctrico, y la translocación al núcleo del AIF ocurre 30 min después de iniciada la recuperación. En este modelo *in vivo* también se ha observado la activación de la calpaina, la cual es miembro de una familia de proteasas que se cree están involucradas en la activación de algunas caspasas y por tanto en la muerte apoptótica⁴¹.

Oxido nítrico, radicales libres y estrés oxidativo en la hipoglucemia

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desparejado en el último orbital, lo que los hace altamente reactivos pues tienden ya sea a donar ese electrón a alguna molécula vecina o bien a remover un electrón de otra para que su último orbital quede completo. Si las defensas antioxidantes celulares se ven sobre pasadas por la generación de radicales libres, ya sea por la producción excesiva de éstos, por la pérdida de los mecanismos antioxidantes o por ambas, se crea una situación conocida como estrés oxidativo. Una de las principales consecuencias del estrés oxidativo es que daña a algunas macromoléculas indispensables para la viabilidad celular como son: los lípidos de membrana, el ADN, y las proteínas. *In vivo* se ha observado que la hipoglucemia induce lipoperoxidación de la membrana plasmática aún antes del periodo isoeléctrico⁴⁷, lo que sugiere que es un evento temprano en la lesión hipoglucémica y que puede ocurrir aún en presencia de niveles bajos de glucosa. También se ha observado lipoperoxidación de las membranas mitocondriales y daño al ADN de este organelo en condiciones de glucosa baja⁴³, lo que sugiere que los radicales dañan directamente a la mitocondria. *In vitro* se ha observado que la privación de glucosa aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁴⁴ y que el daño en estas condiciones es prevenido con antioxidantes como la vitamina E⁴⁸. La actividad de algunas enzimas encargadas de amortiguar a ciertas ROS, como son la superóxido dismutasa y la catalasa se

encuentra aumentada en condiciones de hipoglucemia⁴², lo que indica de manera indirecta la presencia de superóxido y de peróxido. El mecanismo de daño oxidativo en la hipoglucemía ha sido poco explorado, ya que no se sabe cuales son las principales fuentes de radicales libres.

Una de las principales defensas antioxidantes celulares es el glutatión, el cual es un tripéptido compuesto por glicina, glutamato y cisteína, que funciona como un amortiguador del estado redox de la célula. En condiciones normales, el glutatión se encuentra en su estado reducido, pero en presencia de ROS pasa a su estado oxidado que consiste en dos moléculas de glutation unidas por un enlace disulfuro. Se ha observado que en el modelo de hipoglucemía inducida por insulina los niveles de glutatión reducido no se encuentran disminuidos, pero la actividad de las enzimas encargadas tanto de su síntesis como de su reciclaje se encuentran aumentadas. Esto sugiere que hay producción de radicales que consumen el glutatión reducido, y que la actividad aumentada de estas enzimas hace que los niveles del glutatión reducido se mantengan constantes, pudiendo ser éste un mecanismo adaptativo ante la lesión hipoglucémica⁴².

El óxido nítrico es un mensajero celular de vida media corta que está involucrado en diversos procesos celulares, tiene poca reactividad como radical pero cuando se combina con el superóxido se genera peroxinitrito y éste es un radical altamente reactivo con una vida media muy corta que oxida moléculas cercanas. *In vitro*, se ha observado que un inhibidor de la óxido nítrico sintasa previene el daño en condiciones de privación de glucosa⁴⁸. Por otro lado *in vivo*, se ha observado que en condiciones de hipoglucemía aumenta la inmunoreactividad a la nitrotirosina en algunas zonas cerebrales⁴⁹. La nitrotirosina se genera a partir de la reacción del peroxinitrito con los residuos de tirosina y por lo tanto es un buen marcador de la presencia de ese radical libre, lo que indica su producción en estas condiciones. En ese mismo trabajo se demuestra que la administración de un inhibidor de la sintasa neuronal del óxido nítrico (nNOS) durante el periodo isoeléctrico, disminuye la presencia de nitrotirosina y reduce el daño hipoglucémico.

El daño al ADN causado por radicales libres, activa a la polimerasa de poli-ADPribosa (PARP). Esta enzima normalmente repara el ADN pero su sobreactivación conduce a la muerte por un proceso que involucra el consumo de ATP y la liberación de factores pro-apoptóticos. Experimentos tanto *in vivo*

como *in vitro* han demostrado que un inhibidor específico de la PARP protege a las células del daño hipoglucémico, incluso cuando éste es administrado dos horas después de la recuperación de los niveles de glucosa sanguínea⁴⁹. Estos resultados sugieren que la activación de la PARP, posiblemente mediada por el peroxinitrito, es fundamental en la muerte neuronal observada en condiciones de hipoglucemía, y que posiblemente su activación sea un evento tardío y determinante para la generación de la muerte. Evidencias recientes, sugieren que el zinc es otro factor importante en la activación de la PARP, y que éste es liberado de las fibras musgosas en condiciones de hipoglucemía, y acumulado en las neuronas de la región CA1 del hipocampo. El mecanismo de entrada del zinc a la célula aún se desconoce, pero el tratamiento con un quelante de zinc reduce no solo la activación de la PARP sino el daño neuronal subsiguiente a la hipoglucemía⁵⁰.

El cerebro tiene un alto contenido de lípidos poli-insaturados, entre ellos el ácido araquidónico, el cual al metabolizarse a eicosanoides produce radicales libres, los cuales como ya se mencionó pueden participar en el daño a los componentes celulares. En condiciones de hipoglucemía se ha demostrado un aumento en la concentración de ácidos grasos libres, siendo el ácido araquidónico el que más aumenta³¹.

Aunque a la fecha se conocen algunos de los eventos involucrados en la muerte neuronal hipoglucémica, su temporalidad y secuencia aún no es muy clara. Asimismo se desconoce si estos eventos son parte de una sola cascada de muerte, o si son mecanismos paralelos que conforman señales redundantes de muerte. Se sabe que muchos de estos mecanismos de muerte se presentan en otras patologías como la isquemia, por lo que es importante un conocimiento más profundo de estos procesos con el fin de encontrar alternativas terapéuticas para disminuir la lesión cerebral y contribuir a la recuperación de los pacientes. En conclusión, el aumento en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores, la pérdida de la homeostasis del Ca²⁺, la deficiencia energética, la disfunción mitocondria y el estrés oxidativo son todos componentes importantes de la muerte que se presenta en condiciones de hipoglucemía. En la figura 2, se resumen los diversos componentes que participan en el desarrollo del daño neuronal asociado a la hipoglucemía

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo PAPIIT (IN222503) a Lourdes Massieu y una beca CONACYT No181312 y DGEP-UNAM a Ma. Luisa Haces. Los autores agradecen a el Dr. J. Morán y al Dr. C. Sánchez por sus comentarios a este trabajo.

REFERENCIAS

1. Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 1984; 64:177-91.
2. Sommerfield AJ, Deary IJ, McAulay V, Frier BM. Moderate hypoglycemia impairs multiple memory functions in healthy adults. *Neuropsychol* 2003; 17:125-32.
3. Akyol A, Kiylioglu N, Bolukbasi O, Guney E, Yurekli Y. Repeated hypoglycemia and cognitive decline. A case report. *Neuroendocrinol Lett* 2003; 24:54-6.
4. Carroll MF, Burge MR, Schade DS. Severe hypoglycemia in adults. *Rev End Metab Dis* 2003; 4:149-57.
5. Auer RN, Olsson Y, Siesjö BK. Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 1984; 33:1090-8.
6. Lucas D, Newhouse J. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957; 58:193-201.
7. Olney J. Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 1994; 15:259-60.
8. Choi D. Excitotoxic cell death. *J Neurol* 1992; 23:1261-76.
9. Gegelashvili G, Schousboe A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* 1998; 45:233-8.
10. Sandberg M, Nyström B, Hamberger A. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *In vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 1986; 47:178-84.
11. Engelsen B, Westerberg E, Fonnum F, Wieloch T. Effect of insulin-induced hypoglycemia on the concentrations of glutamate and related amino acids and energy metabolites in the intact and decorticated rat neostriatum. *J Neurochem* 1986; 47:1634-41.
12. Gundersen V, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunogold study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:41-51.
13. Honegger P, Braissant O, Henry H, Boulat O, Bachmann C, Zurich MG, et al. Alteration of amino acid metabolism in neuronal aggregate cultures exposed to hypoglycemic conditions. *J Neurochem* 2002; 51:1141-51.
14. Takata T, Hirai H, Shigemoto T, Okada Y. The release of glutamate and accumulation of intracellular calcium in the guinea pig hippocampal slices during glucose deprivation. *Neurosci Lett* 1995; 189:21-4.
15. Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *J Neurochem* 1995; 64:2262-72.
16. Sánchez-Carbente M, Massieu L. Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem* 1999; 27:129-38.
17. Massieu L, Gómez-Román N, Montiel T. *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 2000; 165:257-67.
18. Wieloch T, Engelsen B, Westerberg E, Auer R. Lesions of the glutamatergic cortico-striatal projections in the rat ameliorate hypoglycemic brain damage in the striatum. *Neurosci Lett* 1985; 58:25-30.
19. Wieloch T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-Methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 1985; 230:681-3.
20. Nellgard B, Wieloch T. Cerebral protection by AMPA- and NMDA-receptor antagonists administered after severe insulin-induced hypoglycemia. *Exp Brain Res* 1992; 92:259-66.
21. Papagapiou MP, Auer RN. Regional neuroprotective effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in hypoglycemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10:270-6.
22. Monyer H, Goldberg MP, Choi DW. Glucose deprivation neuronal injury in cortical culture. *Brain Res* 1989; 483:347-54.
23. Norberg K, Siesjö BK. Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycaemia. *J Neurochem* 1976; 26:345-52.
24. Hollinger BR, Bryan RM. b-receptor-mediated increase in cerebral blood during hypoglycemia. *Am J Physiol* 1987; 253:949-55.
25. Dieguéz G, Fernández N, García JL, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B. Role of nitric oxide in the effects of hypoglycemia on the cerebral circulation in awake goats. *Eur J Pharmacol* 1997; 330:185-93.
26. Horinaka N, Artz N, Jehle J, Takahashi S, Kennedy C, Sokoloff L. Examination of potential mechanisms in the enhancement of cerebral blood flow by hypoglycemia and pharmacological doses of deoxyglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17:54-63.
27. Krolicki L, Leniger-Follert E. Oxygen supply of the brain cortex (rat) during severe hypoglycemia. *Pflügers Arch* 1980; 387: 121-216.
28. Agardh CD, Chapman AG, Nilsson B, Siesjö BK. Endogenous substrates utilized by rat brain in severe insulin-induced hypoglycemia. *J Neurochem* 1981; 36:490-500.
29. Choi IY, Seaquist ER, Gruetter R. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism *in vivo*. *J Neurosci Res* 2003; 72:25-32.
30. Agardh CD, Folbergrová J, Siesjö BK. Cerebral metabolic changes in profound insulin-induced hypoglycemia, and in the recovery period following glucose administration. *J Neurochem* 1978; 31:1135-42.
31. Wieloch T, Harris RJ, Symon L, Siesjö BK. Influence of severe hypoglycemia on brain extracellular calcium and potassium activities, energy and phospholipid metabolism. *J Neurochem* 1984; 43:160-8.
32. Lewis LD, Ljunggren B, Ratcheson RA, Siesjö BK. Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia related to blood glucose and to EEG. *J Neurochem* 1974; 21:673-9.
33. Brooks KJ, Porteous R, Bachelard HS. Effects of hypoglycemia and hypoxia on the intracellular pH of cerebral tissue as measured by ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Neurochem* 1989; 52:604-10.
34. Reynold I. Intracellular calcium and magnesium: critical determinants of excitotoxicity? En: Ottersen O, Langmoen L, Gjerstad I, editores. *Progress in brain research*. Elsevier Science 1998; 116:225-43.
35. Uematsu D, Greenberg JH, Reivich M, Karp A. Cytosolic free calcium, NAD/NADH redox state and hemodynamic changes in the cat cortex during severe hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:149-55.
36. Cheng B, McMahon DG, Mattson MP. Modulation of calcium current, intracellular calcium levels and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. *Brain Res* 1993; 607:275-85.
37. Friberg H, Wieloch T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochemie* 2002; 84:241-50.
38. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 1998; 18:5151-9.
39. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 1996; 86:147-57.
40. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptotic

- protease. *J Exp Med* 1996; 184:1331-3141.
41. Ferrand-Drake M, Changlian Z, Gunilla G, Hansen AJ, Karlsson J-O, Bahr BA, et al. 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* 2003; 85:31-42.
42. Bhardwaj SK, Sharma ML, Gulati G, Chhabra A, Kaushik R, Sharma P, et al. Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Molec Chem Neuropathol* 1998; 34:157-68.
43. Ballesteros JR, Mishra OP, McGowan JE. Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol Neonate* 2003; 84:159-63.
44. Liu Y, Xiao-Dong S, Liu W, Zhang T-Y, Zuo J. Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* 2003; 7:49-56.
45. McConkey D. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998; 99:442-9.
46. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.
47. Patockova J, Mahol P, Tumova E, Krsiak M, Rokytka R, Stipek S, et al. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res* 2003; 52:131-5.
48. Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia or oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1405-7.
49. Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, et al. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 2003; 23:10681-90.
50. Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y, Swanson RA. Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 2004; 16:538-45.