



6

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

POSIBLE EFECTO PROTECTOR DEL ACETOACETATO SOBRE  
LA MUERTE NEURONAL EN UN MODELO DE HIPOGLICEMIA CRÓNICA  
Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES ENERGÉTICOS CEREBRALES.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A  
MARÍA LUISA HACES DEL BLANCO

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

MÉXICO, D.F.

JUN. 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

SI SOBREVIVES, SI PERSISTES, CANTA,  
SUEÑA, EMBORRÁCHATE,  
ES EL TIEMPO DEL FRÍO: AMA.  
APRESÚRATE. EL VIENTO DE LAS HORAS  
BARRE CALLES, LOS CAMINOS.  
LOS ÁRBOLES ESPERAN: TÚ NO ESPERES,  
ÉSTE ES EL TIEMPO DE VIVIR, EL ÚNICO.

Jaime Sabines.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por haber creado el universo, lleno de cosas interesantes por descubrir y entender, lo que hace que la ciencia resulte una actividad tan divertida y enriquecedora.

A mi familia; papá, mamá y a mis hermanas Marina y Ma. José por el apoyo durante todos estos años, en los días buenos y en los no tan buenos por haber estado a mi lado compartiendo mi vida universitaria. También a los "nuevos" integrantes de la familia; Javier, Nacho, Javi, Mari Jo, y Marinita gracias. Los quiero.

A mi tía Mayos por ser ese motor de metas alcanzables, por echar andar siempre mi espíritu soñador, por compartir todas sus fortalezas y sus debilidades enseñándome que la vida es sueño y los sueños, sueños son. Sigamos soñando juntas.

A Santiago por hacer que este tiempo sea único e irrepetible, por todos los buenos momentos vividos juntos, por la comprensión, el apoyo y por siempre haber estado ahí para escuchar mis aventuras cotidianas. Te amo.

A mis amigos Mariana, Beatriz, Mati y Manuel por su invaluable amistad y por compartir desde el primer momento mi sueño universitario con el mismo entusiasmo que yo. A mis amigos que hicieron posible este sueño Yuriria, Nahima, Roberto y Geo por el apoyo en los días de apatía, por entenderme y por encontrarle siempre el lado bueno a las cosas.

A toda mi demás familia; los Hurle, los del Blanco, los Haces y los González G., por estar siempre pendientes de la evolución de mis aventuras con ratas, lo que conforma la mayor parte del trabajo de esta tesis.

A mis familias adoptivas (en estricto orden cronológico):

A la generación XXV de biomédicas; David, Liv, Paco, Karen, Luis, Yayoi, Yu, Nahima, y en especial a Álvaro alias el pelón, Daniel y Hector (in) por haber iniciado esto juntos, por sus ideas geniales, por las fiestas y por su amistad.

Al laboratorio del Dr. Servin; a Luis, Zahed, y sobretodo a Fabiola y Gaby por haberme enseñado tantas cosas, por hacerme sentir como en casa, por su comprensión y apoyo pero sobretodo por su amistad.

Al laboratorio del Dr. Saavedra y compañía; a Rafael, Chayo, Geo, Octavio, Erika, Germán, Horacio, Ileana, y José Luis por los buenos momentos que ahí viví, por lo aprendido, por los congresos y los respectivos viajes, los sueños compartidos, la mac, los juegos y mis records. Por enseñarme que la vida está hecha de detalles cotidianos, y por demostrarme que antes de ser colegas somos amigos.

Al laboratorio de la Dra. Massieu mi actual segunda casa. A Lourdes por su dedicación, enseñanzas y amistad. A Tere por haberme adoptado durante este tiempo, por las risas, la comprensión y la paciencia que han surgido de esta gran amistad. A los demás Octa, Karla, Perla, Alberto, Jana, Silvana, Adver, Oscar y Cris por aguantarme, por la capacidad compartida de reírnos de la vida día tras día, y por la afición a los pumas. Los quiero. También a Federico por los infininitos cerebros cortados para este estudio. Muchas gracias.

A mis demás amigos que han formado parte de esta aventura, Quique, Cesar, Nuria, Ana, Velia, Ramiro, Lucia, Ana, Lemus y en especial a Consuelo y a Fernando que aunque estén lejos se les siente muy cerca, por los reventones compartidos y los que nos faltan. A mis "viejos" amigos Almudena, Ale, Lorena, Jorge Armando, Emanuel, Jorge Pablo, Ale Baca, Javi, Alfredo, Ximena, Carlos, Pau, Ale Glez., Betty, Nidia y a los que se me escapan ahora de la mente, gracias.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN .....	6
I INTRODUCCIÓN .....	7
1.0 Glicólisis .....	9
1.1 Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa .....	11
2.0 Ciclo de Krebs .....	13
3.0 Fosforilación oxidativa .....	14
4.0 Excitotoxicidad .....	15
4.1 Receptores a glutamato .....	15
4.2 Muerte necrótica y muerte apoptótica .....	21
5.0 Cuerpos cetónicos como sustratos energéticos y posibles neuroprotectores .....	22
5.1 Metabolismo y función de los cuerpos cetónicos .....	24
5.2 Barrera hematoencefálica y el paso de los cuerpos cetónicos .....	27
6.0 Modelo experimental .....	29
II HIPÓTESIS .....	31
III OBJETIVOS .....	
1.0 Objetivo General .....	32
2.0 Objetivos Particulares .....	32
IV METODOLOGÍA .....	
1.0 Materiales .....	33
2.0 Cirugía .....	33
3.0 Histología .....	34
4.0 Inhibición de la glicólisis .....	35
5.0 Protocolos de neuroprotección .....	35
6.0 Determinación de ATP .....	37
V RESULTADOS .....	
1.0 Observaciones macroscópicas .....	39
2.0 Resultados de neuroprotección .....	39
3.0 Resultados de la cuantificación de los niveles de ATP.....	44
VI DISCUSIÓN .....	50
VII CONCLUSIONES .....	60
REFERENCIAS .....	61

## ABREVIATURAS

- AAE : aminoácidos excitadores.  
AcAc : acetoacetato.  
ADP : adenosin difosfato.  
AMP : adenosin monofosfato.  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico.  
AMPc : AMP cíclico.  
ATP : adenosin trifosfato.  
BHB :  $\beta$ -hidroxibutirato.  
BHE : barrera hematoencefálica.  
CC : cuerpos cetónicos.  
CoA : coenzima A.  
CoQ : coenzima Q.  
CPT-I : carnitina palmitoil transferasa I.  
Da : daltones.  
EH : enfermedad de Huntington.  
GABA : ácido  $\gamma$ -amino butírico.  
GADPH : gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.  
HMG-CoA :  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peróxido de hidrógeno.  
i.h. : Intrahipocampal.  
i.p. : intraperitoneal.  
i.v. : intravenoso.  
IOA : yodoacetato.  
IP<sub>3</sub> : inositol trifosfato.  
MK-801 : (+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)ciclohexano-5,10-imina maleato.  
NAD : nicotin adenina dinucleótido.  
NADH : forma reducida del nicotin adenina dinucleótido.  
NMDA : N-metil-D-aspartato.  
NO : óxido nítrico.  
 $\cdot$ O<sub>2</sub> : radical superóxido.  
ONOO<sup>-</sup> : peroxinitrito.

**PDC** : L-trans-2,4-pirrolidin dicarboxilato.

**R AMPA** : receptores a AMPA.

**R NMDA** : receptores NMDA.

**R no-NMDA** : receptores AMPA y Kainato.

**ROS** : especies reactivas de oxígeno.

**rpm** : revoluciones por minuto.

**s.c.** : subcutáneo.

**SNC** : sistema nervioso central.

## RESUMEN

La alta demanda energética del cerebro depende principalmente del aporte de glucosa. Cuando este aporte no es suficiente, ya sea durante un período de isquemia subsecuente a un accidente vascular cerebral, o bien durante un estado de hipoglicemia, ocurre muerte neuronal, siendo la capa CA1 del hipocampo una de las regiones más vulnerables. La búsqueda de sustratos metabólicos alternativos a la glucosa que puedan restituir los niveles energéticos en estas condiciones podría ser una nueva estrategia para prevenir el daño neuronal. Se conoce que la muerte asociada a la isquemia y a la hipoglicemia es en parte mediada por glutamato, ya que éste se libera al espacio extracelular en estas condiciones, y antagonistas de sus receptores previenen sus efectos tóxicos. *In vivo* el glutamato per se no es tóxico, ya que si se administra en el cerebro de roedores o bien se inhibe su recaptura, induciendo una elevación importante de sus niveles extracelulares, no causa daño, a menos de que se administre a concentraciones muy elevadas o que el metabolismo energético celular se encuentre inhibido.

En este trabajo, se usó un modelo crónico de inhibición glicolítica, utilizando yodoacetato que es un inhibidor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Se inyectaron ratas con yodoacetato (15 mg/kg) durante tres días. Al tercer día los animales recibieron una inyección intrahipocampal de un inhibidor de la recaptura del glutamato (500 nmol/ $\mu$ l), el L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC). En este modelo, que mimetiza lo que ocurre durante un estado de hipoglicemia, se observa degeneración de las células de la capa CA1 del hipocampo. Bajo estas condiciones se estudió el posible efecto neuroprotector del acetoacetato, un cuerpo cetónico capaz de incorporarse al ciclo de Krebs como acetilCo-A, administrado por diferentes vías. Los resultados indican que el acetoacetato es capaz de proteger contra la muerte neuronal. Para saber si los efectos protectores estaban relacionados con un incremento de los niveles de ATP, éstos se determinaron en el hipocampo y en el estriado de ratas cuya glicólisis había sido inhibida, y que posteriormente fueron tratadas con acetoacetato. Los resultados indican que el acetoacetato tiende a incrementar los niveles de ATP, siendo este efecto significativo en el cuerpo estriado. En las ratas tratadas únicamente con el yodoacetato los niveles de ATP disminuyen ligeramente de forma transitoria en ambas estructuras, recuperándose los niveles de los animales control en un lapso no mayor a las 8 h.

## I INTRODUCCIÓN

Es un hecho bien documentado que la principal fuente de energía que el cerebro utiliza para mantener sus funciones, es la glucosa. El cerebro tiene muy pocas reservas de glucosa, es decir, tiene muy poco glucógeno, y éste solo se sintetiza cuando los niveles de ATP son altos, lo que está regulado por 2 isoformas de la glucógeno sintetasa (Clarke y Sokolof 1999).

La glucosa es metabolizada por medio de la glicólisis hasta piruvato, posteriormente éste, en condiciones aerobias, es convertido en acetil-CoA, el cual es capaz de incorporarse al ciclo de Krebs. Por esta vía la utilización de una molécula de glucosa produce 38 moléculas de ATP. En condiciones anaerobias, el piruvato forma lactato, y la ganancia de ATP es mucho menor, siendo la vía anaerobia insuficiente para mantener las funciones cerebrales. Por esto, el cerebro es un órgano que depende de la irrigación sanguínea y de su flujo para el abastecimiento continuo de oxígeno y de glucosa (Clarke y Sokolof 1999). El flujo sanguíneo está altamente regulado y cuando éste se interrumpe, ya sea por un rompimiento vascular o por un trombo, provoca una hemorragia o una isquemia, y se observa muerte neuronal. En lesiones isquémicas se distinguen dos áreas, el foco isquémico, donde hay muerte celular inminente y la zona de penumbra, cuya extensión varía dependiendo del flujo sanguíneo colateral, esta última zona es potencialmente rescatable (Lipton 1999).

Del aporte total de glucosa, el 25% es consumido por el cerebro, en donde la mayor parte es utilizada en procesos de transporte y en la conservación de los gradientes iónicos (Clarke y Sokolof 1999). Por esta razón en condiciones de hipoglicemia severa, la alta demanda del cerebro por este sustrato se ve limitada, lo que puede ocasionar daño celular (Wieloch 1985; Matthews y col 1996).

El estudio de posibles agentes neuroprotectores contra la muerte neuronal asociada a la hipoglicemia y a los accidentes vasculares cerebrales es relevante, ya que estas condiciones representan una importante causa de muerte y de incapacidad funcional permanente. El 30% de los casos de isquemia son letales (Dirnagl y col 1999) y otro 30% son incapacitantes. En México se registran 25,000 muertes al año, siendo los accidentes vasculares cerebrales la sexta causa de muerte en nuestro país (INEGI 2001), mientras que en Estados Unidos son la tercera (Wolf y col 1992). Alrededor de la mitad de las personas que sobreviven a uno de estos accidentes cerebrales presentan un importante déficit neurológico y una discapacidad física notoria (Brandster 1990).

Durante la hipoglicemia, en un inicio se activan mecanismos compensatorios a nivel sistémico, pero si la concentración de glucosa en la sangre disminuye de 4-5 mM a un nivel de 2.5 mM se presenta confusión y delirio, y si sus niveles siguen descendiendo se presentan crisis convulsivas, y en casos muy severos coma. Clínicamente este padecimiento resulta en una disminución de la actividad del sistema nervioso central (SNC), siendo la parte rostral la primera en verse afectada (Butterwoth 1999). Se han desarrollado diversos modelos animales para mimetizar las condiciones patobiológicas que se generan cuando el requerimiento del cerebro de oxígeno, de glucosa o de ambos, no se ve satisfecho, con el objetivo de buscar estrategias eficaces que promuevan la protección neuronal y mejoren la recuperación funcional. Experimentos en modelos animales y en preparaciones *in vitro* han demostrado que períodos de hipoglicemia dan lugar a muerte neuronal, la cual presenta características muy similares a las de la muerte isquémica y posiblemente sea inducida a través de mecanismos comunes (Wieloch 1985; Zeevalk y Nicklas 1991; Izumi y col 1997).

En condiciones de hipoglicemia el cerebro es capaz de utilizar sustratos alternativos a la glucosa con el objetivo de satisfacer su demanda energética. Estos sustratos son algunos intermediarios del ciclo de Krebs y amino ácidos como la glutamina

y el glutamato. En períodos de inanición también es capaz de utilizar cuerpos cetónicos ya que su concentración en sangre aumenta (Owen y col 1967).

## 1.0 Glicólisis.

Dada la necesidad cerebral de obtener energía a partir de la glucosa, esta vía es una de las más activas. A nivel sistémico tiene un control hormonal muy estricto para mantener la concentración sanguínea de la glucosa (4-5 mM) casi sin cambios. Dos hormonas pancreáticas están involucradas en esto; cuando su concentración sanguínea disminuye el páncreas libera glucagon que estimula el rompimiento de glucógeno e inhibe la glicólisis en los hepatocitos. Mientras que cuando sus niveles son altos se secreta insulina la cual estimula la síntesis de glucógeno en el hígado.

La glicólisis se lleva a cabo en el citosol (Figura 1) y se compone básicamente de dos fases:

- Fase preparatoria: son 4 reacciones, en las cuales se invierten dos moléculas de ATP, aumentando la energía libre contenida en los intermediarios, además la molécula de 6 carbonos se rompe en 2 moléculas de 3 carbonos, dando 2 moléculas de gliceraldehido 3-fosfato. Las enzimas limitantes de esta fase son la hexocinasa y la fosfofructocinasa-1, y están altamente reguladas no sólo por su producto sino que la fosfofructocinasa-1, además se inhibe por la concentración de ATP y la de citrato, y se estimula por la presencia de AMP, ADP y fructosa-2,6-bisfosfato. Esta última disminuye en presencia de glucagon inhibiéndose así esta vía.
- Fase de ganancia: en ésta las moléculas de gliceraldehido 3-fosfato son oxidadas dando 2 moléculas de piruvato y la energía liberada es recuperada como 4 moléculas de ATP y 4 de NADH. Aunque la ganancia neta será de dos

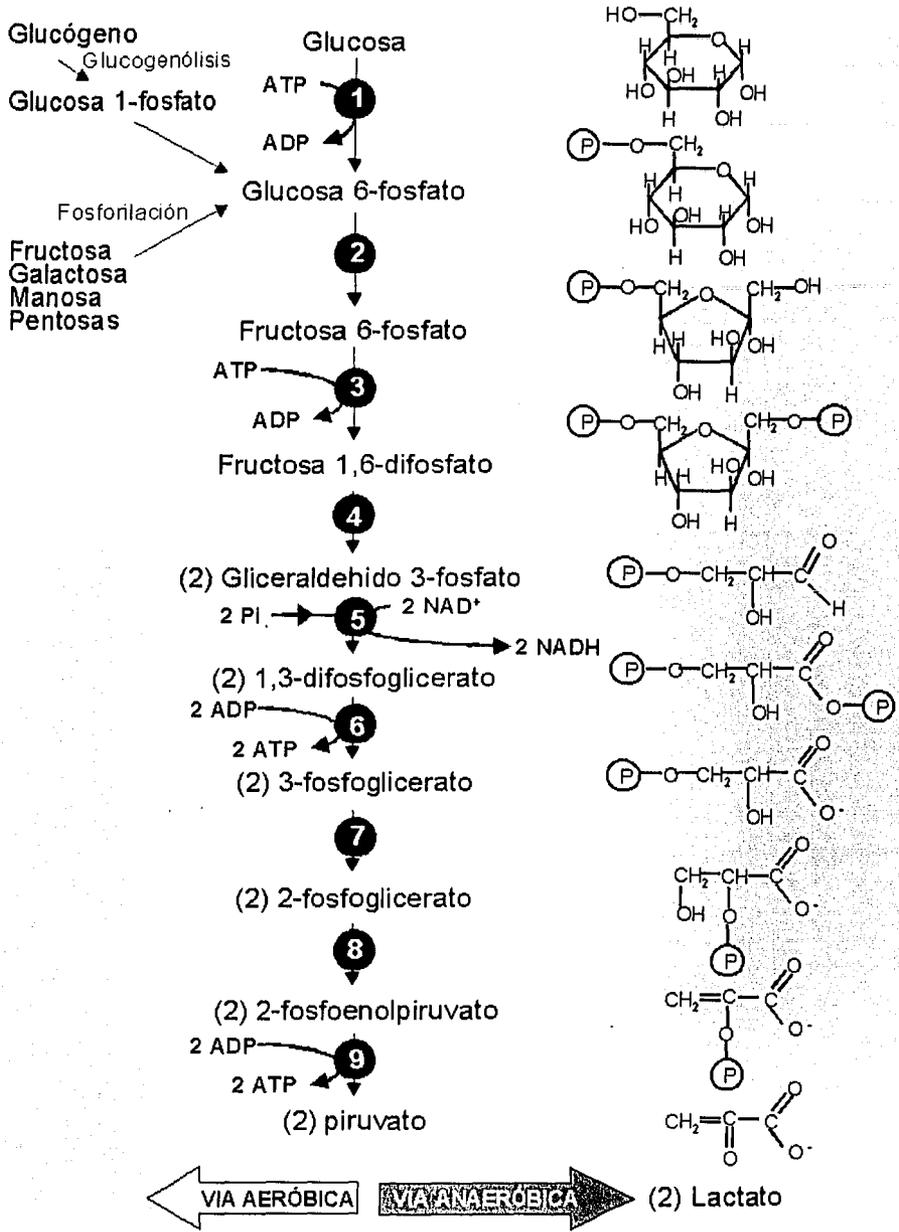


Figura 1. Glicólisis. Las enzimas involucradas en esta vía son: 1) hexocinasa, 2) fosfohexosa isomerasa, 3) fosfofructocinasa-1, 4) aldolasa y triosa fosfato isomerasa, 5) glicegliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, 6) fosfoglicerato cinasa, 7) fosfoglicerato mutasa, 8) enolasa, 9) piruvato cinasa. Las reacciones de la 1-4 componen la fase de preparación y de la 5 en adelante la fase de ganancia. Entre paréntesis se indica el número de moléculas producidas por cada glucosa degradada.

moléculas de ATP pues en la fase preparatoria se utilizaron 2. El yodoacetato (IOA), inhibe a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), la primera enzima de la fase de ganacia. El piruvato producido podrá entrar al ciclo de Krebs en presencia de O<sub>2</sub> y en condiciones anaerobias el piruvato se convertirá en lactato.

### 1.1 Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Es una enzima vital en la glicólisis. Tiene un peso molecular total de 146,000 Da y es un tetrámero, es decir, está compuesta por 4 subunidades idénticas (Figura 2) con una conformación de dímero de dímeros. La secuencia primaria está altamente conservada (más de 60%) desde las especies inferiores como la levadura, hasta las especies superiores. Los residuos más conservados se localizan en la región donde se une el NAD, el sitio activo donde se une el sustrato, y en las zonas encargadas de formar el tetrámero. Cuando se une el NAD se sabe que ocurre un cambio conformacional (Harris y Waters 1976).

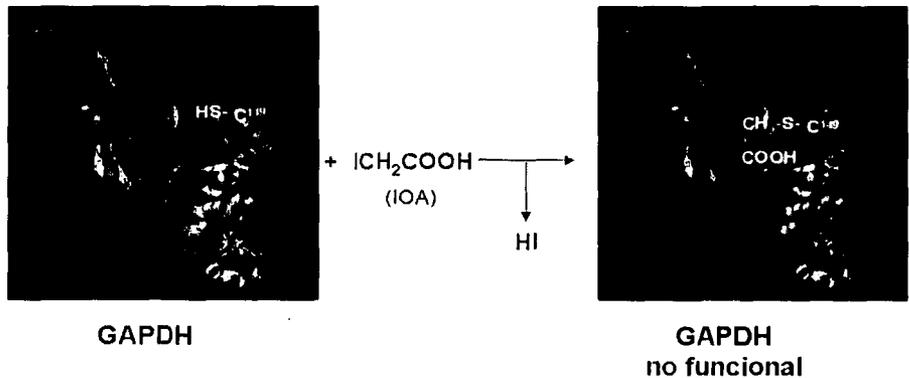


Figura 2. Estructura de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y su inhibición por el yodoacetato (IOA). Cada color representa una subunidad, las cuales se ensamblan formando una estructura de dímero de dímeros. La cisteína 149 se localiza en el sitio activo, donde se une el sustrato, y es en ésta donde actúa el IOA dejando a la enzima inactiva.

La inhibición de la GADPH por el IOA es irreversible, ya que éste reacciona con una cisteína (Cys-149) que se localiza en el sitio activo de la enzima, acetilándola. Se sabe que esta cisteína es fundamental para la función catalítica de la enzima, y que es un motivo muy conservado en la GADPH de diferentes especies (Harris y Waters 1976), ya que ahí se une el sustrato (Figura 2). En resumen esto es lo que ocurre:



Esta inhibición provoca que se acumulen hexosas fosfatadas de la primera fase de la glicólisis, por lo que su administración repetida se considera un modelo crónico de inhibición glicolítica.

Se ha puesto en evidencia que esta enzima no sólo tiene una función en el metabolismo de la glucosa, sino que se ha demostrado que está involucrada en diferentes funciones tales como: la activación transcripcional, reparación del DNA, ensamblaje de microtúbulos (Sirover 1999), siendo su localización celular determinante para su función. Recientemente esta enzima ha recibido una atención especial, pues se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington (EH). Se ha observado que la proteína huntingtina cuando tiene una extensión de poliglutaminas, como ocurre en la EH, puede unirse a la GADPH inhibiéndola (Burke y col 1996). También se ha descrito que la GADPH puede unirse a la proteína precursora del  $\beta$  amiloide, implicada en la enfermedad de Alzheimer, aunque las implicaciones patofisiológicas de esta interacción se desconocen (Schulze y col 1993). Se ha reportado además que la actividad de la GADPH se encuentra reducida en fibroblastos de pacientes con estos dos padecimientos (Mazzola y Sirover 2001). También se cree que participa en el inicio de la apoptosis (Berry y Boulton 2000).

## 2.0 Ciclo de Krebs

El piruvato por medio de la piruvato deshidrogenasa se convierte en acetil-CoA generándose también NADH. La acetil-CoA es capaz de incorporarse al ciclo de Krebs condensándose con el oxaloacetato. Este ciclo consiste en 8 reacciones mitocondriales en donde se producen 6 NADH, 2 FADH<sub>2</sub>, 2 ATP y 4 CO<sub>2</sub> por cada dos moléculas de piruvato (Figura 3). Aquí, resulta limitante la disponibilidad de oxaloacetato y de NAD<sup>+</sup>. Además, los intermediarios del ciclo son utilizados en procesos biosintéticos. El ciclo está altamente regulado, siendo las concentraciones altas de ATP y de NADH inhibitorias a varios niveles, mientras que la presencia de ADP estimula el ciclo.

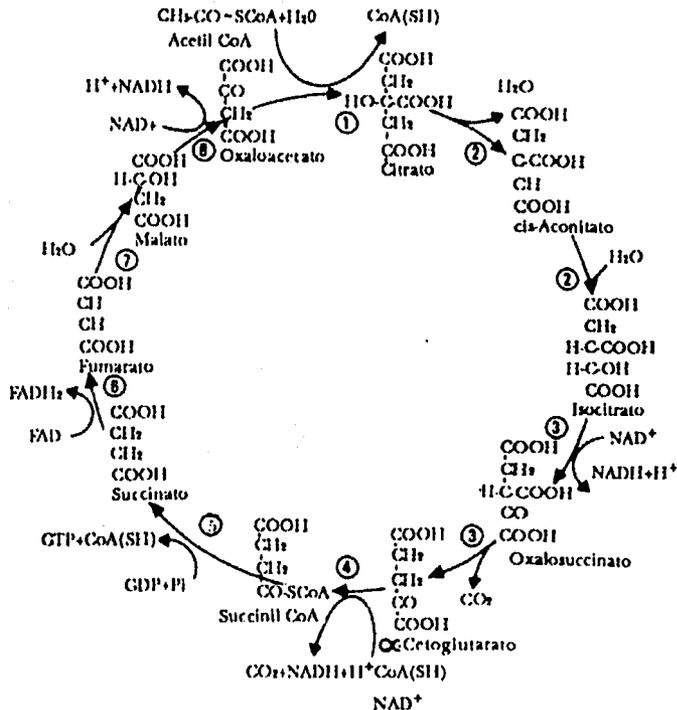


Figura 3. Ciclo de Krebs. Este ciclo se lleva a cabo en la mitocondria, y empieza por la condensación de una molécula de acetil-CoA con una de oxaloacetato formando citrato. Las enzimas del ciclo son: 1) citrato sintasa, 2) aconitasa, 3) isocitrato deshidrogenasa, 4) a-cetoglutarato deshidrogenasa, 5) succinil-CoA sintetasa, 6) succinato deshidrogenasa, 7) fumarasa, 8) malato deshidrogenasa.

### 3.0 Fosforilación Oxidativa

La cadena respiratoria de la mitocondria está compuesta por una serie de acarreadores de electrones, que son proteínas de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar electrones, en una secuencia fija (Figura 4). Aquí los equivalentes reductores donan sus electrones, y éstos fluyen por la cadena respiratoria hasta formar agua a partir de oxígeno molecular. La energía de cada paso se traduce en la salida de  $H^+$  de la matriz mitocondrial donde su concentración es baja, hacia el exterior donde están altamente concentrados. Esto hace que la mitocondria tenga un potencial electroquímico negativo en el interior. Este proceso está acoplado a la ATP sintetasa, la cual utiliza la energía de la entrada de  $H^+$  a la matriz mitocondrial para sintetizar ATP.

En este proceso por cada molécula de NADH se producen 3 de ATP, mientras que por cada  $FADH_2$ , se obtienen 2 de ATP.

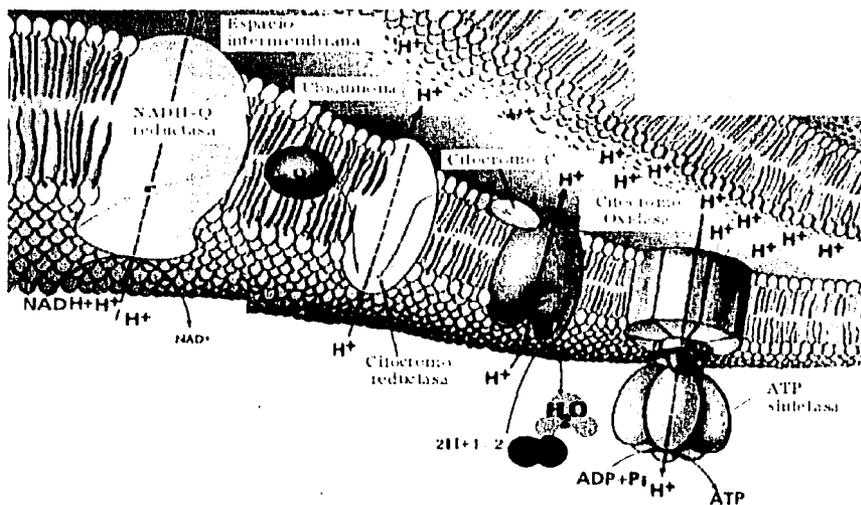


Figura 4. Fosforilación Oxidativa. Se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria, y consiste en una serie de reacciones de oxido-reducción que contribuyen al mantenimiento del potencial electroquímico de la mitocondria, la energía de este potencial se utiliza por la ATP sintetasa para producir ATP.

Tomando esto en cuenta podemos decir que la oxidación completa de una molécula de glucosa produce 38 moléculas de ATP.

#### 4.0 Excitotoxicidad

El glutamato es un aminoácido que actúa como el principal neurotransmisor excitador del SNC. Hace casi 50 años Lucas y Newhouse (1957) administraron glutamato a ratas neonatas, y observaron neurodegeneración en la retina. Sin embargo, fue Olney (1969) quien acuñó el término de excitotoxicidad. Éste se refiere a la propiedad del glutamato y otros aminoácidos excitadores, de causar neurodegeneración por la estimulación excesiva de sus receptores postsinápticos (Olney 1994). En este proceso se han descrito dos fases muy marcadas, la primera consiste en un hinchamiento celular que no es por sí mismo letal, seguida de una desintegración membranal retardada de la membrana que ocurre varias horas después de la exposición. Los mecanismos precisos de este tipo de daño no son muy claros aunque se ha sugerido que ciertos iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) juegan un papel importante, sobre todo el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Choi 1992). Se ha implicado la activación de ciertos receptores postsinápticos glutamatérgicos en la muerte neuronal excitotóxica ya que sus antagonistas son capaces de evitarla (Choi y col 1987; Choi 1988).

#### 4.1 Receptores a glutamato

Existen dos variedades de receptores para el glutamato, unos forman en sí un canal permeable a ciertos iones, por lo que se conocen como receptores ionotrópicos mientras que los otros, están acoplados a proteínas G, las cuales actúan en las cascadas intracelulares de segundos mensajeros y son conocidos como metabotrópicos.

- Receptores ionotrópicos: son pentámeros formados por distintas subunidades, las cuales atraviesan la membrana 4 veces, formando un canal con permeabilidad específica para ciertos cationes. Se han descrito diferentes tipos de estos receptores, con propiedades farmacológicas y electrofisiológicas particulares y se han clasificado de acuerdo a los agonistas que los activan, y estos son: receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor a kainato, y el receptor al ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA). A éstos dos últimos también se les agrupa como receptores no-NMDA (R no-NMDA) puesto que algunas subunidades reconocen a los dos agonistas.
- Receptores no-NMDA (AMPA-kainato): están involucrados en la transmisión sináptica rápida en el SNC, y se desensibilizan rápidamente. Son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Existen diversas subunidades, las cuales se dividen en tres grupos: a) GluR1-GluR4, tienen alta afinidad por AMPA y baja por el kainato. b) GluR5-GluR7, cuyas afinidades por ambos agonistas son similares. c) KA-1 y KA-2, que son más afines por el kainato pero no son capaces de formar por sí solos receptores funcionales. Se ha visto que después de procesos de edición del RNA mensajero, las subunidades GluR2, GluR5 y GluR6 pueden ser permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  (Nakanishi 1992).
- Receptores NMDA (R NMDA): se les ha asociado con fenómenos de plasticidad. Son altamente permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , de manera voltaje-dependiente ya que normalmente el canal está bloqueado por un ión  $\text{Mg}^{2+}$ , y éste se libera cuando hay una despolarización. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por estos receptores es un factor muy importante para el desencadenamiento de la muerte neuronal excitotóxica. Además, el receptor tiene sitios de modulación, donde se unen la glicina, las poliaminas y el  $\text{Zn}^{2+}$ . También tiene otros sitios de regulación, tal como sitios de fosforilación en la parte citoplásmica, los cuales juegan un papel importante en la generación de la potenciación a largo plazo. Existen dos tipos de subunidades, la NMDAR1, de la cual

existen 7 isoformas, y la NMDAR2 de la cual hay 4 subtipos (NMDAR2A-D). Para que el receptor sea funcional se necesita por lo menos una subunidad NMDAR1 combinada con alguna de las NMDAR2 (Nakanishi 1992; Michaelis 1998).

- Receptores metabotrópicos: Constan de 7 dominios transmembranales y están acoplados a proteínas G, las cuales desencadenan diferentes eventos celulares, se cree tienen principalmente un papel regulador. Aunque este tipo de receptores no están involucrados directamente en los efectos tóxicos del glutamato, la activación de algunos subtipos podría potenciar o atenuar el daño (Orlando y col 2001; Bond y col 1999). Están divididos en tres grupos:

- Grupo I: formado por mGluR1 y mGluR5, están relacionados con la activación de la fosfolipasa C aumentando la producción de fosfatidil inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y la consecuente movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular, su agonista más potente es el quisqualato.

- Grupo II: compuesto por mGluR2 y mGluR3 los cuales inhiben a la adenilato ciclasa.

- Grupo III: formado por mGluR4 y mGluR6-8. Uno de sus agonistas más potentes es la L-serina-O-fosfato. También inhiben a la adenilato ciclasa, pero parcialmente (Michaelis 1998).

La neurotoxicidad del glutamato no sólo se ha implicado en la isquemia sino que también se cree que juega un papel importante en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la de Alzheimer y la de Parkinson, aunque en éstas la degeneración se da de manera progresiva y más lenta.

Normalmente el glutamato es retirado rápidamente del espacio sináptico por un sistema de recaptura dependiente del gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>, el cual utiliza la diferencia de concentración de estos iones como fuerza motriz para transportar una molécula de glutamato en contra de su gradiente de concentración junto con 2 ó 3

moléculas de  $\text{Na}^+$  (Gegelashvili y Schousboe 1998). Los transportadores se localizan principalmente en la glia (astrocitos) donde el glutamato es capturado para luego ser convertido a glutamina, siendo ésta liberada y posteriormente capturada por la terminal presináptica. También existen transportadores para glutamato en las terminales nerviosas (Figura 5A).

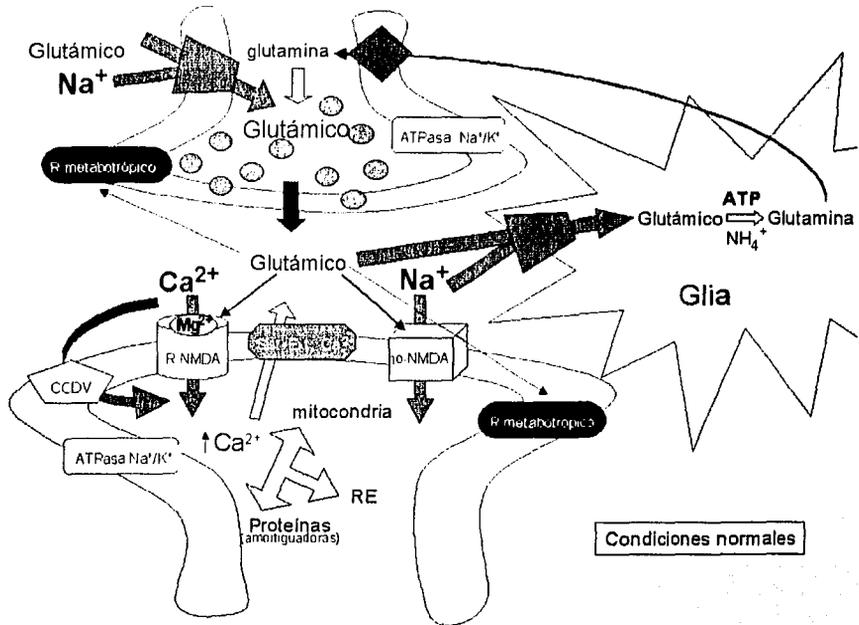
Estudios *in vivo* han demostrado que durante el período isquémico aumentan los niveles de los aminoácidos excitadores (AAE), glutamato y aspartato, en el espacio extracelular (Benveniste y col 1984), y que este aumento es dependiente de la duración del episodio isquémico (Baker y col 1991). Así mismo, durante la hipoglicemia también se ha encontrado que aumentan los niveles extracelulares de AAE (Sandberg y col 1985; 1986). Esta observación, aunada al efecto protector de los antagonistas de los receptores glutamatérgicos contra el daño isquémico/hipoglicémico, ha llevado a sugerir que la muerte neuronal en estas condiciones ocurre por un proceso excitotóxico mediado por la activación de los receptores glutamatérgicos. Se ha propuesto que la acumulación de los AAE está mediada principalmente por la actividad reversa del sistema de recaptura, el cual es dependiente de los gradientes iónicos para su funcionamiento correcto (Rossi y col 2000). Al colapsarse los gradientes iónicos debido a la falla energética, los transportadores pueden funcionar en sentido inverso, liberando glutámico y aspártico al espacio extracelular.

Sin embargo, se ha demostrado que la acumulación *in vivo* de estos aminoácidos, inducida por el bloqueo de sus transportadores, no es suficiente para producir neurodegeneración (Massieu y col 1995) en condiciones normales, aunque sí la produce cuando el metabolismo energético está inhibido (Sánchez-Carbente y Massieu 1999; Massieu y col 2000). Esto concuerda con trabajos previos donde se sugiere que una disminución en el metabolismo energético puede producir muerte neuronal a través de un

mecanismo excitotóxico y contribuir de manera importante a la degeneración inducida por glutamato (Bowling y Beal 1995; Greene y Greenamyre 1996). Se propone que la deficiencia energética hace a las neuronas más susceptibles a la muerte (Figura 5B), puesto que son incapaces de restablecer los gradientes iónicos. Esta condición genera una mayor liberación de glutamato, una recaptura deficiente de este neurotransmisor, y que en la glia su transformación a glutamina sea más lenta puesto que es un proceso dependiente de energía. Además, durante la falla energética, concentraciones bajas de glutamato extraneuronal pueden sobrecargar a las neuronas, ya que el bloqueo por  $Mg^{2+}$  de los R NMDA se pierde (Zeevalk y Nicklas 1992), lo que provoca una mayor actividad de los mismos y por lo tanto una entrada masiva de  $Ca^{2+}$ .

El  $Ca^{2+}$  es capaz de activar proteasas, endonucleasas y fosfolipasas (Reynolds 1998) que contribuyen al deterioro neuronal. El  $Ca^{2+}$  activa a la óxido nítrico sintetasa la cual produce óxido nítrico (NO) (Bredt y Snyder 1990), que difunde y puede producir peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) al reaccionar con el radical superóxido ( $^{\cdot}O_2$ ). Este es un agente oxidante altamente reactivo. La activación de la fosfolipasa A, produce ácido araquidónico el cual al metabolizarse produce especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dumuis y col 1990). Esto aunado a otros procesos, como la disfunción mitocondrial causada por la acumulación de  $Ca^{2+}$ , generan un estado de estrés oxidativo celular, que a su vez agrava la oxidación de lípidos de membrana, contribuyendo al daño (Choi 1992). Recientemente se ha propuesto que la mitocondria juega un papel central en la muerte excitotóxica, ya que si se conserva su integridad (potencial de membrana y síntesis de ATP), el glutamato no tiene un efecto tóxico (Ankarcrona y col 1995; Nicholls y Budd 1998). Por un lado se sabe que la mitocondria es fundamental para la producción de ATP, y que gran parte del metabolismo (ciclo de Krebs, oxidación de los ácidos grasos) se lleva a cabo en ella. Por el otro, se ha demostrado que la estimulación de los receptores a glutamato induce la

A



B

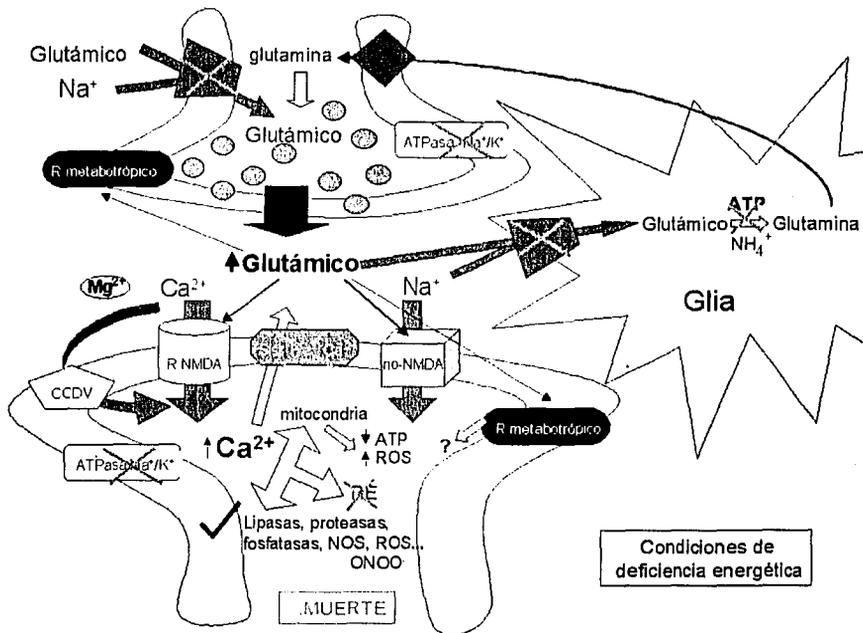


Figura 5. A) Sinapsis en condiciones normales, se observan los diferentes tipos de receptores postsinápticos, así como el sistema de recaptura y el gradiente iónico normal. B) Sinapsis en condiciones de deficiencia energética, donde se muestran todos los procesos que se interrumpen por falta de ATP, la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  y la desregulación que esto genera.

despolarización mitocondrial, y eventualmente la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (Zoratti y Szabo 1995). El bloqueo de este poro con ciclosporina A induce la recuperación del potencial electroquímico mitocondrial previniendo la muerte (Schlinder y col 1996). Por esta razón algunos autores sugieren que la apertura de este poro está involucrada en diversos tipos de muerte (Lemasters y col 1998). Además la mitocondria libera factores, como el citocromo C, que activan cascadas apoptóticas (Yang y col 1997).

#### 4.2 Muerte necrótica y muerte apoptótica

La muerte excitotóxica relacionada con procesos de isquemia e hipoglicemia puede ser tanto necrótica como apoptótica (Dirnagl y col 1999). Clásicamente la necrosis se ha considerado como una muerte rápida e inevitable, con destrucción de membranas y liberación de debris celular, que provoca una respuesta inflamatoria, mientras que la apoptosis se ha considerado como un proceso ordenado que no produce reacción inflamatoria ya que conserva la integridad membranal. Además, es dependiente de energía, hay condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. En este tipo de muerte, se activan proteasas específicas conocidas como caspasas, que desencadenan diversos procesos (McConkey 1998). Cada día se conocen más proteínas involucradas en las cascadas de muerte apoptótica, así como en su regulación; la familia de Bcl-2, que pueden tener efectos pro o anti-apoptóticos; la familia de los factores inductores de apoptosis (AIF) y la de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), entre otras (Hengartner 2000).

La distinción entre estos tipos de muerte en la isquemia, no es tan clara, pues aunque temporalmente estén desfasadas, comparten diversos eventos bioquímicos, como son: disminución en la concentración de ATP, elevación en el  $Ca^{2+}$  citoplásmico, producción de especies reactivas de oxígeno, y ambas son inhibidas por Bcl-2. Todo

parece indicar que los parámetros antes mencionados se presentan más pronunciados en la muerte necrótica; donde se observa una deficiencia energética de más del 70%, y una elevación en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico en el orden micromolar (McConkey 1998). En la apoptosis los cambios en estos parámetros son menos drásticos.

Hay quienes argumentan que el tipo de muerte inducido por glutamato depende del tiempo de exposición, su concentración, y de las consecuencias que estos factores tienen sobre la función mitocondrial (Anakrona y col 1995). Recientemente, un trabajo *in vivo* ha demostrado que en el centro isquémico, donde hay principalmente muerte necrótica, las células tienen características de apoptosis temprana, como condensación de la cromatina y activación de caspasas (8 y 1). De esta manera se ha propuesto que inicialmente se da la señal para iniciar la muerte apoptótica, pero que ésta no se llega a completar ya que la disminución en los niveles energéticos es muy pronunciada, lo que hace que el tipo de muerte se convierta entonces en necrótico (Benchoua y col 2001). Por su parte la extensión del área de penumbra depende de la irrigación colateral, y en ésta se da muerte principalmente de tipo apoptótico, lo que sugiere que los cambios en los parámetros bioquímicos antes mencionados son menos drásticos.

Actualmente otros autores proponen que la muerte inducida por glutamato tiene características mixtas, lo que hace que la distinción entre un tipo de muerte y el otro sea muy compleja (Martin y col 1998; Zeng y Xu 2000).

## 5.0 Cuerpos cetónicos como sustratos energéticos y posibles neuroprotectores

Se sabe que en estados de deficiencia energética, cuando la demanda cerebral de glucosa no se satisface (isquemia/hipoglucemia), se produce muerte neuronal particularmente en el hipocampo que es una de las áreas del cerebro más vulnerables (Foster y col 1988). La vulnerabilidad hipocampal puede asociarse a la presencia

abundante de R NMDA, o bien a que esta zona es muy propensa al estrés oxidativo. Es por ésto, que muchos de los modelos de estudio de estas patologías se llevan a cabo en esta región. Algunos estudios *in vitro* en esta estructura (rebanadas), han demostrado que sustratos energéticos como el piruvato y el lactato son capaces de proteger del daño inducido por glutamato, y también del inducido por la privación de glucosa (Ruiz y col 1998; Izumi y col 1994). Otro estudio *in vivo* ha demostrado que durante la inhibición glicolítica crónica, el piruvato es capaz de proteger contra la muerte neuronal en el hipocampo, y que el daño también es disminuído con el tratamiento de un antagonista de los R NMDA, el MK-801 (Massieu y col 2000).

Por otro lado se sabe que la dieta cetogénica (dieta rica en lípidos y baja en carbohidratos que promueve la síntesis de cuerpos cetónicos (CC)) ha sido utilizada para controlar padecimientos convulsivos, como son las crisis epilépticas, especialmente en casos en donde no hay respuesta a los medicamentos antiepilépticos o en algunos casos infantiles (Gasch 1990; Nordli y col 2001). Los mecanismos involucrados en esto no son muy claros. Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que los CC aumentan la concentración de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y de citrato, y reducen la concentración de aspartato, mientras que la concentración de glutámico no cambia (Yudkoff y col 1997; Dalkhin y Yudkoff 1998). Estos autores proponen que esto puede deberse a que durante el metabolismo de los CC se genera una mayor concentración de acetil-CoA, la cual entrará al ciclo de Krebs condensándose con el oxaloacetato, aumentando los niveles citrato. De esta manera habrá menor disponibilidad de oxaloacetato que es necesario para la reacción de transaminación del glutamato donde se forma el aspartato, quedando el glutamato disponible para descarboxilarse y formar GABA. A estos cambios en el metabolismo cerebral le atribuyen los efectos anticonvulsivantes de los CC, ya que se sabe que agonistas del GABA disminuyen algunos tipos de crisis convulsivas, y que el aspartato está involucrado en su iniciación. Por otra parte el exceso de citrato podría

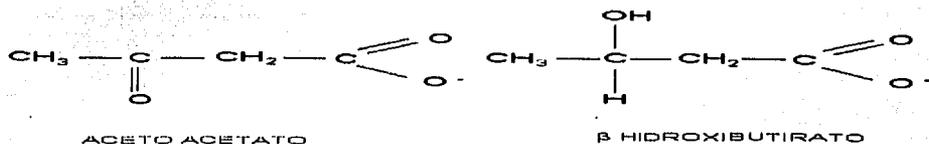
provocar que éste se liberara al espacio extracelular, donde podría actuar como quelante de  $Zn^{2+}$  (Yudkoff y col 1997; Daikhin y Yudkoff 1998). Se sabe que el  $Zn^{2+}$  es un co-agonista de los R NMDA, por lo que su disminución en forma libre podría favorecer la regulación hacia abajo de este tipo de receptores y participar en el control de las crisis. Por el otro lado, se ha demostrado que el  $Zn^{2+}$  puede ser liberado de las terminales y tener efectos tóxicos (Choi y Koh 1998), y que la muerte isquémica puede ser prevenida con quelantes extracelulares de este ion (Koh y col 1996).

La utilización de los CC, como el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), también produce neuroprotección en modelos *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer y de la de Parkinson. En estos modelos se ha observado un aumento de la sobrevivencia neuronal en presencia del BHB en neuronas incubadas con  $\beta$ -amiloide ó con  $MPP^+$  (Kashiwaya y col 2000). Por otro lado, existen evidencias de que la infusión intravenosa prolongada de BHB protege contra el daño en modelos de hipoxia y anoxia en ratones, y de isquemia en ratas (Suzuki y col 2001). De esta manera resulta interesante demostrar el papel protector de los CC, particularmente el acetoacetato (AcAc), en un modelo donde se inhibe tanto la glicólisis crónicamente como la recaptura del glutamato.

### 5.1 Metabolismo y función de los cuerpos cetónicos

Los CC son 3: AcAc, BHB y la acetona. La acetona se forma a partir del AcAc de manera no enzimática, se produce en cantidades mínimas y es exhalada en la respiración, por lo que no es importante en el metabolismo. Cuando en este trabajo se mencione a los CC es para referirse exclusivamente al AcAc y al BHB.

La estructura química de los CC es la siguiente:



Normalmente, en el animal adulto la concentración sanguínea de los CC es muy baja, siendo mayor la del BHB (0.16 mM-0.23 mM) que la del AcAc (0.03-0.05 mM) (Kammula 1976; Hasselbaich y col 1995), pero ésta aumenta (aproximadamente 30 veces) en respuesta a alteraciones en el estado fisiológico (Robinson y Williamson 1980). Estas alteraciones pueden ser: trastornos metabólicos como la diabetes, condiciones de hipoglucemia infantil, períodos de ayuno prolongados, y dietas ricas en grasas. Fisiológicamente la concentración de CC es alta durante el embarazo y el período postnatal.

Su principal función es la de ser utilizados como sustratos energéticos alternos a la glucosa. En el cerebro se utilizan en condiciones en las que la oxidación de glucosa no satisface las necesidades cerebrales. La primera demostración de su utilización se hizo en sujetos obesos con períodos de ayuno prolongado, en los cuales no se observó degradación de proteínas corroborándose su utilización (Owen y col 1967). También se ha visto que están involucrados en la lipogénesis cerebral durante la etapa postnatal temprana (Patel y Owen 1976; 1977), y que pueden ser precursores de aminoácidos. Se producen principalmente en el hígado como resultado de la oxidación de ácidos grasos. Su síntesis está altamente regulada, no sólo a nivel global por hormonas (insulina y glucagon) que actúan sobre el tejido adiposo, sino a nivel local, es decir, existe un control intrahepático. Este control radica en la capacidad de la malonil-CoA, un intermediario de la lipogénesis, de inhibir a la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), la cual es necesaria para que los ácidos grasos de cadena larga entren a la mitocondria para ser oxidados, y por tanto se formen más cuerpos cetónicos (Robinson y Williamson 1980). También se sabe que los niveles de cAMP regulan esta vía activando una cinasa, la cual inhibe a una carboxilasa que se encarga de producir malonil-CoA. Al disminuir sus niveles se desinhibe a la CPT I lo que induce la cetogénesis (Guzmán y Blázquez 2001).

Recientemente se ha reportado que también en los astrocitos se pueden sintetizar los CC a partir de ácidos grasos (Auestad 1991) y de leucina (Bixel y Hamprecht 1995), teniendo esta producción propiedades similares a la síntesis hepática (Guzmán y Blázquez 2001) tanto a nivel de regulación, como de algunas enzimas. La vía de síntesis de los CC así como su vía de utilización se muestran en la Figura 6.

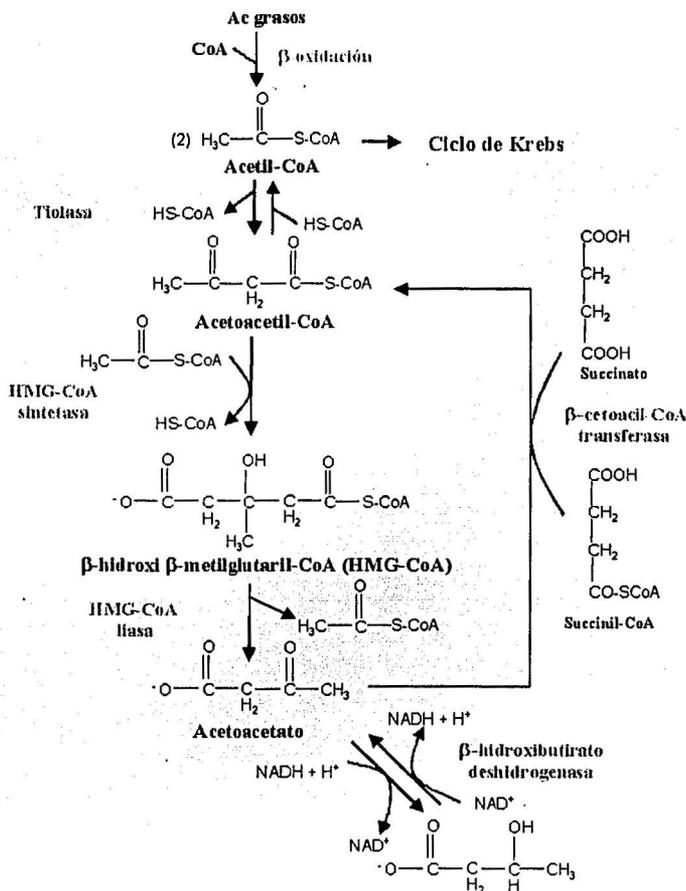


Figura 6. Vía de síntesis y de utilización de los CC. Las flechas muestran la vía de síntesis de los cuerpos cetónicos que se lleva a cabo principalmente en las mitocondrias hepáticas, como resultado de la oxidación de los ácidos grasos. Las flechas rojas indican la vía de utilización de los CC. Las enzimas involucradas en esta vía difieren de un tejido a otro, las aquí mostradas son las que participan en la utilización de los cuerpos cetónicos por el cerebro.

Como se puede observar, la síntesis hepática y la utilización cerebral difieren un poco, teniendo la vía cerebral una reacción menos. La actividad de la  $\beta$ -cetoacil-CoA transferasa reemplaza a la de la acetoacetyl-CoA sintetasa cuya actividad no se conserva en el cerebro adulto (Robinson y Williamson 1980). Todas las enzimas necesarias para la utilización de los CC están presentes en el adulto en grandes cantidades (Williamson y col 1971). La acetyl-CoA, resultado de la utilización de los CC, se incorpora al ciclo de Krebs como sustrato energético, donde se producirán equivalentes reductores, que al pasar por la cadena de electrones producirán la energía suficiente para la síntesis de ATP. De esta manera los CC son utilizados como sustratos energéticos a través del ciclo de Krebs.

Se ha demostrado que la utilización de los CC es directamente proporcional a su concentración en la sangre (Hawkins 1971a), y que ésta es independiente del estado nutricional del animal (Hawkins 1971b; Kammula 1976). Experimentos con los animales bien alimentados muestran la utilización de AcAc cuando éste se les infunde intravenosamente. Además, se ha mostrado que el flujo cerebral de los CC es mínimo, mientras que el flujo de piruvato y lactato se observa en mayor o menor medida siempre que sean transportados al cerebro (Daniel y col 1973). También se ha visto que en presencia de los CC disminuye la oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos (Robinson y Williamson 1980; Ruderman y col 1974).

### 5.1 Barrera Hematoencefálica y el paso de los CC

La barrera hematoencefálica (BHE) fue descrita hace aproximadamente 100 años, cuando Ehrlich inyectó colorantes en animales de laboratorio y vio como todos los órganos se teñían a excepción del cerebro, concluyendo que el cerebro tenía pocos sitios de unión para el colorante. En contraposición a esta hipótesis, Goldman encontró que la inyección directa del colorante al líquido cefaloraquídeo resultaba en su transporte al

cerebro (Pardridge 1983). Hubo experimentos semejantes con otros compuestos y se llegó a la conclusión de que el SNC está separado del torrente sanguíneo por la BHE. Ésta consiste en células endoteliales, de los capilares cerebrales, que están unidas a través de uniones estrechas sin fenestraciones, lo que forma una barrera continua entre la sangre y el líquido intersticial (Pardridge 1983). Ahora sabemos que la función principal de la BHE es la de aislar al cerebro de las fluctuaciones iónicas que ocurren en la sangre, de esta manera se logra que el medio que baña al cerebro sea constante, lo cual es imprescindible para su funcionamiento. Por tanto las moléculas para llegar al cerebro deben de atravesar esta barrera. Se sabe que el transportador de la glucosa es el más abundante y activo, pero existen otros sistemas para transportar otras sustancias.

En 1975 se demostró que el paso de los CC a través de la BHE es un proceso saturable (Gjedde y Crone 1975), y que existe competencia entre el AcAc y el BHB, transportándose el primero más eficientemente (Hawkins y col 1971b). También se demostró que el transporte es un proceso inducible (Gjedde y Crone 1975; Daniel y col 1977; Hasselbach y col 1995; Pan y col 2001) por la presencia de CC en la sangre, sobre todo si ésta se da de manera continua como durante los periodos de ayuno. El transportador que está involucrado en este proceso es el transportador de los ácidos monocarboxílicos, el cual también acarrea lactato, piruvato y los  $\alpha$ -cetoácidos de varios aminoácidos neutros (Pardridge 1991).

En conclusión, la oxidación de los CC en el cerebro está limitada por su paso a través de la BHE y por la concentración de éstos en la sangre. Así como también por la disponibilidad del oxaloacetato y de la CoA para que puedan incorporarse al ciclo de Krebs.

## 6.0 Modelo Experimental.

Anteriormente se mencionó que la muerte neuronal hipoglucémica presenta características similares a la muerte neuronal isquémica, ya que : 1) induce la liberación de glutamato y aspartato (Sandberg y col 1985; 1986) posiblemente a través de la acción inversa de sus transportadores (Gemba y col 1994; Longuemare y col 1999); 2) es contrarrestada con antagonistas de los R NMDA (Wieloch 1985; Zeevalk y Niklas 1992) y 3) las neuronas del hipocampo son particularmente sensibles al daño hipoglucémico (Izumi y col 1994). Por otro lado se ha demostrado que algunas de estas características, como la disminución del daño con antagonistas de los R NMDA son reproducibles utilizando el modelo de inhibición glicolítica (Massieu y col 2000), por esta razón la inhibición glicolítica crónica aunada a la inhibición de la recaptura de glutamato puede ser un buen modelo farmacológico para el estudio de los mecanismos de muerte neuronal asociados a la isquemia/hipoglucemia y para estudiar el potencial efecto neuroprotector de sustratos alternativos a la glucosa.

Estudios previos en el laboratorio han demostrado que la acumulación de glutamato en el espacio extracelular inducida por el L-trans 2,4-pirrolidin dicarboxilato (PDC), el cual es un inhibidor sustrato del transportador de glutamato, no produce muerte neuronal en el hipocampo de ratas intactas, pero si en ratas tratadas crónicamente con el yodoacetato (Massieu y col 2000). Este modelo reproduce algunos de los eventos que ocurren durante la isquemia y la hipoglucemia cerebral, como son la deficiencia energética y el aumento de la concentración de glutamato extracelular, de tal manera que nos permite estudiar los mecanismos de muerte neuronal asociados a la isquemia/hipoglucemia y su posible protección con algunos fármacos.

Como se mencionó anteriormente se eligió el AcAc como posible neuroprotector ya que reportes recientes favorecen la idea de que los cuerpos cetónicos pueden

disminuir la muerte neuronal en ciertos modelos, y además por que se conoce que durante la hipoglicemia existe la utilización de este compuesto como sustrato alternativo a la glucosa.

## II HIPÓTESIS

Debido a que el cerebro es capaz de utilizar los cuerpos cetónicos como sustratos metabólicos, la administración de AcAc será capaz de proteger contra la muerte neuronal excitotóxica en la región CA1 del hipocampo en ratas cuya glicólisis ha sido inhibida, al restaurar los niveles de ATP celulares.

### III OBJETIVOS

#### 1.0 Objetivo General

Estudiar el posible efecto protector del AcAc en la muerte inducida por PDC en la región CA1 del hipocampo, en un modelo crónico *in vivo* de inhibición glicolítica, utilizando IOA. Evaluar si el efecto protector del AcAc involucra la recuperación de los niveles de ATP en el hipocampo.

#### 2.0 Objetivos Particulares

- Probar diferentes protocolos de administración del AcAc y determinar su eficacia neuroprotectora ante el daño excitotóxico inducido por la inhibición de la recaptura de glutamato, en ratas con inhibición glicolítica crónica.
- Determinar las concentraciones de ATP, a diferentes tiempos (0.5, 1, 4, 8 h), en el hipocampo de ratas después de la administración crónica de IOA. Con fines comparativos, los niveles de ATP también se determinaron en el estriado de la rata bajo las mismas condiciones.
- Evaluar si el AcAc administrado por diferentes vías tiene algún efecto sobre los niveles de ATP en el hipocampo y el estriado de ratas cuya glicólisis ha sido inhibida crónicamente.

## IV METODOLOGÍA

### 1.0 Materiales

Se utilizaron los siguientes compuestos: el AcAc (sal de litio), el IOA (sal de sodio) de SIGMA, mientras que el L-trans-2,4-pirrolidin dicarboxilato (PDC) se obtuvo de TOCRIS. El AcAc se disolvió en buffer de fosfatos (10 mM) y se ajustó el pH a 7-7.5 con ácido clorhídrico (HCl 0.1 M). El IOA se disolvió en buffer de fosfatos (10 mM), mientras que el PDC se preparó disolviéndolo en buffer de fosfatos (10 mM) y ajustando el pH a 7-7.5 con hidróxido de sodio (0.1 M). El kit para cuantificar el ATP se obtuvo de Molecular Probes.

### 2.0 Cirugía

Para este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 250-300 g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y con un ciclo de luz-obscuridad fijo. Los animales tuvieron alimento y agua *ad libitum*. Para la cirugía las ratas se anestesiaron con 4% de halotano en una mezcla de O<sub>2</sub> 95%/CO<sub>2</sub> 5%. Ya anestesiadas se montaron en un aparato estereotáxico y se fijaron de los espacios interaurales con la barra dental en la posición -3.3. Durante la cirugía la anestesia se mantuvo al 1%. La piel de la cabeza se cortó con un bisturi, exponiendo el cráneo. A partir de bregma las coordenadas correspondientes a la región CA1 del hipocampo se tomaron de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). Éstas fueron: anteroposterior -3.6, lateral +2 y vertical -2.5 a partir de la dura madre. El cráneo se perforó siguiendo las coordenadas antes mencionadas, y se inyectó PDC (500 nmol) en un volumen total de 1 µl. La inyección se llevó a cabo con un flujo constante de 0.5 µl/min, a través de una

aguja Hamilton de calibre 27 conectada por medio de una cánula a una jeringa colocada en una bomba de microinyección. Al terminar la inyección se esperaron 2 minutos antes de retirar la aguja. Después la piel fue suturada. Los animales control recibieron una inyección intrahipocámpal (i.h.) de buffer de fosfatos (10 mM).

### 3.0 Histología

Después de 24 horas, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p.) con una sobredosis de pentobarbital, con el objeto de anestesiarse profundamente a las ratas. Posteriormente, las ratas fueron perfundidas intracardiamente con 250 ml de solución salina al 0.9%, seguida de una solución fijadora de formaldehído al 4% en buffer de fosfatos (0.1 M) pH 7.3. Después, los cerebros fueron extraídos y permanecieron en la solución fijadora durante una noche. Al día siguiente los cerebros se pasaron por un gradiente de sacarosa: primero al 20% y después al 30%, disuelta en buffer de fosfatos (10 mM), permaneciendo en cada solución aproximadamente 24 horas. Posteriormente fueron cortados en un criostato, haciendo rebanadas coronales de 40  $\mu\text{m}$ , que fueron teñidas por el método de Nissl.

En los cortes teñidos se midió el volumen de lesión con un microscopio óptico acoplado a un sistema de análisis de imágenes (Macintosh NIH Image 1.6). El volumen se calculó de la siguiente manera: se midió el área de lesión en cada corte dañado, delimitándola manualmente. Se hizo después una sumatoria de estas mediciones, y se multiplicó por el número de cortes medidos y por 40  $\mu\text{m}$  que es el grosor de las rebanadas. Posteriormente, los resultados fueron analizados con una prueba estadística de ANOVA seguida de una prueba POSTHOC de Fisher.

#### 4.0 Inhibición de la glicólisis

Para el modelo de inhibición glicolítica crónica se siguió el protocolo descrito por Massieu y col (2000), el cual consiste en dar una inyección i.p. por día de IOA (15 mg/Kg), durante tres días. A las ratas control se les administró i.p. buffer de fosfatos (10 mM).

#### 5.0 Protocolos de Neuroprotección

Después de una hora de la tercera administración de IOA, las ratas fueron inyectadas en la región CA1 del hipocampo con PDC (500 nmol/ $\mu$ l). Se usaron diferentes protocolos y concentraciones de AcAc (descritas en la Tabla 1) con el fin de evaluar la potencialidad neuroprotectora de este compuesto. A continuación se describen con más detalle.

Protocolos Crónicos: consistieron en administraciones diarias o continuas de AcAc, antes de iniciar el tratamiento con IOA, durante éste, e incluso después del PDC.

- Grupo I (s.c.): a este grupo se le colocó subcutáneamente (s.c.) una minibomba Alzet modelo 2002, con AcAc (600 mM), 10 días antes de la primera administración de IOA. La bomba mini-osmótica libera 0.5  $\mu$ l cada hora, lo que hizo que cada rata recibiera por día un total de 7.2  $\mu$ mol, de manera continua. Las bombas se retiraron el día del sacrificio, y se corroboró que éstas hubieran funcionado (la bomba se observa encogida). Las ratas recibieron en estos 14 días un total de 100  $\mu$ mol. La implantación de las bombas se realizó bajo anestesia, después rasurar el pelo del lomo de las ratas y hacer una pequeña incisión en la piel por donde se le colocó la bomba, previamente activada, por debajo de la extremidad anterior. Posteriormente se suturó

y se aplicó una pomada antiséptica. La activación de la bomba se llevó a cabo incubándola a 37°C en solución salina entre 18 y 24 h. Antes de implantarse se verificó que la solución se hubiera desplazado.

- Grupo II: recibió en total 8 inyecciones i.p. de AcAc (250 mg/Kg) de la siguiente manera: 4 inyecciones previas al tratamiento con IOA, una en cada día de tratamiento con IOA (administrándose 30 min después de éste), y en el último día se administró una inyección adicional 1.5 h después de IOA.

Protocolos Agudos: consisten en administraciones de AcAc sólo en el último día de tratamiento con IOA ó posteriores a éste:

- Grupo III (i.v.): se le administró una sola inyección de AcAc (200 mM) por vía intravenosa (i.v.) 45 minutos después de la última administración de IOA. Para ello, bajo anestesia, se colocaron las ratas en el estereotáxico y se inyectaron por la vena lateral de la cola, a través de una pequeña incisión con una aguja Hamilton de calibre 30 acoplada a un sistema de tubería que la conecta con una jeringa de insulina de 1 ml colocada en la bomba de microinyección. Se inyectó 100  $\mu$ mol de AcAc a un flujo de 34  $\mu$ l/min durante 15 minutos, en un volumen total de 500  $\mu$ l. Inmediatamente después las ratas recibieron el PDC vía i.h..
- Grupo IV: este grupo recibió tres administraciones i.p. de AcAc (250 mg/Kg) posteriores al tratamiento con IOA. La primera se aplicó 30 min después de la última inyección de IOA, la segunda inmediatamente después del PDC, es decir, una hora después del IOA, y la tercera hora y media después del IOA.

Los protocolos de administración se resumen en la Tabla 1.

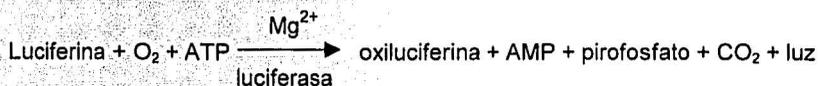
TABLA 1

Grupo	Compuesto	Dosis	Protocolo de Administración		
			Antes IOA	Durante IOA	Post-tratamiento
<b>CRÓNICO</b>					
I	Acetoacetato (s.c.)	7.2 $\mu\text{mol/d}$ (100 $\mu\text{mol}$ totales)	10 d	3 d	1 d
II	Acetoacetato (i.p.)	250 mg/Kg/inyección (690 $\mu\text{mol}$ /inyección)	4 d	2 d	0.5 h y 1.5 h
<b>AGUDO</b>					
III	Acetoacetato (i.v.)	100 $\mu\text{mol}$	--	--	45 min.
IV	Acetoacetato (i.p.)	250 mg/Kg (690 $\mu\text{mol}$ /inyección)	--	--	0.5 h, 1 h y 1.5 h

Todos los animales recibieron 3 inyecciones i.p. de IOA (15mg/Kg/día) y una hora después de la tercera dosis, fueron inyectadas en el hipocampo con PDC (500 nmol) y fueron perfundidas 24 h después.

## 6.0 Determinación de los niveles de ATP

Para la determinación de los niveles de ATP se utilizó una técnica luminométrica por medio de la reacción de la luciferina/luciferasa. El ensayo se basa en el requerimiento de ATP de la luciferasa para producir luz. La reacción es la siguiente:



Las ratas se sacrificaron por decapitación a diferentes tiempos después de haber recibido los diferentes tratamientos. La cabeza fue colocada de inmediato en nitrógeno líquido para asegurar su rápida congelación, posteriormente se realizó la disección del estriado y del hipocampo en hielo seco. El tejido se pesó y se homogenizó en ácido perclórico (0.4 M) y se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y éste se neutralizó con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1 M) agregando el 9% del volumen del ácido perclórico añadido. Al día siguiente se centrifugó en una microcentrifuga durante 30

segundos, para precipitar las sales. Se colectó el sobrenadante y éste se utilizó para cuantificar los niveles de ATP.

Para cuantificar los niveles de ATP se preparó un buffer de reacción siguiendo las instrucciones del kit de determinación de ATP. Este buffer contiene la enzima luciferasa, la luciferina (10 mM), DTT (0.1 M), y buffer de fosfatos. A los tubos del luminómetro se les agregó 5  $\mu$ l de la muestra diluida (1:4) y 195  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, y se colocaron en el luminómetro. Posteriormente se les agregó 300  $\mu$ l de la mezcla de reacción. El luminómetro registra en milivolts la luminiscencia producida por la reacción de la enzima luciferasa, y los cálculos de la concentración de ATP se realizaron con la ayuda de una curva patrón de ATP realizada el mismo día. Para la curva patrón se colocaron 200  $\mu$ l de una solución estándar de ATP de diferentes concentraciones (15, 31, 62 y 125 pmol) y después se agregaron 300  $\mu$ l del buffer de reacción. Los datos se muestran como pmol de ATP /  $\mu$ g de peso fresco de tejido.

Con este método se realizó un curso temporal de los cambios en los niveles de ATP en el estriado y el hipocampo de ratas tratadas con IOA. Como control positivo se cuantificaron los niveles de ATP en el hipocampo 1 h y 3 h después de la administración aguda de IOA (50 nmol), la cual produce daño neuronal severo después de 24 h. Los controles fueron inyectados vía i.h. con salina (0.9%).

Por otro lado se evaluó el efecto del AcAc sobre los niveles de ATP. Ésto se hizo siguiendo el protocolo intravenoso de los experimentos de protección. El AcAc se infundió intravenosamente (100  $\mu$ mol) 45 min después de la última administración de IOA y se sacrificaron los animales 30 min después de haber concluido la inyección i.v.. En un segundo experimento se cuantificaron los niveles de ATP después de una administración i.p. de AcAc inmediatamente después de la última dosis de IOA, sacrificando a los animales media hora después.

## V RESULTADOS

### 1.0 Observaciones macroscópicas

Algunas de las ratas tratadas crónicamente con el inhibidor irreversible de la glicólisis (el IOA) presentaron inflamación abdominal, mientras que todas ellas perdieron peso durante el tratamiento. Las ratas controles que recibieron inyecciones i.p. de vehículo no presentaron el hinchamiento abdominal y aumentaron de peso normalmente.

### 2.0 Ensayos de neuroprotección

Los resultados de los ensayos de neuroprotección se muestran en la Figura 7. La magnitud de la lesión lesiones en la capa CA1 del hipocampo, se expresa como volumen de lesión (descrito en la metodología). En estos resultados se observa claramente que el PDC inyectado por sí solo en el hipocampo produce sólo una pequeña lesión ( $0.45\text{mm}^3$ ), la cual es mayor pero no es estadísticamente diferente de la lesión observada en las ratas control inyectadas con vehículo (buffer de fosfatos 10mM). Estas lesiones corresponden al daño mecánico producido por el tracto de la aguja. Por otro lado se observa claramente que en las ratas tratadas con IOA el daño producido por el PDC se exagera, y el volumen de lesión significativamente mayor ( $p < .008$ ), en comparación con las ratas que recibieron el PDC y que no fueron tratadas con IOA.

Por su parte, todos los protocolos probados de protección del AcAc redujeron eficientemente el volumen de la lesión producida por el PDC en las ratas tratadas con IOA. En el Grupo I, que recibió las dosis s.c. de AcAc ( $7.2 \mu\text{mol/día}$ ) de una manera paulatina y continua por medio de una bomba mini-osmótica, se observa una reducción del volumen de lesión de un 85%. En el Grupo II, que se trató crónicamente con AcAc

(250 mg/Kg) i.p. durante 7 días se observa una protección de un 76%. Utilizando los protocolos agudos, el AcAc indujo una reducción de la lesión de un 73% en el caso del Grupo III, el cual recibió AcAc (100  $\mu$ mol) de manera i.v. y en un 59% en el caso del Grupo IV que recibió tres dosis i.p. de AcAc (250 mg/Kg) posteriores a la tercera inyección de IOA. La reducción del volumen de lesión fue estadísticamente significativa, teniendo cada grupo el siguiente valor de p: Grupo I p=.0016, Grupo II p=.0072, Grupo III p=.0062, Grupo IV p=.0332.

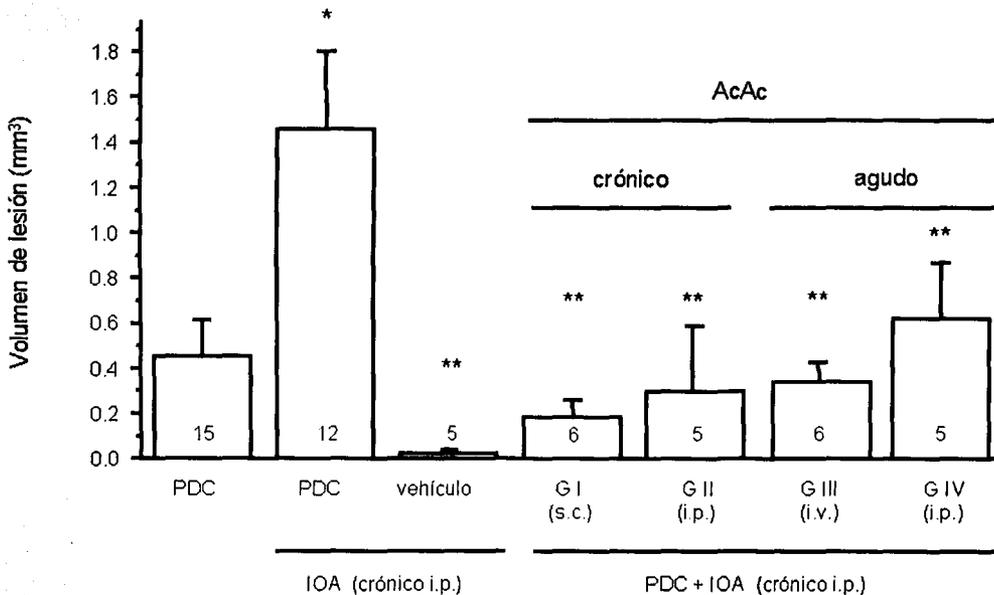


Figura 7. Neuroprotección con AcAc en la capa CA1 del hipocampo. Las ratas tratadas con IOA + PDC muestran una lesión diferente estadísticamente (\*) ( $p < .008$ ) a la de las ratas intactas inyectadas con PDC. Las lesiones en las ratas tratadas con AcAc son menores y estadísticamente diferentes (\*\*) con respecto a las del grupo que recibió IOA + PDC. (Grupo I  $p = .0016$ , Grupo II  $p = .0072$ , Grupo III  $p = .0062$ , Grupo IV  $p = .0332$ ). Dentro de las columnas se muestra el número de ratas utilizado en cada grupo y las líneas representan el error estándar.

Tanto la administración crónica de AcAc como la infusión i.v. protegieron eficientemente contra los efectos tóxicos del PDC en ratas tratadas con IOA, sólo la

administración post-tratamiento fue menos eficiente la neuroprotección observada tuvo una menor significancia estadística.

El AcAc no solo redujo el área promedio de lesión por corte, sino también la extensión del daño, es decir, en las ratas tratadas con el AcAc el número de cortes con daño en la región CA1 fue menor. En la Figura 8 se muestran cortes coronales teñidos con violeta de cresilo correspondientes a los resultados mostrados en la Figura 7, con una amplificación de 4X. Estos cortes son representativos de cada uno de los tratamientos experimentales. Las ratas inyectadas con vehículo presentan daño sólo en el tracto que dejó el paso de la aguja. La inyección con PDC en las ratas intactas produjo una lesión muy pequeña, mientras que en las tratadas con IOA, este mismo compuesto provocó una lesión que se extiende por la región CA1 del hipocampo, caracterizada por pérdida neuronal y el adelgazamiento de esta capa. Las células que se observan presentan núcleos encogidos y picnóticos, intensamente teñidos por la condensación de la cromatina. En esta figura también se observa que el área de lesión en las ratas tratadas con AcAc por diferentes rutas es mucho menor, y que la pérdida neuronal en la zona de lesión no es tan severa, pues la capa CA1 no está tan adelgazada.

Acercamientos de estos cortes usando amplificaciones mayores (10X y 60X) se muestran en la Figura 9. En esta figura se muestran cortes representativos de ratas tratadas con vehículo (i.h.), PDC (i.h.), IOA + PDC y del Grupo III, el cual recibió 100  $\mu\text{mol}$  de AcAc (i.v.). Los resultados presentados demuestran que en las ratas inyectadas con vehículo (i.h.) y con PDC (i.h.), únicamente se presentan células picnóticas en el área de lesión la cual está delimitada por células con apariencia normal (sombras grandes y ovaladas). En las ratas inyectadas con PDC tratadas crónicamente con IOA, la lesión es más extensa y está compuesta de células picnóticas, algunas de ellas con núcleos fragmentados (flechas), característicos de la muerte apoptótica. En el lado contralateral de esta misma rata las células están intactas (recuadro). En las ratas tratadas con AcAc (i.v.)

se observa la coexistencia de células aparentemente sanas (ovaladas, con núcleos intensamente teñidos, y procesos bien definidos) y de células muertas que se ven totalmente encogidas.

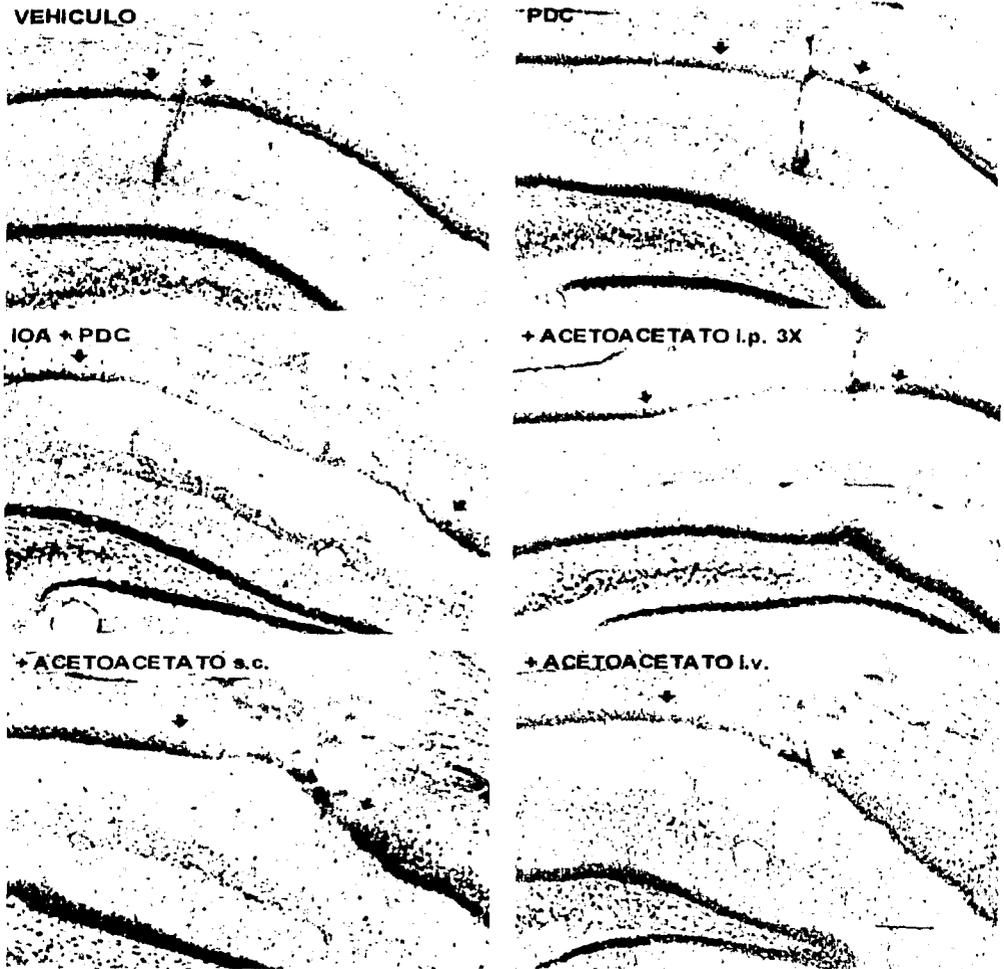


Figura 8. Cortes histológicos del hipocampo que representan los resultados del ensayo de neuroprotección. Se muestran cortes de 40  $\mu\text{m}$  teñidos con violeta de cresilo con una amplificación 4X. Las flechas delimitan el área de lesión. Se observa claramente como el tratamiento con AcAc disminuye la extensión de la lesión producida por la combinación del IOA con el PDC. La línea de calibración representa 200  $\mu\text{m}$ .

TEJIS CON  
FALLA DE ORIGEN

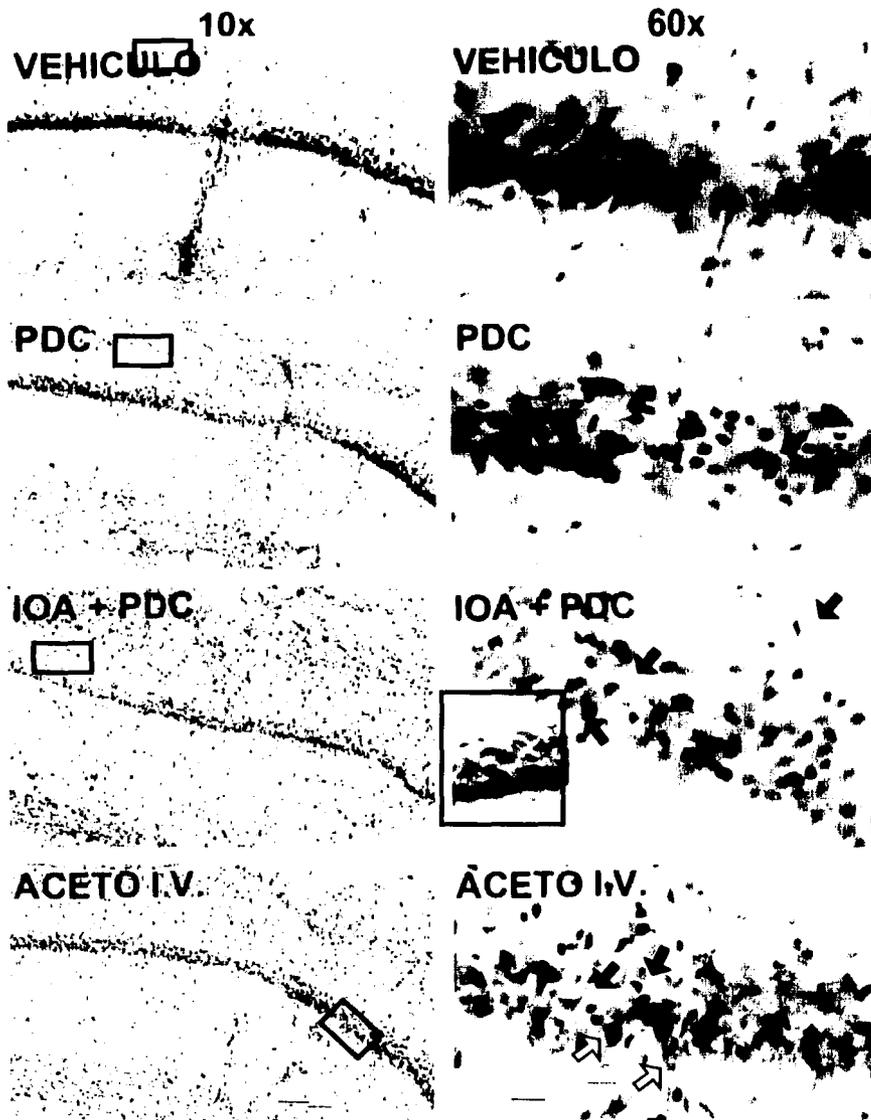


Figura 9. Detalles de los cortes histológicos del hipocampo correspondientes al ensayo de neuroprotección. En el lado izquierdo se muestran cortes con amplificación de 10X (barra de calibración = 100  $\mu$ m). En el lado derecho se muestra en detalle la región de la lesión con una amplificación de 60X (barra de calibración = 10  $\mu$ m). Se observa como en las ratas controles (buffer y PDC) la lesión es pequeña y en ella todas las células están muertas. En los cortes de las ratas tratadas con IOA + PDC se observa una pérdida neuronal masiva y células picnóticas. Las flechas señalan células con núcleo condensado y fragmentado. En el recuadro se muestra la capa CA1 del lado contralateral donde las células están intactas. En las ratas tratadas con AcAc se observa menor pérdida neuronal y coexistencia de células con apariencia normal (flechas vacías) y picnóticas (flechas rellenas).

Trabajos previos en el laboratorio han mostrado que en el cuerpo estriado de la rata, al igual que en el hipocampo, la lesión producida por la administración de PDC se exagera en las ratas tratadas crónicamente con IOA (Figura 10).

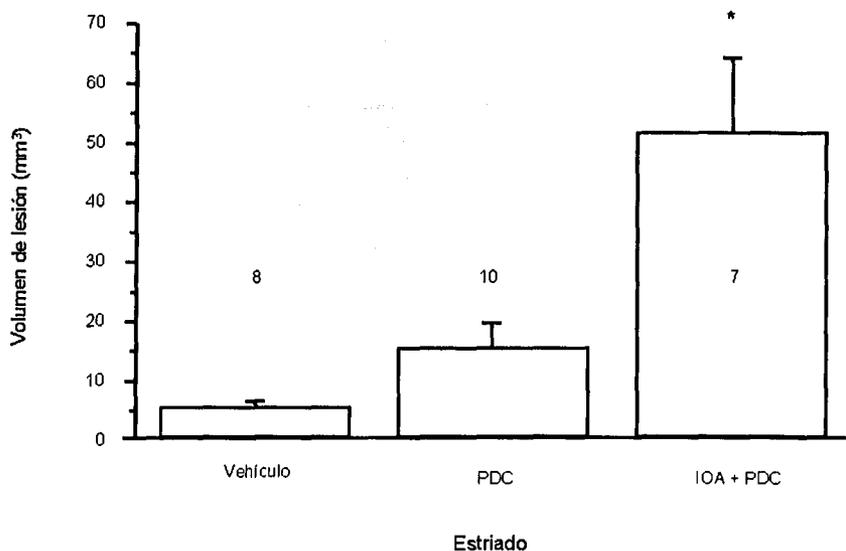


Figura 10. Las lesiones producidas por el PDC (500nmol) en el cuerpo estriado de ratas normales son pequeñas y no difieren estadísticamente con respecto a las ratas inyectadas con vehículo (salina 0.9%). En las ratas tratadas crónicamente con IOA (15mg/Kg) el volumen de lesión es mayor y estadísticamente diferente al de las ratas inyectadas con vehículo ( $p=0.0006$ ) o con PDC sólo ( $p=0.0023$ ). Las líneas representan los errores estándar.

### 3.0 Cuantificación de los niveles de ATP

Con el fin de caracterizar la disminución energética en el modelo de inhibición glicolítica se evaluó el efecto de las administraciones de IOA sobre los niveles de ATP celulares en el hipocampo y en el estriado. De esta manera, se realizó un estudio comparativo de los niveles de ATP en estas dos regiones.

## Administraciones sistémicas

La Figura 11 muestra los niveles de ATP en el hipocampo y en el estriado de la rata a diferentes tiempos (0,5, 1,4 y 8 h) después de la tercera dosis de IOA.

En el caso del hipocampo se observa una disminución sostenida en los niveles de ATP del 22% con respecto a los animales control durante la primera hora, mientras que a las 4 h hay una ligera recuperación, quedando los niveles sólo un 10% por debajo del control y recuperándose por completo a las 8 h. Sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa a ningún tiempo. En el caso del estriado la disminución de los niveles de ATP es más lenta, observándose la máxima reducción una hora después de la administración de IOA, donde los valores bajan un 20%. La recuperación de los niveles de ATP es más rápida y 4 h después del tratamiento con IOA los valores son iguales a los del control. En este caso la disminución en los niveles de ATP tampoco fue estadísticamente significativa en ninguno de los tiempos estudiados.

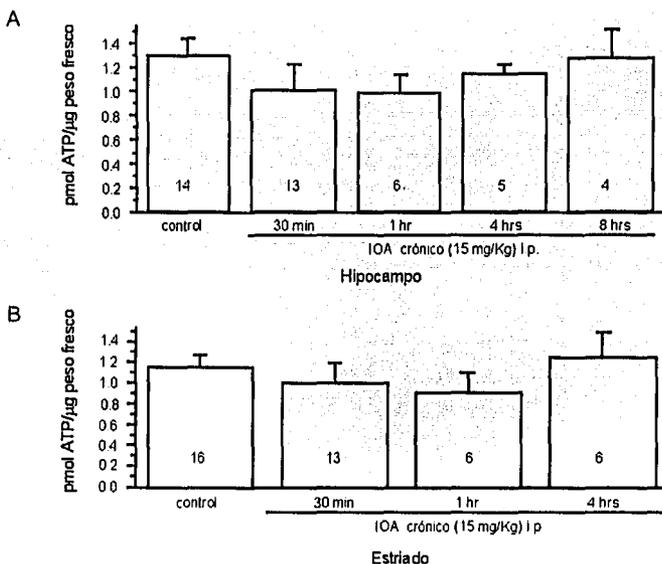


Figura 11. Efecto del tratamiento crónico con IOA sobre los niveles de ATP cuantificados a diferentes tiempos después de la última administración de IOA. A) Hipocampo. B) Estriado. En ninguno de las dos estructuras encontramos diferencias significativas. A tiempos cortos se observa una reducción de aproximadamente el 20% con respecto a los niveles en las ratas control. Las líneas representan los errores estándar.

Tomando en cuenta estos resultados y los obtenidos en los protocolos de neuroprotección, decidimos evaluar si el AcAc tenía algún efecto sobre los niveles de ATP, ya que este CC es capaz de incorporarse al ciclo de Krebs. Para ello utilizamos uno de los protocolos utilizados en los experimentos de neuroprotección. Las ratas recibieron una inyección i.v. de AcAc (100  $\mu$ mol) 45 minutos después de la tercera administración de IOA y fueron sacrificadas media hora después. Los resultados se muestran en la Figura 12. Se observa una ligera tendencia del AcAc de aumentar los niveles de ATP, aunque esto solo es significativo con respecto al control en el caso del estriado.

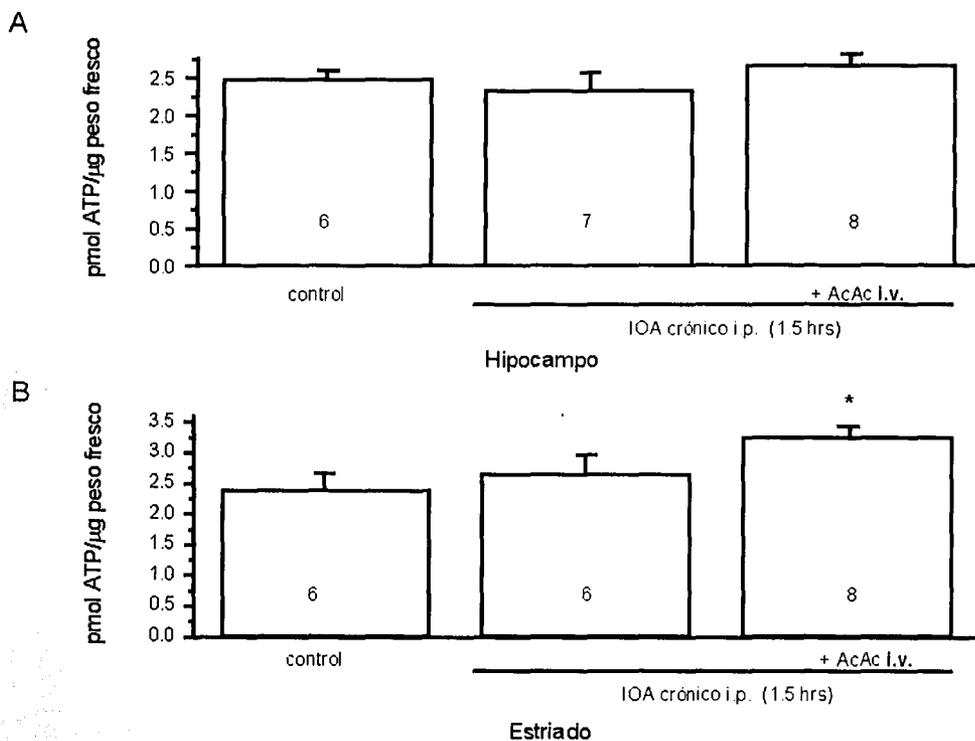


Figura 12. Efecto de la infusión i.v. de AcAc (100 $\mu$ mol) sobre los niveles de ATP en las ratas tratadas crónicamente con IOA (15mg/Kg). A) En el hipocampo se observa una tendencia a que el tratamiento del AcAc aumente los niveles de ATP. B) En el estriado esta tendencia si es estadísticamente significativa ( $p=0.0257$ ) con respecto al control. Las líneas representan los errores estandar.

Dado que las ratas se sacrificaron a la hora y media después de haber recibido el IOA, cuando los niveles de ATP se están empezando a recuperar en ambas estructuras, decidimos utilizar otro protocolo, que consistió en inyectar una dosis única de AcAc i.p. (250 mg/Kg), inmediatamente después de la tercera inyección del IOA, y sacrificar a los animales media hora después (Figura 13). Esto nos permitió ver con más claridad la disminución en los niveles de ATP a los 30 min. provocada por el IOA en ambas estructuras, y así mismo se observó la recuperación en los niveles de ATP en las ratas que recibieron la administración del AcAc, siendo estadísticamente significativa en el caso del estriado respecto al nivel de los animales tratados con IOA.

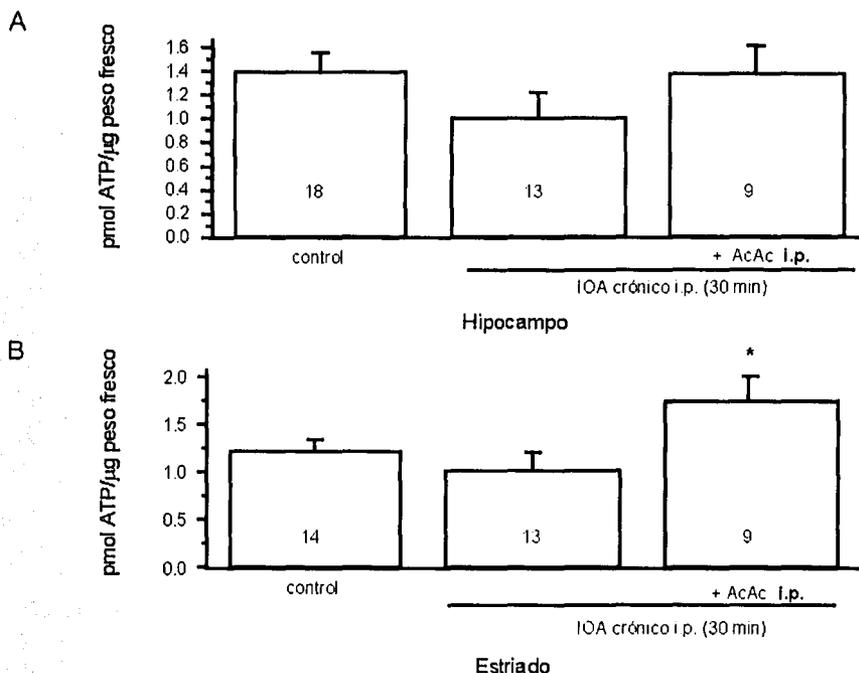


Figura 13. Efecto del AcAc (250mg/Kg) i.p. administrado inmediatamente después de la tercera dosis de IOA (15mg/Kg) sobre los niveles de ATP, medidos 30 min después. A) En el hipocampo se observa que el AcAc recupera el ATP casi a niveles del control, aunque este efecto no es estadísticamente significativo. B) En el estriado la recuperación de los niveles de ATP con el AcAc si es estadísticamente significativa ( $p=0.0106$ ) respecto a las ratas administradas con IOA. Las líneas representan los errores estandar.

## Administraciones Agudas

Tomando en cuenta los trabajos reportados en donde la administración intracerebral de IOA resulta tóxica (Mathews y col 1996, Massieu y col 2000), se decidió evaluar los niveles de ATP en estas condiciones, con el fin de tener un control positivo de la determinación de los niveles de ATP.

En este experimento se inyectaron las ratas Intrahipocampalmente con 50 nmol de IOA, y se cuantificaron los niveles de ATP una y tres horas después. Las ratas control recibieron una dosis de solución salina (0.9%) por la misma vía y se sacrificaron una hora después. En la Figura 14 A se muestran las cortes histológicos de las ratas tratadas y de las controles sacrificadas 24 horas después, utilizando una amplificación 1X y 4X. Los cortes de las ratas tratadas con el IOA i.h. presentan una lesión muy grande, en donde se observa que la mayoría de las células de la región CA1 y sus alrededores están muertas, mientras que en el animal control se observa solamente una pequeña lesión debida al tracto mecánico de la aguja. Ambos lados contralaterales se ven sanos. En la Figura 14 B se muestran los resultados de los niveles de ATP después de la administración aguda de IOA. Se observa que éstos se reducen en aproximadamente un 50% siendo esta reducción estadísticamente significativa únicamente una hora después de la administración de IOA. En las ratas inyectadas con vehículo los niveles de ATP no son diferentes a los de los animales control.

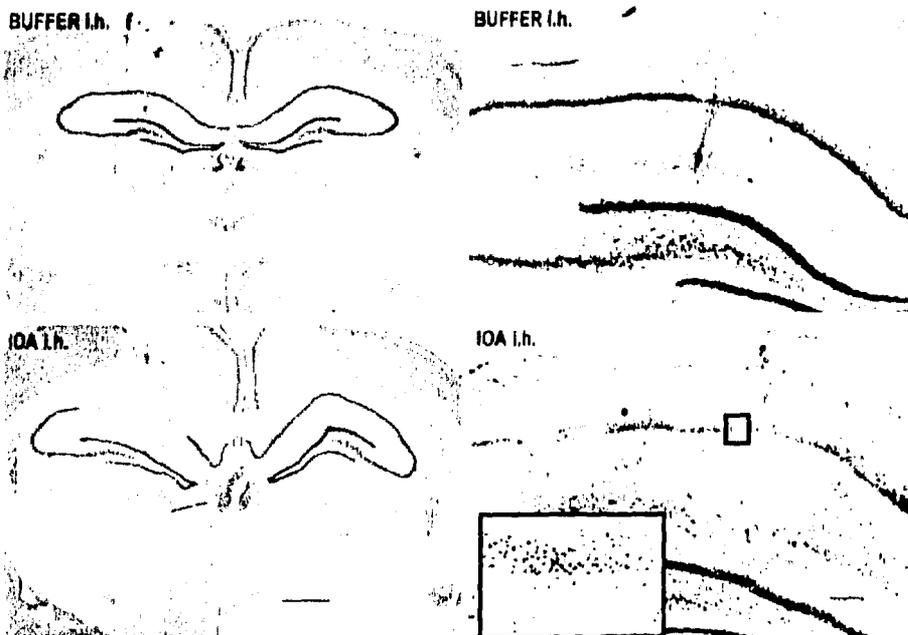
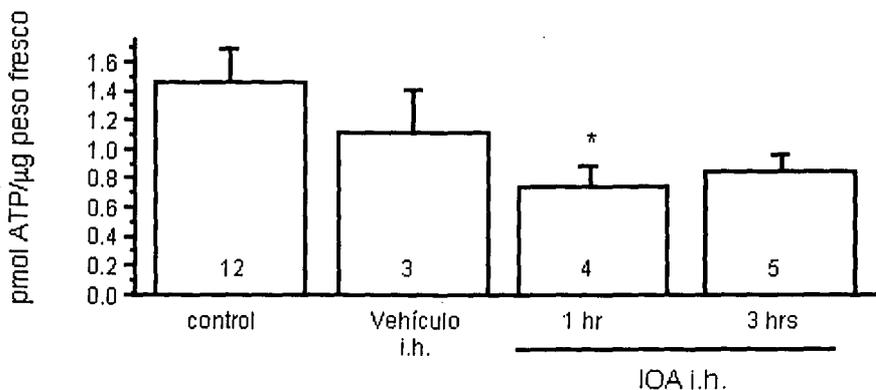
**A****B**

Figura 14. Efecto de la administración aguda intrahipocámpica (i.h.) de IOA sobre los niveles de ATP. A) Cortes histológicos representativos de ratas inyectadas i.h. con vehículo (n=4) y IOA (50 nmol/μl) (n=4). En el lado izquierdo se muestran ampliaciones 1X mientras que en el derecho la ampliación es 4X (la barra representa 1 mm y 200 μm respectivamente). En el recuadro se muestra un acercamiento 60X (Barra= 10μm). B) Niveles de ATP en el hipocampo después de la inyección i.h. de vehículo (1 h) y de IOA. (1 y 3 h) (p=.0405). Las líneas representan los errores estandar.

## VI DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran los obtenidos en trabajos previos del laboratorio, en donde se observó que la inhibición de la recaptura del glutamato por el PDC, aunque provoca la acumulación de altas concentraciones de este aminoácido, no produce muerte neuronal (Massieu y col 1995). Sin embargo, cuando se induce una deficiencia en el metabolismo energético, como es en este caso, el tratamiento sistémico con el inhibidor de la glicólisis, se aumenta la vulnerabilidad neuronal a la muerte inducida por el PDC. Sabemos que en este tipo de muerte está involucrado un proceso excitotóxico ya que trabajos previos (Massieu y col 2000) demostraron que la administración de un antagonista de los R NMDA, conocido como MK-801, es capaz de revertir por completo el daño que se observa en las ratas tratadas con IOA y PDC. También se observó que la administración crónica i.p. de IOA, no produce por sí sola ningún efecto tóxico, ya que las ratas control que recibieron vehículo en lugar PDC presentan únicamente la lesión producida por el tracto de aguja. Esto sugiere que la inhibición metabólica en nuestro modelo no es suficiente para causar daño por sí misma, e indica que la concentración fisiológica extracelular de glutamato no llega a ser tóxica cuando se inhibe discretamente el metabolismo energético. Esto probablemente se debe a que en estas condiciones, los gradientes iónicos no se modifican, conservándose el bloqueo de los R NMDA por  $Mg^{2+}$ , y un eficiente sistema de recaptura de glutamato, que son determinantes para que el glutamato ejerza su función normal de neurotransmisor y no resulte tóxico. Sin embargo cuando se induce la elevación de la concentración extracelular de AAE, la deficiencia energética sería suficiente para impedir que las células contrarresten los efectos tóxicos del glutamato.

Los resultados indican que la inhibición metabólica, en nuestro modelo, es parcial y transitoria, ya que los niveles de ATP cerebrales disminuyen sólo parcialmente y se

recuperan por completo en un período no mayor de 8 horas, por lo menos en las dos regiones analizadas, el hipocampo y el estriado. En estas dos regiones la disminución en los niveles de ATP presenta una cinética diferente. Esta disminución es más rápida y sostenida en el hipocampo, y se recuperan completamente hasta las 8 h, mientras que para el estriado el nivel mínimo de ATP se observa una hora después de la inyección de IOA y se recupera rápidamente, observándose niveles como los del grupo control desde las 4 h. Esto podría explicar de cierta manera que el hipocampo sea la región más susceptible al daño en condiciones de isquemia y de hipoglicemia, puesto que sus niveles energéticos se alteran de manera más pronunciada y duradera ante la inhibición glicolítica.

Un experimento pendiente, y crucial en nuestro modelo de hipoglicemia crónica es evaluar que tan inhibida se encuentra la GADPH y el curso temporal de esta inhibición, ya que se ha reportado que el grado de inhibición de esta enzima correlaciona directamente con el volumen de lesión, al menos cuando el IOA es administrado en el estriado (Mathews y col 1997). Mientras más inhibida está la GADPH, más grande es la lesión. Por los resultados obtenidos podemos suponer que la inhibición de la enzima en nuestro modelo es sólo parcial, ya que la administración i.p. de IOA no produce daño por sí misma. Es posible que la inhibición causada a la dosis de IOA (15 mg/Kg) utilizada, aunque es irreversible, no sea saturante por lo que sólo algunas moléculas de GADPH estén inhibidas. La recuperación completa de los niveles de ATP a las 8 h podría deberse a la síntesis de novo de la GADPH.

Aunque los niveles de ATP disminuyen sólo parcialmente y de una manera no significativa, esto podría ser suficiente para hacer a las neuronas más vulnerables al daño excitotóxico, y abre la posibilidad de que esta reducción de ATP sea prevenida

administrando sustratos energéticos como el piruvato (Massieu y col 2000) y el AcAc (presente trabajo). Estos resultados se suman a los obtenidos recientemente por otros grupos, que sugieren a los CC como protectores potenciales de las neuronas ante diversas condiciones que causan neurodegeneración (Para revisión ver Yudkoff y col. 2001; Veech y col 2001). Por un lado se ha demostrado *in vitro* que el BHB disminuye el daño producido por el péptido  $\beta$ -amiloide, que se acumula en la enfermedad de Alzheimer, y el producido por el compuesto MPP<sup>+</sup>, que reproduce la enfermedad de Parkinson al administrarse a algunos animales *in vivo* (Kashiwaya y col 2000). Existe un reporte reciente *in vivo* que muestra que la infusión continua de diferentes concentraciones de BHB (10-100 mg/Kg/hr) aumenta la sobrevivencia de ratas y ratones en modelos de anoxia, hipoxia e isquemia. En este último trabajo se observó que el tratamiento con este compuesto disminuye el edema, es decir, el contenido cerebral de agua y de sodio asociado a la isquemia, además de aumentar los niveles de ATP cerebrales (Suzuki y col 2001).

El AcAc se sabe que es utilizado por el cerebro adulto como sustrato energético en ciertas condiciones, como durante periodos prolongados de ayuno (Owen y col 1967). Se sabe que la utilización de los CC está limitada por la concentración sanguínea de estos compuestos, que normalmente es muy baja y también por su transporte a través de la BHE, el cual se lleva a cabo por los transportadores de los ácidos monocarboxílicos.

Cuando las concentraciones sanguíneas de los CC aumentan, ya sea como consecuencia adaptativa a ciertos eventos como el ayuno prolongado, o bien por la infusión exógena de estos compuestos, los CC son transportados al cerebro, siendo éste capaz de utilizarlos como fuente de energía, al incorporarse al ciclo de Krebs como acetil-CoA. De manera interesante esto ocurre independientemente del estado nutricional del animal (Hawkins 1971b; Kamula 1976). En estudios previos se han administrado CC utilizando concentraciones de AcAc mucho más elevadas (5 veces más) que las utilizadas

en el presente estudio, y la administración se lleva a cabo a través de la vena femoral, mientras que nosotros lo administramos a través de la vena lateral de la cola. Aún así, se observó el efecto protector, lo que sugiere que con las vías de administración y las concentraciones usadas, el aumento del AcAc en la sangre, fue suficiente para producir su transporte al cerebro en donde posiblemente es utilizado como sustrato energético, puesto que las enzimas necesarias para su incorporación al ciclo de Krebs están presentes (Williamson y col 1971).

La vía de administración del AcAc y su concentración sanguínea son muy importantes ya que de esto depende su transporte y su utilización cerebral. De cierta manera la vía i.v. es la más recomendable, pues el compuesto llega directamente a la sangre. La administración por otras vías tiene la ventaja de que se pueden utilizar volúmenes más grandes, lo que significa que se pueden preparar soluciones de AcAc más concentradas, ya que su solubilidad también es limitante. Las vías i.p. están sujetas a problemas de absorción, lo que además incrementa el error experimental pues cada individuo absorbe diferente cantidad de AcAc. Es determinante medir las concentraciones sanguíneas del AcAc en los diferentes protocolos, para así conocer realmente que concentración sanguínea se alcanza con las diferentes vías de administración, y si esto tiene relación directa con la protección obtenida en cada grupo, en vista de la transformación espontánea, no enzimática del AcAc a acetona.

Otra limitante de la utilización de los CC es su transporte a través de la BHE el cual se lleva a cabo por el acarreador de monocarboxilatos que también es utilizado por el piruvato, el lactato, el BHB, el AcAc y otros ácidos monocarboxílicos (Padridge 1991). La concentración sanguínea de estas otras sustancias afecta la cinética de entrada del AcAc al cerebro. En nuestro modelo, podemos suponer que la concentración de piruvato es baja, pues se tiene inhibida la glicólisis de manera sistémica lo que conlleva a una reducción de su producto final, que es el piruvato, y como el lactato se sintetiza a partir del

piruvato su concentración en la sangre también sería baja. Se ha demostrado que la simple reducción de los niveles de piruvato y de lactato en la sangre aumenta hasta un 15% el transporte del AcAc al cerebro (Hawkins y Biebuyck 1979). Esto sugiere que en nuestro modelo, el aumento en la concentración sanguínea del AcAc, daría lugar a que éste fuera preferencialmente transportado al cerebro y utilizado por éste como sustrato energético, ya que hay poca competencia por el transportador.

Además, el transporte de los CC aumenta por la presencia prolongada de concentraciones elevadas de los CC en la sangre (Gjedde y Crone 1975), por lo que los tratamientos crónicos son una mejor opción, reflejándose esto en una mayor protección conseguida con este tipo de tratamientos en nuestro trabajo, aunque la protección con todos los protocolos fue estadísticamente significativa. Tomando en cuenta esto y lo discutido anteriormente, lo más recomendable sería un protocolo crónico o prolongado de administración i.v. de AcAc. Por ejemplo a través de un catéter en pacientes después de un accidente vascular cerebral. Sin embargo, la vía oral podría ser muy conveniente, aunque se tendría que desarrollar una tableta concentrada como lo proponen Veech y col. (2001).

Una de las ventajas de la utilización del AcAc es que se trata de una sustancia endógena la cual se sabe no tiene ningún tipo de efecto tóxico mientras no se produzca cetosis aguda, y que las enzimas para su utilización están siempre presentes en el cerebro. El efecto protector del AcAc posiblemente esté relacionado con la recuperación de los niveles de ATP, como se discute más adelante, aunque es posible que el AcAc esté actuando a otros niveles del metabolismo energético, además de incorporarse al ciclo de Krebs. Se ha descrito que el AcAc aumenta la concentración de NADH y el de la Coenzima Q (CoQ) oxidada, incrementando la eficiencia metabólica (Veech y col 2001) Al aumentarse la eficiencia, el ATP producido posiblemente se utilice en el restablecimiento de los gradientes iónicos y la homeostasis de  $Ca^{2+}$ , lo que evitaría los efectos tóxicos del

glutamato (Figura 15). Por otro lado, el NADH además de ser capaz de incorporarse a la cadena de electrones para producir ATP, es necesario para la reducción del glutatión. Este es un agente reductor del peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), lo que contribuye a reducir el estrés oxidativo, tanto en la mitocondria como en el citoplasma. Aunado a esto, la forma reducida de la CoQ es una de las mayores fuentes de  $\cdot O_2$  en la mitocondria, por lo que si el AcAc promueve su oxidación estaría disminuyendo la producción de ROS (Veech y col 2001).

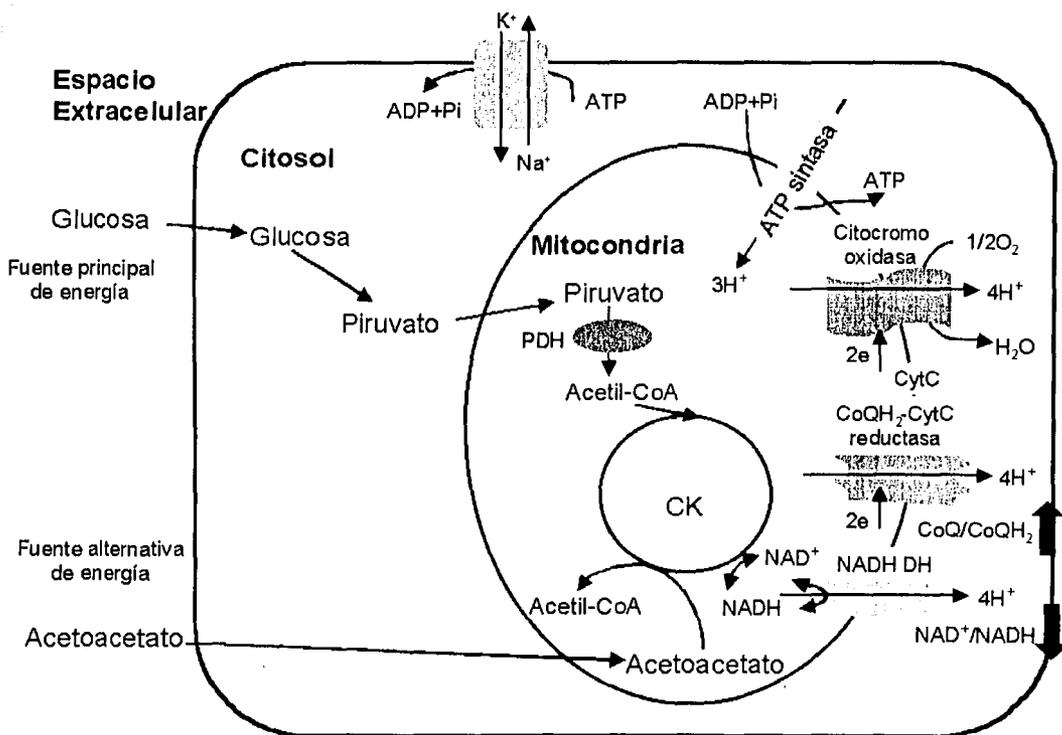


Figura 15. Cuando se añaden los CC se pueden incorporar por una serie de reacciones al ciclo de Krebs (CK). Los CC son capaces de reducir el cociente de NAD/NADH, es decir, aumentan la concentración de NADH. Aumentan también la CoQ oxidada, lo que contribuye a aumentar la eficiencia metabólica y a reducir el posible estrés oxidativo. Modificado de Veech y col 2001.

Otros trabajos en donde se ha estudiado el efecto de los CC sobre la concentración de algunos aminoácidos (GABA, aspartato y glutamato) muestran que los CC al metabolizarse producen cantidades excesivas de citrato (Yudkoff y col 1997; Daikhinn y Yudkoff 1998) y de esta manera puede influir directamente en la producción de estos aminoácidos. Se ha encontrado que la concentración de GABA está elevada, la de aspartato disminuida, mientras que la del glutamato permanece sin cambios. En estos trabajos se propone que el aumento en la concentración de citrato se debe a la condensación de la acetil-CoA, derivada del metabolismo de los CC, y el oxaloacetato. Como hay más acetil-CoA en presencia de los CC, el oxaloacetato se utilizará para producir citrato. El oxaloacetato a su vez es necesario para la reacción de transaminación que genera aspartato a partir de glutamato, lo que conlleva posiblemente a que más glutamato esté disponible para convertirse en GABA y disminuya así la concentración de aspartato. Esto también podría explicar hasta cierto punto la protección conseguida con la administración de AcAc, ya que está bien documentado que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio, que estaría contrarrestando la sobreexcitación causada por el glutamato. Por otra parte, la reducción en la concentración de aspartato podría también favorecer una disminución de la excitación y contribuir al efecto protector de los CC.

Se ha reportado que el BHB es capaz de aumentar los niveles energéticos cerebrales en modelos de isquemia, donde los niveles de ATP disminuyen en un 73% con respecto al control. Los niveles se recuperan significativamente, con la infusión continua (3 horas) de BHB i.v. aunque no alcanzan los niveles de los animales control (Suzuki y col 2001). Los valores basales de ATP reportados en ese trabajo coinciden con los obtenidos en nuestros experimentos.

En nuestro modelo la disminución energética no es tan intensa (alrededor del 20%), y ésta se recupera por completo en el hipocampo y en el estriado después de un periodo no mayor de 8 h teniendo cada estructura una cinética particular, como ya se

discutió. También se observa que la administración del AcAc en ambas estructuras tiende a recuperar e incluso a aumentar los niveles energéticos por encima de los valores del control, tanto en el tratamiento i.v. como en el i.p.. En el estriado esta recuperación es estadísticamente significativa al administrarse el AcAc tanto en forma i.p. como i.v.. Se ha reportado que la utilización cerebral de los CC tiene un comportamiento regionalizado (Hawkins y Biebuyck 1979; Hawkins y Mans 1991). Estos se acumulan más en las áreas que no están limitadas por la BHE como la hipófisis, mientras que de las áreas que sí están protegidas por la BHE, la corteza es la región en donde más ávidamente se capturan. En estos trabajos se muestra que no hay diferencias significativas en el transporte de los CC entre el hipocampo y el estriado. Esto sugiere que las diferencias en el restablecimiento de los niveles de ATP entre estas dos regiones en nuestro estudio se deban probablemente a problemas de disección. El hipocampo es una zona menos homogénea y más difícil de diseccionar en el cerebro congelado, por lo tanto al no diseccionarse de manera idéntica en cada una de las ratas da lugar a mucha variabilidad en los niveles de ATP cuantificados, y tal vez esto influyó en que los efectos no resultaran estadísticamente significativos.

Otra observación en cuanto a este experimento, es que nosotros medimos el ATP 30 min después de haber administrado el AcAc. Algunos autores reportan que a los 10 minutos los niveles sanguíneos de los CC son el 10% de los que hay un minuto después de su administración (Hawkins y Biebuyck 1979). Sería muy interesante hacer un curso temporal incluyendo tiempos más cortos después de la administración y ver si esto modifica nuestros resultados.

Como control positivo de las determinaciones de ATP se administró agudamente el IOA en hipocampo de las ratas, ya que se sabe que esta inyección es sumamente tóxica. Estas administraciones de IOA i.h. reducen significativamente los niveles de ATP en un

50%, medido una hora después. Las tinciones histológicas realizadas 24 h después de dicha administración, muestran una degeneración severa en la región CA1 del hipocampo. Sería recomendable hacer cortes histológicos a tiempos más cortos, para conocer el estado de las células y su correlación con los niveles energéticos. Pero más allá de esto, es importante mencionar que se disectó una región del hipocampo mayor a la zona lesionada por lo que la medición de los niveles de ATP incluyó también parte del hipocampo que no se lesionó posteriormente, y por lo tanto el efecto del IOA pudo quedar enmascarado. Posiblemente la disminución de ATP que provoca la administración aguda del IOA es mucho más abrupta en el sitio de administración (capa CA1 y estratos aledaños). Sin embargo, hacer una disección más fina del hipocampo da lugar a problemas de descongelación, lo que conlleva a la degradación del ATP. Además la disección incluye no sólo a las neuronas sino a la glía y nuestros resultados son un promedio de las concentraciones de ATP en estos tipos celulares, por lo que podemos suponer que la disminución en los niveles de ATP en las neuronas sería más pronunciada, ya que las neuronas se sabe dependen más de la glicólisis que la glía. El hecho es que la administración aguda sí disminuye los niveles de ATP significativamente. Sería muy interesante conocer el curso temporal de los niveles de ATP con este tipo de administraciones.

El origen del daño causado por la administración aguda del IOA es controvertido; hay un trabajo donde se demuestra que el daño se puede revertir en el estriado, quitando las aferentes glutamatérgicas (Matthews y col 1997), lo que sugiere un papel importante de este aminoácido. Por otra parte, el daño producido por la infusión continua de IOA a través de una cánula de microdialisis no es revertido por la administración de MK-801 (Massieu y col 2000). Es necesario llevar a cabo más experimentos con este tipo de administración para precisar los eventos involucrados en la muerte, aunque es fácil suponer que hay una inhibición metabólica profunda que acarrea una reducción en los

niveles energéticos, lo que desencadena otra serie de eventos que llevarían a la muerte, donde podrían estar involucrado el glutamato, entre otros factores.

## VII CONCLUSIONES

La inhibición glicolítica sumada a la inhibición de la recaptura de glutamato mimetiza algunos de los eventos que ocurren durante la isquemia cerebral y la hipoglicemia, y por ello resulta un buen modelo para estudiar los mecanismos de muerte involucrados en estas patologías y buscar sustratos alternativos a la glucosa que promuevan la neuroprotección.

El AcAc podría usarse como protector potencial contra la muerte excitotóxica, asociada con la isquemia cerebral y la hipoglicemia. Los mecanismos responsables de su efecto protector aún no están muy claros aunque éste podría estar relacionado con su función como sustrato energético.

## REFERENCIAS

- Anakrona M., Dypbukt J., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S., y Nicotera P. 1995 Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.
- Auestad N. 1991 Fatty Acid Oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary cultures *J. Neurochem.* 56, 1376-1386.
- Baker A., Zornow M., Scheller M., Yaksh T., Skilling S., Smullin D., Larson A., y Kuczenski R. 1991 Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J. Neurochem.* 57 (4), 1370-1379.
- Benchoua A., Guégan C., Couriaud C., Hseeini H., Sampaio N., Morin D., y Onténiente B. 2001 Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J. Neurosci.* 21 (18), 7127-7134.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., y Diemer N. 1984 Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43, 1369-1374.
- Berry M., y Boulton A. 2000 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 60, 150-154.
- Bixel M., y Hamprecht B. 1995 Generation of ketones bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J. Neurochem.* 65, 2450-2461.
- Bond A., Ragumoorthy B., Moon J., Hicks C., Ward M., Lodge D., y O'Neill M. 1999 LY379268, a potent and selective Group II metabotropic glutamate receptor agonist, is neuroprotective in gerbil global, but not focal, cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 273 (3), 191-194.
- Bowling A., y Beal F. 1995 Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 56 (14), 1151-1171.
- Brandster M. 1990 An overview of stroke rehabilitation. *Stroke (suppl.)* 21. II-40-II-42.
- Bredt D., y Snyder S. 1990 Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87, 682-685.
- Burke J., Enghild J., Martin M., Jou Y., Myers R., Roses A., Vance J., y Strittmatter W. 1996 Huntingtin and DRLPA proteins selectively interact with the enzyme GADPH. *Nat. Med.* 2, 347-350.
- Butterworth R. 1999 Metabolic encephalopathies. En "Basic Neurochemistry" editado por

- Siegel G., Agranoff B., Albers W., Fisher S., y Uhler M. Capítulo 38 págs. 769-781. Lippincott-Raven, New York.
- Choi D., Maulucci-Gedde M., y Kriegstein A. 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7 (2), 357-368.
- Choi D. 1988 Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Choi D. 1992 Excitotoxic cell death. *J. Neurol.* 23 (9), 1261-1276.
- Choi D. y Koh J. 1998 Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 347-375.
- Clarke D., y Sokoloff L. 1999 Circulation and metabolism of the brain. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel G., Agranoff B., Albers W., Fisher S., y Uhler M. Capítulo 31 págs. 637-669. Lippincott-Raven, New York.
- Daikhin Y., y Yudkoff M. 1998 Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Develop. Neurosci.* 20, 358-364.
- Daniel P., Love E., Moorhouse S., Pratt O., y Wilson P. 1973 Metabolism of ketone bodies by the brain. *Annu. Rev. Med.* 24, 271-280.
- Daniel P., Love E., Moorhouse S., y Pratt O. 1977 The transport of ketone bodies into the brain of the rat (in vivo). *J. Neurol. Sci.* 34 (1), 1-13.
- Dirnagl U., Iadecola C., y Moskowitz M. 1999 Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosci.* 22, 391-397.
- Dumuis A., Pin J., Oomagari K., Sebben M., y Bockaert J. 1990 Arachidonic acid released from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisquilate receptors. *Nature* 347, 182-184.
- Foster A., Gill R., y Woodruff G. 1988 Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: Selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 8, 847-855.
- Gasch A. 1990 Use of traditional ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy. *J. Am. Diet. Assoc.* 90, 1433-1434.
- Gegelashvili G., y Schousboe A. 1998 Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 45 (3), 233-238.
- Gemba T., Oshima T., y Ninomiya M. 1994. Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 3 (3), 789-795.
- Gjedde A., y Crone C. 1975 Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. *Am. J. Physiol.* 229 (5), 1165-1169.

Greene J., y Greenamyre T. 1996 Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* 48, 613-634.

Guzmán M., y Blázquez C. 2001 Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol. Metab.* 12 (4), 169-173.

Harris J., y Waters M. 1976 Glycereraldehyde-3.phosphate dehydrogenase. En: "The Enzymes" editado por Boyer. Vol XIII parte C págs. 1-49 Academic Press, New York.

Hasselbalch S. Knudsen G., Jakobsen J., Pinborg L., Holm S., y Paulson O. 1995 Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans. *Am. J. Physiol.* 268 (6), E1161-E1166.

Hawkins R. 1971a Uptake of ketone bodies by rat brain *in vivo*. *Biochem. J.* 121 (1), 17P.

Hawkins R., Williamson D., y Krebs H. 1971b Ketone body utilization by adult and suckling rat brain *in vivo*. *Biochem. J.* 122, 13-18.

Hawkins R., y Biebuyck J. 1979 Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 205, 325-327.

Hawkins R., y Mans A. 1991 Regional blood-brain barrier transport of ketone bodies in portacaval shunted rats. *Am. J. Physiol.* 261 (5), E647-E652.

Hengartner M. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

INEGI 2001 <http://www.inegi.gob.mx/>

Izumi Y., Benz A., Zorumski C., y Olney J. 1994 Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 5, 617-620.

Izumi Y., Benz A., Katsuki H., y Zorumski C. 1997 Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J. Neurosci.* 17, 9448-9457.

Kammula R. 1976 Metabolism of ketone bodies by ovine brain *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 251 (5), 1490-1494.

Kashiwaya Y., Takeshima T., Mori N., Nakashima K., Clarke K., y Veech R. 2000  $\beta$ -hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97 (10), 5440-5444.

Koh J., Suh S., Gwag B., He Y., Hsu C., y Choi D. 1996 The role of zinc in selective neuronal death after transient global ischemia. *Science* 272, 1013-1016.

Lemasters J., Nieminen A., Qian T., Tros L., Elmore S., Nishimura Y., Crowe R., Cascio W., Bradham C., Brenner D., y Herman B. 1998 The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 177-196.

Lipton P. 1999 Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79 (4), 1431-1563.

Longuemare M., Rose C., Farrek K., Ransom B., Waxman S., y Swanson R. 1999 K<sup>+</sup>-induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na<sup>+</sup>. *Neuroscience* 93 (1), 285-292.

Lucas D., y Newhouse J. 1957 The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58, 193-201.

Martin L., Al-Abdulla N., Brambrink J., Kirsch J., Sieber F., y Potera-Cailliau C. 1998 Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 46 (4), 281-309.

Massieu L., Morales-Villagrán A., y Tapia R. 1995 Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: An *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* 64 (5), 2262-2272.

Massieu L., Gómez-Roman N., y Montiel T. 2000 *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165, 257-267.

Matthews R., Ferrante R., Jenkins B., Browne S., Goetz K., Berger S., Chen I., y Beal F. 1997 Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J. Neurochem.* 69 (1), 285-289.

Mazzola J., y Sirover M. 2001 Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts. *J. Neurochem.* 76, 442-449.

McBurney R. 1994 Therapeutic potential of NMDA antagonists in neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 15 (2), 271-273.

McConkey D. 1998. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* 99, 157-168.

Michaelis E. 1998 Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54, 369-415.

Nakanishi S. 1992 Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.

Nicholls D., y Budd S. 1998 Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 97-112.

Nordii D., Kuroda M., Carroll J., Koenigsberger D., Hirsch L., Bruner H., Seidel W., y De Vivo D. 2001 Experience with ketogenic diet in infants. *Pediatrics* 108, 129-133.

Olney J. 1969 Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.

Olney J. 1994 Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* 15 (2), 259-260.

Orlando L., Alsdorf S., Penney J., y Young A. 2001 The role of group I and group II metabotropic glutamate receptors in modulation of striatal NMDA and quinolinic acid toxicity. *Exp. Neurol.* 167 (1), 196-204.

Owen O., Morgan A., Kemp H., Sullivan J., Herrera M., y Cahill G. 1967 Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46 (10), 1589-1595.

Pan J., Telang F., Lee J., Graaf A., Rothman D., Stein D., y Hetherington H. 2001 Measurement of  $\beta$ -hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. *J. Neurochem.* 79, 539-544.

Pardridge W. 1983 Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* 63 (4), 1481-1535.

Pardridge W. 1991 Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids and ketone bodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 291, 43-53.

Patel M., y Owen O. 1976 Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. *Biochem. J.* 156 (3), 603-607.

Patel M., y Owen O. 1977 Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. *J. Neurochem.* 28, 109-114.

Paxinos G., y Watson C. 1986 The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney.

Reynolds I. 1998 Intracellular calcium and magnesium: Critical determinants of excitotoxicity? En: "Progresss in brain research" editado por Ottersen O., Langmoen L., y Gjerstad I. Vol 116 págs. 225-243 Elsevier Science.

Robinson A., y Williamson D. 1980 Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 60 (1), 143-187.

Rossi D., Oshima T., y Attwell D. 2000 Glutamate release in severe brain injury is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316-21.

Ruderman N., Ross P., Berger M., Goodman M. 1974 Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats. *Biochem. J.* 138, 1-10.

Ruiz F., Alvarez G., Pereira R., Hernández M., Villalba M., Cruz F., Cerdán S., Bogónez E., y Satrustegui J. 1998 Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* 9, 1277-1282.

Sánchez-Carbente M., y Massieu L. 1999 Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* 27 (1), 129-138.

- Sandberg M., Nyström B., y Hamberger A. 1985 Metabolically derived aspartate-elevated extracellular levels *in vivo* in iodacetate poisoning. *J. Neurosci. Res.* 13, 489-495.
- Sandberg M., Butcher S., y Hagberg M. 1986 Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *In vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 47, 178-184.
- Schinder A., Olson E., Spitzer N., y Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16 (19), 6125-6133.
- Schulze H., Schuler A., Stürber D., Döbeli H., Langen H., y Huber G. 1993. Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 60, 1915-1922.
- Simon R., Swan J., Griffiths T., y Meldrum B. 1984 Blockade of N-Methyl-D-Aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226, 850-852.
- Sirover M. 1999 New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta* 1432, 159-184.
- Suzuki M., Suzuki M., Sato K., Dohi S., Sato T., Matsuura A., y Hiraide A. 2001 Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *J. Pharmacol.* 87, 143-150.
- Veech R., Chance B., Kashiwaya Y., Lardy H., y Cahill G. 2001 Ketone Bodies, potential therapeutic uses. *Life* 51 (4), 241-247.
- Wieloch T. 1985 Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-metil-D-aspartate antagonist. *Science* 230, 681-683.
- Williamson D., Bates M., Page A., y Krebs H. 1971 Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissue. *Biochem. J.* 121, 41-47.
- Wolf P., Cobb J., y Dángostino R. 1992 Epidemiology of stroke. En: "Stroke Pathophysiology, Diagnosis and Management" editado por Barnett H., Mohr J., Stein B., y Yatsu F. pág 3027 Churchill Livingstone, New York.
- Yang J., Liu X., Bhalla D., y Kim Y. 1997 Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome C from mitochondria is blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Grunstein R., y Nissim I. 1997 Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem.* 69, 682-692.
- Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I., Lazarow A., y Nissim I. 2001 Ketogenic diet, amino acid metabolism and seizure control. *J. Neurosci. Res.* 66, 931-940.
- Zeevalk G., y Nicklas W. 1991 Mechanism underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257, 870-878.
- Zeevalk G., y Nicklas W. 1992 Evidence that the loss of the voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block

at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* 59 (4), 1211-1220.

Zeng Y., y Xu Z. 2000 Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurosci. Res.* 37 (2), 113-125.

Zoratti M., y Szabo I. 1995 The mitochondrial permeability transition *Biochem. Biophys. Acta* 1241, 139-176.