



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Activación de proteasas y su papel en la
muerte neuronal inducida por ausencia de
glucosa

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA
PALOMA CARRANZA PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MA. LOURDES MASSIEU TRIGO

26 AGOSTO 2010

Facultad de Medicina



BIOMÉDICAS



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.

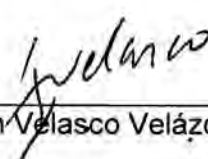


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO


LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

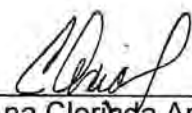
Por este conducto le informamos que la tesis titulada “**Activación de proteasas y su papel en la muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa**”, que presenta la alumna **Paloma Carranza Pérez** con número de cuenta **405086247** cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.




Dr. Iván Velasco Velázquez




Dra. Lourdes Massieu Trigo



Dra. Ana Clorinda Arias Álvarez



Dr. Daniel Alejandro Fernández
Velasco



Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la beca de licenciatura otorgada por PAPIIT del proyecto IN213507.

Gracias a CONACYT por el apoyo otorgado para alumnos de licenciatura. Apoyo 102599, fondo10013.

Gracias a los sinodales que revisaron esta tesis, por sus valiosos comentarios y correcciones: Dr. Iván Velasco, Dra. Clorinda Arias, Dra. Lourdes Massieu, Dr. Alejandro Fernández y Dra. Mahara Valverde.

Gracias a Dios por todas las pruebas y las bendiciones que han sido muchas.

Gracias a mis papás Betty y Octavio por amarme tanto y luchar siempre por nuestra familia para que esté unida, yo también los amo mucho. Gracias papi por nunca darte por vencido en los momentos más difíciles que hemos pasado.

Gracias mami porque eres el mejor ejemplo de mujer que pueda tener, por todo el esfuerzo que has realizado y que realizas por nosotros tus hijos, por todo el amor, por todo el cariño, por ser el pilar de mi vida y el principal motivo para salir adelante.

A mis hermanos, Aza, Pere y Tavo porque siempre están presionándome para que sea mejor estudiante y mejor persona, porque ustedes y mis papás son lo más importante que tengo. Los amo mucho a los tres, son geniales.

Gracias a mis abuelos, tíos, tías, en especial a mi tía Nancy por el apoyo que me brindó durante la carrera, a mis primos y primas que siempre han estado ahí y me han hecho reír tanto.

Gracias a ti mi burrito Alfredo por ser tan importante en mi vida, por todo el apoyo que me has brindado estos años que llevamos juntos, gracias por enseñarme a actuar de forma inteligente y racional. Gracias por todos los momentos que hemos compartido, aquellos en los que he estado alegre pero también en los que he estado triste y has hecho lo que sea para que recupere el ánimo. Gracias por los consejos, por las charlas emotivas, por los regaños, por todo el amor y por todas las experiencias vividas que jamás se olvidarán. Te amo mucho. Gracias también por compartirme a tu familia, gracias a Alfredo, Rubia, Tania y Aurora (QEPD), por abrirme las puertas de su casa, por todo el cariño que me han dado, por todo su apoyo, por ser como mi familia.

A todos aquellos que ya no están físicamente conmigo pero que lo estuvieron en su momento y han sido personajes importantes en mi vida. Gracias a mi abuelita Juanita a quien quise mucho, fue y seguirá siendo mi ángel guardián; a mi tío Vicente por quererme tanto y apoyarme siempre; a mi abuelo Arturo gracias porque siempre me hizo sonreír, me dio su cariño y su amor; gracias a Yolita por todos sus cuidados, la quiero mucho como a una mamá; gracias a Carlanguas por los juegos y juguetes, por el cariño, por compartirme a sus papis (mis tíos que quiero mucho), por los enojos y demás vivencias de niños, has sido como un hermano para mí y te extraño mucho primo; gracias a Cecilia Ceniceros por su amistad, sus sonrisas, su compañía, por todo el cariño, por haberte conocido.

A Indy por ser mi tercer hermana, por su comprensión, cariño y amistad que me ha brindado desde hace cinco años, por todas las experiencias vividas, sueños compartidos y tantas risas arrancadas.

Gracias a Sandra Barragán por que siempre ha estado conmigo, apoyándome y procurándome, gracias por habernos conocido, por abrirme las puertas de tu corazón y de tu casa, por compartirme a tu familia, al Papisaurio, la Mamisauria, al Yayo mouse, a tu abue, a Eva, porque también ellos han confiado en mí y me han brindado su apoyo y cariño. Gracias nena por todo lo que me has dado.

Gracias a Iván Ampudia, porque contigo compartí momentos muy especiales en mi vida, siempre has sabido escucharme y has tenido palabras confortantes en todo momento, por apoyarme y procurarme, por todo el amor y el cariño que hemos compartido como hermanos UNISEPAS. Gracias a ti y a tu familia por todo.

Gracias a Lourdes por haberme recibido en su laboratorio, por la confianza que me ha dado, por el apoyo brindado, por haber sido mi tutora, consejera y amiga, gracias porque en este laboratorio aprendí y crecí mucho como estudiante. Gracias a Blanquis por ser una gran compañera de laboratorio pero sobre todo por ser mi amiga y por todo el tiempo que compartimos en el laboratorio (demasiadas horas! jaja). Gracias a Ana por tantos momentos de risas, a Tere y a Cecy por toda su ayuda en el laboratorio.

A Perla por haber creído en mí, por todo el apoyo y comprensión que me ha dado, por ser mi amiga, por la paciencia, por las enseñanzas, muchas gracias por todo, por ayudarme a salir adelante.

A Marco, Idalia y Rodolfo por ser mis amigos y colegas, por todo su apoyo y todos los ratos que pasamos juntos estudiando... pero también por aquellos de diversión y esparcimiento.

A Regina Montero, por haberme aceptado en el lab a pesar de que yo era una Palomita "naive" en las cosas de la ciencia, por ser parte de mi formación en la licenciatura, por ser estricta y exigente conmigo, por toda la paciencia y el apoyo, por la amistad y el cariño brindado.

A Sergio Sánchez por la confianza, la exigencia, la guía, por todo el tiempo ocupado en mi, por creer en mis cualidades y capacidades, por el apoyo y el cariño, por la paciencia y los regaños, todo eso me ha convertido en una mejor estudiante.

A Beatriz Ruiz por todas las enseñanzas, la paciencia, el tiempo que me ha dedicado, por ser mi amiga y por la confianza, por estar conmigo, por escucharme y siempre darme la mano cuando lo necesito.

A mis amigos de los otros laboratorios: Víctor, Luis, Javier y Toño, los quiero mucho gracias por haberme aceptado como reina, por tantas risas, por todo lo que he aprendido de ustedes, por quererme, cuidarme, mimarme y estar pendiente de mí, muchísimas gracias. A Lalo el malo, el brother, a Tania, Yolis, Huguito, Dianis, Vale y demás compañeros del lab SSE, muchísimas gracias porque siempre encontré en todos ustedes una sonrisa, una palmada de ánimo, un abrazo y sobre todo mucho apoyo y cariño.

Gracias a los servidores de la palabra, por haberme guiado durante dos años por el camino del bien y haberme acercado a Dios, a la madre Coco, al padre Rubén, al padre Morgan, y demás servidores de Dios en este mundo.

Gracias a la Miringola, a Erick, Héctor, Susana, Luz María y Hugo por haberme hecho parte de su familia cuando más necesitaba una, por todo el apoyo y cariño que me han dado, le estoy eternamente agradecida.

Gracias a mis amigas del Guadalupe, a Regina, Cecilia, Monse, las Mónicas, Nelly, Vero, Laura, Susana, Jeza, Yetzy, Sara... simplemente gracias por haber compartido conmigo una de las mejores etapas de mi vida.

A mi Luisja que siempre me ha ayudado, acompañado, querido y procurado, te quiero mucho amigo.

A mis amigos de la primaria, Marisilla, Marcela, Fay, Vero, Ricky, Sergio, Samuel, Aldo, Julián, gracias porque con ustedes pasé momentos y años muy felices.

Gracias a Felipe Sánchez por todo su apoyo y cariño. Te quiero mucho.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	x
Resumen.....	xii
1. Introducción.....	1
2. Metabolismo energético.....	2
2.1 Glucólisis.....	3
2.2 Ciclo de Krebs.....	5
3. Neurotransmisión glutamatérgica.....	7
3.1 Receptores a glutamato.....	10
3.2 Excitotoxicidad.....	12
4. Hipoglicemia.....	13
4.1 Características.....	13
5. Muerte celular.....	17
5.1 Apoptosis.....	17
5.2 Necrosis.....	19
5.3 Autofagia.....	21
6. Hipoglucemia, excitotoxicidad y proteasas.....	27
7. Hipótesis.....	29
8. Objetivos.....	30
9. Metodología.....	31
9.1 Cultivos neuronales.....	31
9.2 Tratamientos.....	31
9.3 Viabilidad celular.....	33
9.4 Homogenados celulares.....	33

9.5 Western blot.....	34
9.6 Actividad de caspasa-3.....	35
9.7 Actividad de catepsinas B.....	36
9.8 Análisis estadístico.....	37
10. Resultados.....	38
11. Discusión de Resultados.....	50
12. Conclusiones.....	55
13. Bibliografía.....	57

ABREVIATURAS

3-MA	6-amino-3-metilpurina
Ac-DEVD-MCA	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA
AMPA	α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid)
CA-074	L-3- <i>trans</i> -(Propilcarbamil) oxiran-2-carbonil)-L-isoleucil-L-prolina metil éster (L-3- <i>trans</i> -(Propylcarbamylo)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline methyl ester)
Diablo	Proteína de union directa a IAP con bajo pH (Direct IAP binding protein with low pH)
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio Dulbecco modificado del medio Eagle (Dulbecco's modified Eagle's medium)
EGTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EE	Error Estándar
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas (Fas-associated death domain)
Fas/CD95/APO1	Receptor miembro de la familia TNF (TNF receptor family member)
FasL	Ligando de Fas (Fas ligand)
IAP	Inhibidor de apoptosis (Inhibitor of apoptosis)
KA	Ácido Kaínico
KDa	Kilo Daltones
MDL-28170	Z-Val-Phe-CHO
MK-801	Maleato de dizocilpina ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine maleate)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol
NBQX	6-nitro 7-sulfamobenzo[f]quinoxalin-2,3-diona (6-nitro 7-sulphamobenzo[f] quinoxaline-2,3-dione)

NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato (<i>N</i> -methyl-D-aspartate)
Omi/HtrA2	Factor que require alta temperature (High temperature requirement factor)
PI3K	Fosfatidil inositol-3 cinasa (Phosphatidyl inositol-3 kinase)
QVDOPH	Q-Val-Asp-OPh
s/g	Sin glucosa
Smac	Activador mitocondrial secundario de caspasas (Second mitochondrial activator of caspases)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico

RESUMEN

La glucosa es la principal fuente de energía en el cerebro. La hipoglucemia severa inducida por la administración excesiva de insulina en pacientes diabéticos tipo 1, puede conducir al coma y producir daño neuronal permanente. Dicho daño ocurre a través de un mecanismo excitotóxico, desencadenado por la falla energética y la liberación de los aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato. La muerte excitotóxica es dependiente de calcio y se considera necrótica, sin embargo estudios han revelado que la apoptosis y la autofagia, que son tipos de muerte programada, pueden converger en este proceso. Existen pocos estudios *in vitro* en condiciones que modelan la hipoglucemia: ausencia de glucosa y tensión de oxígeno constante, y a la fecha no se conoce cuál es la contribución de los diferentes tipos de muerte en esta condición.

Las proteasas son ejecutoras de muerte celular y su activación diferencial conduce a un fenotipo de muerte determinado. La activación de proteasas dependientes de calcio como las calpaínas, se ha asociado con la necrosis, la activación de caspasas con la apoptosis y la de las catepsinas lisosomales con la autofagia. En el presente trabajo se evaluó la participación de dichas proteasas en la muerte inducida por la ausencia de glucosa. A través de ensayos de inmunoblot se analizó el corte de la espectrina, que es sustrato de la caspasa-3 y de la calpaína, produciendo fragmentos de distinto peso molecular por la acción de ambas proteasas. Por ensayos espectrofluorométricos se analizó la actividad de caspasa-3 y catepsina B en homogenados de neuronas cultivadas. Su papel en la muerte se estudió incubando a las células en un medio sin glucosa, en presencia de inhibidores

de dichas proteasas. Encontramos que la calpaína se activa rápidamente durante la ausencia de glucosa, la muerte es parcialmente reducida por su inhibidor MDL-28170 y por el quelante de calcio extracelular EGTA, mientras que es completamente prevenida por el bloqueador de los receptores a glutamato de tipo NMDA, el MK-801. Esto sugiere que la calpaína es activada por la entrada de calcio a través de los receptores NMDA. Los resultados sugieren que no hay activación de caspasa-3 y los inhibidores de caspasas no previenen la muerte. En contraste con lo anterior, la actividad de la catepsina B disminuye durante la ausencia de glucosa. Los resultados indican que en estas condiciones experimentales la muerte parece ser predominantemente necrótica, desencadenada por la activación de los receptores NMDA, la entrada de calcio a través de ellos y la consecuente activación de la calpaína por este ión.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), el primero está constituido por el encéfalo y la médula espinal, mientras que el segundo por ganglios y nervios periféricos conectados con el SNC. Las células del sistema nervioso central se disponen de tal manera que dan lugar a dos formaciones muy características: la materia gris, constituida por los cuerpos neuronales, y la materia blanca, formada principalmente por las prolongaciones nerviosas (dendritas y axones), cuya función es propagar la información. Además de neuronas, el sistema nervioso cuenta con células gliales, las cuales tienen múltiples funciones. Existen cuatro tipos de células gliales: los astrocitos, dan soporte estructural y metabólico a las neuronas; la microglia, tiene función de macrófago; los oligodendrocitos, producen la mielina que recubre los axones en el SNC permitiendo una conducción rápida del impulso nervioso; y las células de Schwann en el SNP, tienen la misma función que los oligodendrocitos (Raine, 2006).

La neurona es la unidad funcional del sistema nervioso y consta de tres partes: cuerpo o soma, el cual está compuesto fundamentalmente por el núcleo y el citoplasma que contiene a los diversos organelos celulares; las dendritas y el axón. El axón suele tener múltiples terminaciones llamadas "botones sinápticos", que se encuentran en proximidad con las dendritas o el soma de otra neurona. La separación entre el axón de una neurona y las dendritas o el soma de otra, es del orden de 0.02 micras. Esta conexión existente entre el axón de una neurona y las dendritas de otra se llama "sinapsis", éste proceso tiene la finalidad de transmitir señales que modifican la actividad de las neuronas mientras se propaga dicha señal (Raine, 2006).

La transmisión sináptica tiene las siguientes características: la conducción de los impulsos nerviosos se efectúa en un solo sentido, es decir, del axón de una neurona al cuerpo o dendritas de la otra neurona sináptica; el impulso nervioso se propaga a través de intermediarios químicos denominados neurotransmisores, como la acetilcolina y la noradrenalina. En SNC, hay neuronas excitadoras y neuronas inhibitoras; la velocidad de conducción de un impulso a lo largo de la fibra nerviosa varía de 1 a 100 metros por segundo, de acuerdo a su tamaño, siendo mayor en las más largas (Raine, 2006).

En resumen, el SNC es el encargado de recibir y procesar las sensaciones recogidas por los diferentes sentidos y de transmitir las órdenes de respuesta de forma precisa. Se puede decir que el SNC es uno de los más importantes sistemas que se encuentran en el cuerpo humano.

2. METABOLISMO ENERGÉTICO

La glucosa juega un papel muy importante en el metabolismo tanto de plantas, como de animales y muchos otros microorganismos. Por ejemplo la bacteria *Escherichia coli* puede obtener de la glucosa los esqueletos de carbono de cualquier aminoácido, nucleótido, coenzima, ácido graso o cualquier intermediario metabólico necesario para su crecimiento. En los animales y plantas vasculares, la glucosa tiene tres principales destinos: puede ser almacenada como glucógeno o almidón; oxidada a una molécula de tres carbonos como el piruvato mediante la vía de la glucólisis para proveer a la célula de ATP; o puede ser oxidada por la vía de las pentosas fosfato para dar

lugar a la ribosa 5 fosfato necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos y NADH para los procesos biosintéticos de reducción (Nelson y Cox, 2005).

2.1 GLUCÓLISIS

Durante la glucólisis una molécula de glucosa es degradada en una serie de reacciones catalizadas por enzimas específicas que dan lugar a dos moléculas de piruvato. Durante el primer paso la glucosa que entra a una célula es fosforilada por una hexocinasa con la finalidad de que la molécula no pueda salir de la célula ya que no existen transportadores para azúcares fosforilados. Además es relevante mencionar que las moléculas fosforiladas como los azúcares, el ADP y el ATP forman complejos con el ion Magnesio que es necesario para la catálisis en la mayoría de enzimas glucolíticas. El resultado de la primera reacción de la glucólisis es la formación de la glucosa 6-fosfato, la cual es sustrato de la siguiente enzima que es una isomerasa y transforma a la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato. Éste azúcar es nuevamente fosforilado por la fosfofructocinasa-1, la molécula resultante es la fructosa 1,6-bifosfato. El rompimiento de la fructosa 1,6-bifosfato es llevado a cabo por la aldolasa y da como resultado dos moléculas diferentes, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. La enzima triosafosfato isomerasa convierte a la dihidroxiacetona fosfato en otra molécula de gliceraldehído 3-fosfato. Hasta este paso se han invertido dos moléculas de ATP como se esquematiza en la figura 1. Durante las siguientes reacciones se formarán cuatro moléculas de ATP dando como resultado neto sólo dos moléculas de ATP (Figura 2).

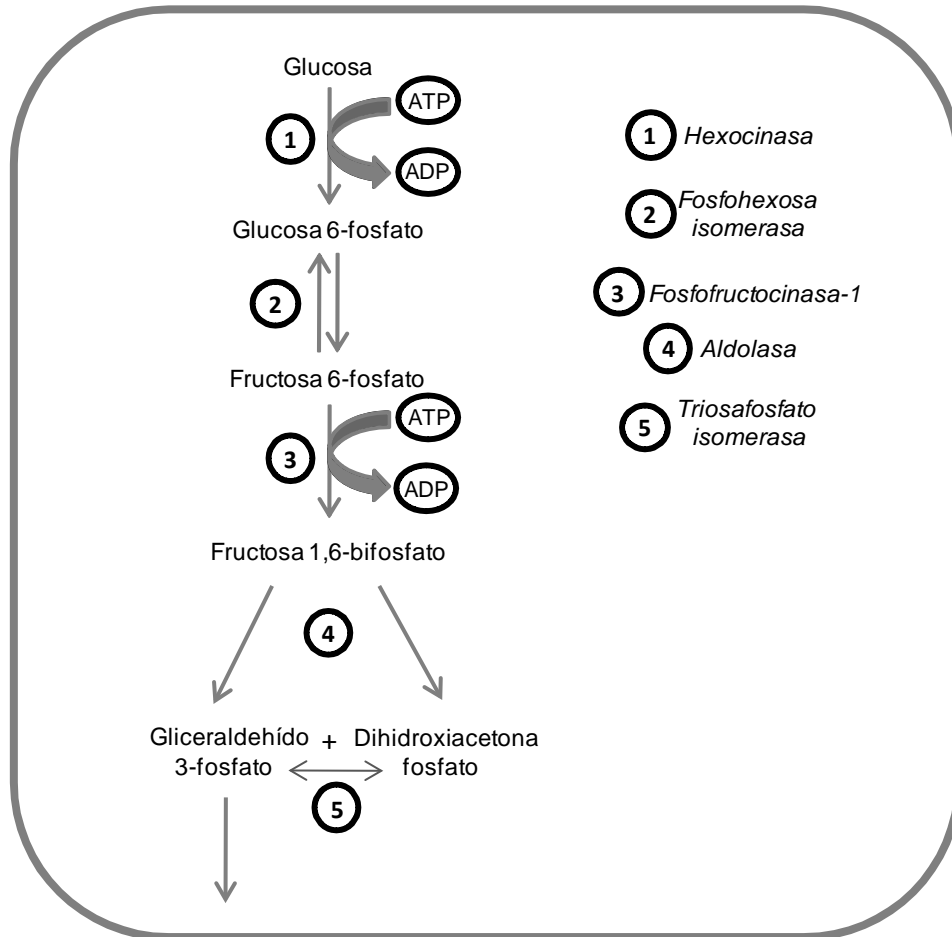


Figura 1. Primeros 5 pasos de la vía glucolítica, además se muestran las enzimas involucradas, los cofactores requeridos para la catálisis enzimática y los productos de dichas reacciones. En esta primera parte de la glucólisis se invierten dos moléculas de ATP.

La enzima glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa transforma las dos moléculas de glicerinaldehído 3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato (Figura 2). Estas dos últimas moléculas son defosforiladas por la enzima fosfoglicerato cinasa dando como resultado dos moléculas de 3-fosfoglicerato. La fosfoglicerato mutasa convierte al 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato para después ser transformado en fosfoenolpiruvato por una enolasa. Finalmente, la piruvato cinasa convierte las dos moléculas de fosfoenolpiruvato en dos de piruvato.

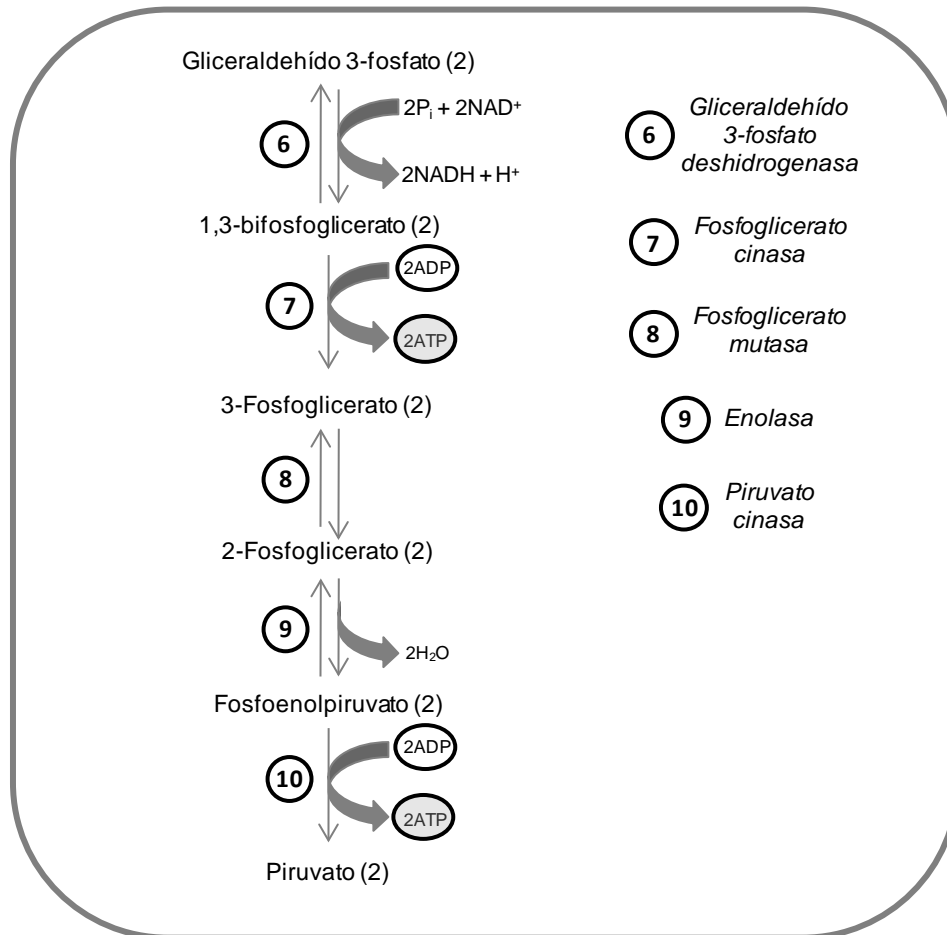


Figura 2. En este esquema se muestran las reacciones restantes de la vía glucolítica en las cuales se obtienen cuatro moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato que pueden seguir la vía de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs.

El piruvato puede seguir distintas rutas metabólicas: ser oxidado durante el ciclo de Krebs en condiciones aeróbicas; ser convertido a lactato en la fermentación del ácido láctico llevada a cabo en condiciones de hipoxia como en el músculo esquelético o en los eritrocitos; o ser convertido a etanol durante la fermentación alcohólica por plantas, invertebrados, protistas y otros microorganismos como las levaduras en ausencia de oxígeno.

2.2 CICLO DE KREBS

En condiciones de normoglucemia el piruvato que se produce durante la glucólisis es convertido a acetil coenzima A y éste a su vez se condensa con el

oxaloacetato para formar isocitrato y alimentar el ciclo de Krebs. Pasando de la glucólisis al ciclo de Krebs y de ahí hasta la fosforilación oxidativa, todas estas reacciones dan como resultado 38 moléculas de ATP producidas a partir de una sola molécula de glucosa. Sin embargo durante la hipoglucemia, las concentraciones de piruvato disminuyen considerablemente, por consiguiente no se puede condensar la acetil coenzima A con el oxaloacetato al inicio del ciclo de Krebs, por lo que éste se acumula. En estas condiciones el glutamato se utiliza para convertirse en α -cetoglutarato y continuar el ciclo de Krebs truncado. El aspartato producido en la transaminación incrementa hasta 4 veces su concentración (Agardh *et al.* 1978) (Figura 3).

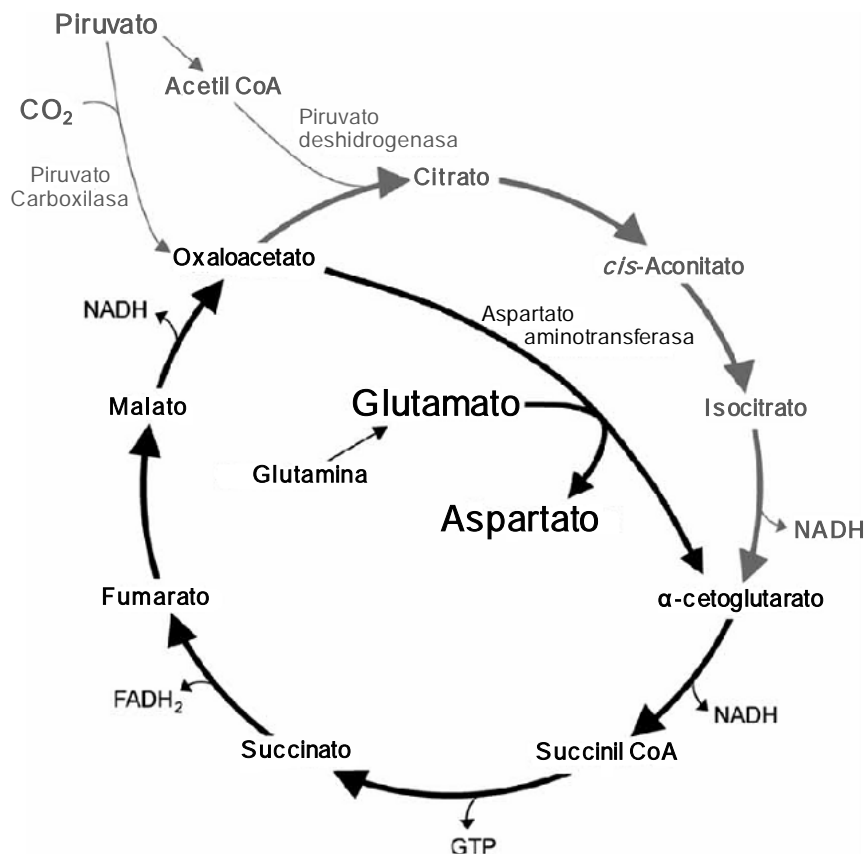


Figura 3. Durante la hipoglucemia el ciclo de Krebs no se puede completar por falta de piruvato. El oxaloacetato se concentra y promueve la reacción de formación de aspartato. En estas condiciones el cerebro puede llevar a cabo la fosforilación oxidativa de forma limitada gracias a que aún puede producir moléculas reductoras como el NADH y el FADH₂ (Modificada de Sutherland *et al.* 2008).

La formación y acumulación del aspartato permiten que su liberación al espacio sináptico promueva la muerte excitotóxica en las neuronas (Sutherland *et al.* 2008).

3. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro. Este media una gran parte de la neurotransmisión rápida excitadora en el sistema nervioso central y excita casi a cada neurona. Es el principal regulador de la información sensorial, la coordinación motora, las emociones y el aprendizaje. Se ha calculado que en el cerebro hasta el 90% de neuronas utilizan el glutamato como neurotransmisor, y aproximadamente el 80-90% de las sinapsis son glutamatérgicas (Braitenberg *et al.* 1998). El gasto energético necesario para la repolarización de las membranas, despolarizadas durante la actividad glutamatérgica, es de hasta un 80% del gasto de energía total (Attwell *et al.* 2001). El consumo elevado de glucosa y oxígeno en el cerebro proporciona la energía necesaria para la actividad glutamatérgica. La concentración de glutamato en la materia gris varía entre los 10 y 15 $\mu\text{mol/g}$ por gramo de tejido, mientras que en la materia blanca la concentración es de 4-6 $\mu\text{mol/g}$ (Hassel y Dingledine, 2006). La formación de glutamato se deriva del metabolismo de la glucosa y de aminoácidos; el glutamato es el precursor del ácido γ -aminobutírico (GABA) en las neuronas gabaérgicas y de la glutamina en células gliales; forma parte de proteínas y péptidos, por ejemplo el glutati6n (γ -glutamyl-cisteinil-glicina), el cuál es la principal defensa antioxidante en las células (Figura 4).

El esqueleto de carbono del glutamato se deriva de la glucosa, la cual a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs es convertida a α -cetoglutarato y éste a su vez recibe un grupo amino de algún aminoácido mediante una reacción de transaminación produciendo glutamato. La enzima glutamato deshidrogenasa puede remover el grupo amino del glutamato, formando α -cetoglutarato que se metaboliza en el ciclo de Krebs.

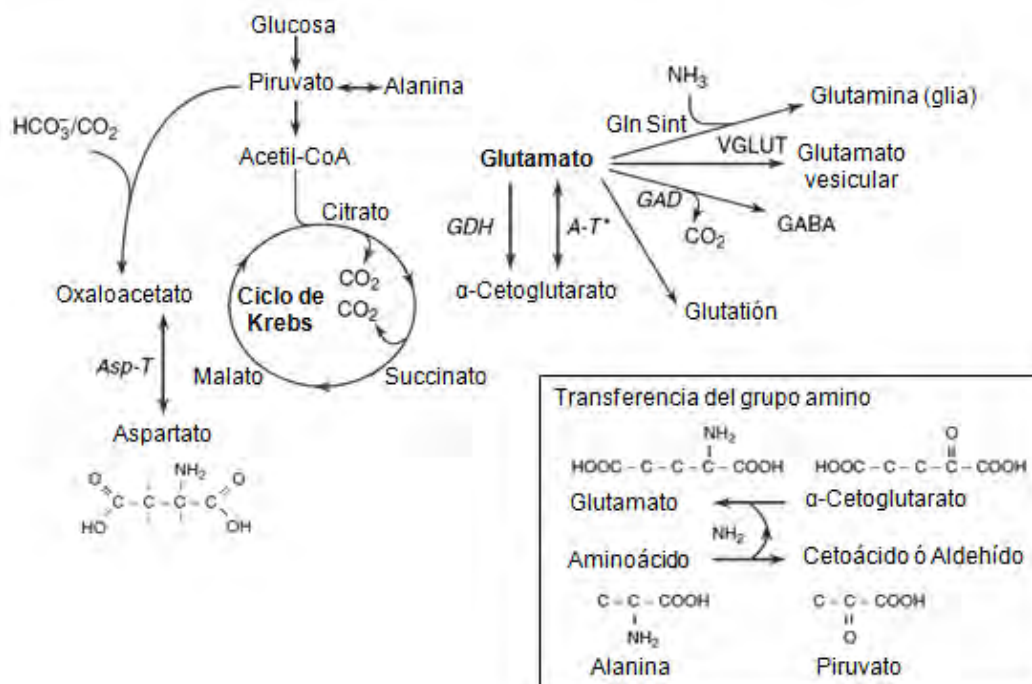


Figura 4. Formación del glutamato a partir de α -cetoglutarato. El esqueleto de carbono del glutamato es obtenido del metabolismo de la glucosa mientras que el grupo amino es adquirido por una reacción de transaminación a partir de algún aminoácido, por ejemplo la alanina, como se muestra en el recuadro. Además el glutamato es precursor de la glutamina en los astrocitos, del GABA en neuronas gabaérgicas y forma parte del glutati6n como se puede ver en la parte superior derecha del esquema (Modificada del libro *Basic Neurochemistry 2006, capítulo 15, pág. 268*).

La tasa metabólica de la glucosa en el cerebro humano es de aproximadamente 0.4 μ mol/min/g de tejido y la del glutamato es de 0.8 μ mol/min/g (Shen *et al.* 1999). Esto significa que prácticamente la glucosa que entra al cerebro es convertida a glutamato, pues una molécula de glucosa resulta en dos moléculas de acetil-CoA durante la glucólisis y al entrar al ciclo

de Krebs son transformadas a α -cetoglutarato y por lo tanto a glutamato. En la rata la tasa metabólica del glutamato es el doble que en el humano (Hassel y Dingledine, 2006).

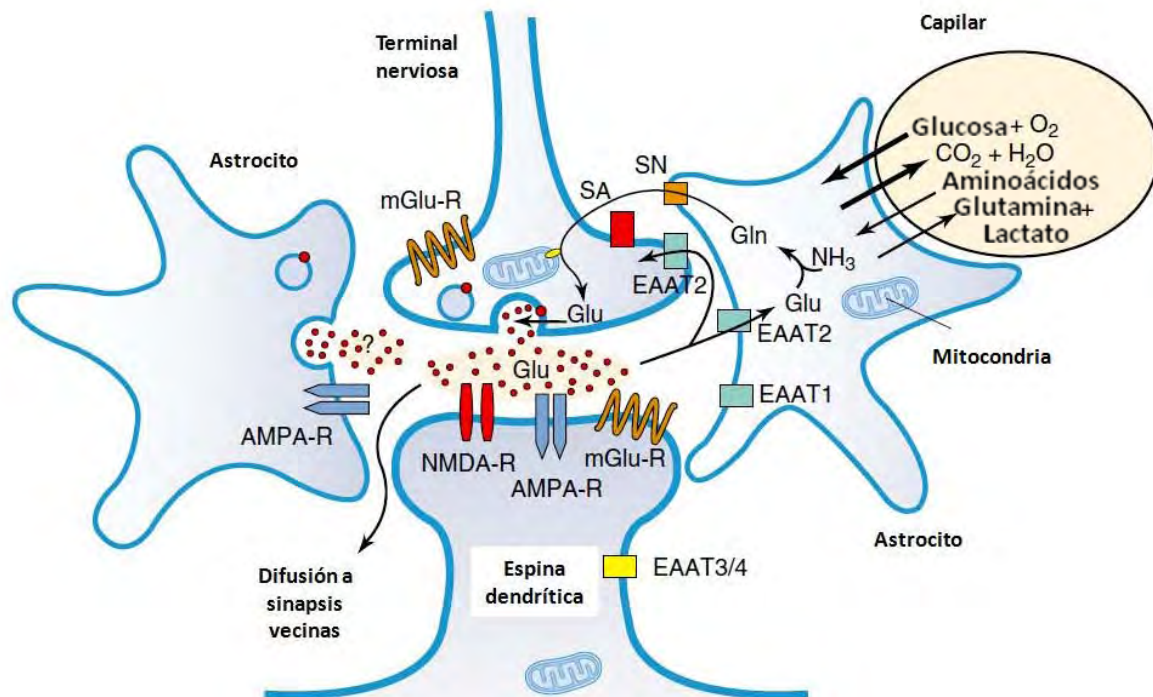


Figura 5. Ciclo de la glutamina. En este esquema se ejemplifica la sinapsis glutamatérgica. Al despolarizarse la membrana en la terminal nerviosa se promueve la entrada de calcio, lo cual desencadena la liberación del neurotransmisor glutamato que se encontraba vesiculado. El glutamato se une a los receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos localizados en la espina dendrítica, y su unión promueve la apertura de canales y la señalización por segundos mensajeros respectivamente. En seguida los transportadores localizados en los astrocitos se encargan de recuperar el glutamato que queda en el espacio sináptico. En los astrocitos se encuentran las enzimas que convierten al glutamato en glutamina que al ser transportada a la presinapsis mantiene el ciclo. (Modificada del libro *Basic Neurochemistry 2006, capítulo 15, pág. 270*).

La mayoría del glutamato liberado de las terminales sinápticas es tomado del fluido extracelular por medio de transportadores de aminoácidos excitadores que se encuentran en los astrocitos, de esta forma se mantiene una concentración de glutamato por debajo de los niveles tóxicos en el espacio extracelular. El influjo de glutamato está acoplado al cotransporte de tres iones Na^+ , un protón y un ión K^+ , que es contratransportado al exterior. En el astrocito el glutamato reacciona con el amonio para formar la glutamina, esta reacción se lleva a cabo gracias a la glutamina sintetasa, enzima citosólica que depende

de ATP y solamente se expresa en astrocitos y oligodendrocitos. La glutamina, que no tiene cualidades de neurotransmisor, es exportada al fluido extracelular y capturada por las neuronas, donde es transformada a glutamato por una enzima mitocondrial llamada glutaminasa, que se activa por fosfato. Al intercambio de glutamato a glutamina entre neuronas y astrocitos se le denomina “ciclo de la glutamina” y permite el reciclaje del glutamato como neurotransmisor evitando sus síntesis *de novo* (Figura 5).

3.1 RECEPTORES A GLUTAMATO

El glutamato ejerce efectos como neurotransmisor a través de sus receptores que se encuentran en las neuronas postsinápticas, dichos receptores se pueden clasificar en ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros son canales que permean cationes y su apertura es rápida en cuanto se libera el glutamato, mientras que los segundos están acoplados a otras proteínas mensajeras y por ende su acción es más retardada. Los receptores ionotrópicos a glutamato son los siguientes: el receptor a *N*-metil-D-aspartato (NMDA); el receptor a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y el receptor a kainato (KA), nombrados de esa forma debido a su molécula agonista. Dentro de los receptores ionotrópicos podemos hacer otra división, los receptores NMDA y los no-NMDA que comprenden los AMPA y Kainato (Figura 6).

Los receptores AMPA se encuentran distribuidos en todo el sistema nervioso central, son responsables de la transmisión sináptica excitadora rápida mediada por el glutamato, son receptores tetraméricos, es decir, están formados por cuatro subunidades que pueden ser: GluR1, GluR2, GluR3 o

GluR4. Éstos receptores pueden permear cationes como el calcio, el sodio y el potasio. Si la subunidad GluR2 no se encuentra formando parte del receptor, éstos son permeables a calcio. En esta subunidad existe un cambio en la región transmembranal II, la sustitución de una glutamina por una arginina (Q→R), lo que impide el influjo del calcio por la boca del canal pues la arginina está cargada positivamente y repele las cargas del ión calcio. Generalmente la subunidad GluR2 está expresada en el SNC bajo la forma de GluR2(R) en el receptor, por lo tanto la mayoría de los receptores AMPA sólo permear sodio y potasio. Ciertas quinoxalindionas son moléculas que inhiben a los receptores AMPA y un ejemplo de ellas es el 6-nitro 7-sulfamobenzo[f] quinoxalin-2,3-diona (NBQX) (Dingledine *et al.* 1999; Seeburg y Hartner, 2003).

Ionotrópicos			Metabotrópicos		
NMDA	no NMDA		Clase I	Clase II	Clase III
	AMPA	Kainato			
NR1	GLUR1	GLUR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
	GLUR2	GLUR6	mGluR5	mGluR3	mGluR6
NR2A	GLUR3	GLUR7			mGluR7
NR2B	GLUR4				mGluR8
NR2C					
NR2D		KA1			
		KA2			
NR3A			↑ IP ₃	↓ cAMP	↓ cAMP
NR3A			↑ Ca ²⁺		

Figura 6. Esquema que muestra los tipos de receptores a glutamato, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, las respectivas subunidades que los conforman, así como los segundos mensajeros en el caso de los receptores metabotrópicos, a los que están acoplados. (Modificada del libro *Basic Neurochemistry 2006, Capítulo 15, pág. 275*).

Los receptores tipo Kainato también son tetraméricos formados por las subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 ó KA2, ya sean heterómeros u homómeros. Los homodímeros que combinan las subunidades KA1 y KA2 no forman receptores funcionales, pero unen con gran afinidad al kainato y sus

agonistas. Las subunidades GluR5, 6 y 7 en cambio, forman receptores funcionales de composición homodimérica ó heterodimérica. La mayoría son sensibles al AMPA y al kainato dependiendo de la combinación de las subunidades (Kew y Kemp, 2005).

Los receptores NMDA forman un tetrámero permeable a sodio, potasio y principalmente a calcio. Contribuyen con el componente lento de la corriente eléctrica. Éstos receptores tienen varios sitios moduladores: un sitio de unión a glicina, un sitio de unión a magnesio, sitio de unión a zinc, un sitio de unión a poliaminas, un sitio de unión al glutatión y un sitio de unión a protones que hace la actividad del receptor sensible a pH. Los receptores NMDA funcionan como heterotetrámeros y en la actualidad se conocen siete subunidades: NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A y NR3B (Figura 6); las cuales están codificadas por distintos genes (Hassel y Dingledine, 2006; Kew y Kemp, 2005).

3.2 EXCITOTOXICIDAD

La palabra excitotoxicidad surgió después de observar que los aminoácidos excitadores tienen la capacidad de causar toxicidad bajo ciertas circunstancias. La neurotoxicidad del glutamato se conoce desde hace más de 40 años. En 1953 Hayashi describió que el glutamato inyectado directamente en el cerebro del perro era capaz de producir convulsiones. Para el año de 1957 Lucas y Newhouse administraron glutamato a ratas neonatas y observaron neurodegeneración en la retina. Pero fue hasta 1969 cuando Olney acuñó el término de excitotoxicidad, pues descubrió que el glutamato inyectado en ratones inmaduros producía daño en ciertas regiones del cerebro en donde

la barrera hematoencefálica no estaba completamente desarrollada. La potencialidad del glutamato y sus análogos para inducir daño, correlaciona con su acción excitadora. Se ha sugerido que los iones sodio, cloro y calcio juegan un papel muy importante en los efectos tóxicos del glutamato, siendo éste último el más importante (Choi, 1992). Además de los iones, se ha encontrado que la activación de ciertos receptores a glutamato en la postsinapsis participan en la muerte neuronal excitotóxica ya que sus antagonistas son capaces de prevenirla (Choi *et al.* 1987; Choi, 1987), particularmente el receptor NMDA se asocia con la inducción de la muerte excitotóxica.

Actualmente hay autores que proponen que la muerte inducida por glutamato tiene características mixtas (Zeng y Xu 2000), puede ser tanto necrótica como apoptótica (Dirnagl *et al.* 1999). Recientemente se ha descrito un tipo de muerte llamado necroptosis en el que tanto eventos apoptóticos como necróticos pueden ser desencadenados por una misma señal y convergen en una misma célula. Experimentos realizados en cultivos de corteza cerebral arrojan resultados interesantes, se ha encontrado que la necroptosis participa en la muerte neuronal excitotóxica provocada por el NMDA, aunque éste no es el único evento que se desencadena (Li *et al.* 2008). Sin embargo, la controversia continúa y aún no existe un modelo claro que describa con mayor detalle los eventos que ocurren durante la excitotoxicidad y el (los) tipo(s) de muerte que desencadena.

4. HIPOGLUCEMIA

4.1 CARACTERÍSTICAS

La hipoglucemia es una condición relativamente común que afecta a pacientes diabéticos tratados con insulina u otras drogas hipoglucémicas así como a pacientes que tienen insulinomas. La experiencia clínica y estudios experimentales sugieren que la hipoglucemia puede causar alteraciones en el SNC y el SNP. Algunos de los síntomas asociados al SNC son: irritabilidad, falta de concentración, alteración de las funciones cognitivas, convulsiones y pérdida de la conciencia. El desarrollo de la patología en el cerebro se ha estudiado principalmente en material obtenido de autopsias de pacientes que murieron en coma inducido por la insulina, y en animales sometidos a hipoglucemia severa inducida por insulina que muestran un encefalograma isoelectrico, indicativo de que alcanzaron el estado de coma. La pérdida neuronal es más obvia en ciertas regiones del sistema nervioso como la corteza cerebral y el hipocampo. También se ha observado daño en la mielina y en la glia. Se ha propuesto que dicha pérdida neuronal está relacionada con eventos excitotóxicos mediados por los receptores NMDA (Mohseni, 2001).

Existen distintos grados de hipoglucemia. Los pacientes que experimentan hipoglucemia leve (glucosa por debajo de 70 mg/dL) presentan síntomas como sensación de hambre, nerviosismo, temblores y transpiración, los cuales desaparecen elevando la glucosa por medio de la ingesta de alimentos; en la hipoglucemia moderada (glucosa por debajo de 55 mg/dL) los pacientes experimentan mareos, somnolencia, confusión, dificultad para hablar, sensación de ansiedad y debilidad, requieren de ayuda para tratar esta condición; cuando la hipoglucemia es severa (glucosa por debajo de 35-40 mg/dL) los pacientes pueden convulsionar, perder el conocimiento y probablemente llegar al coma, en estos casos se necesita elevar la glucosa por

medio de su administración parenteral para que el paciente pueda recobrar la conciencia. Sin la ayuda oportuna estos pacientes pueden morir (Mohseni, 2001; Cryer, 2007).

Estudios pioneros en ratas con hipoglucemia inducida por insulina, indican que la disminución de la concentración sanguínea de glucosa a menos de 20 mg/dl conduce al estado de coma evidenciado por la pérdida de la actividad eléctrica cerebral. Si éste se prolonga de 30-60 min se produce daño neuronal irreversible, siendo las capas superficiales 2 y 3 de la corteza cerebral las más vulnerables. En el hipocampo las neuronas más susceptibles son las del subiculum, la capa más medial de la región CA1, y las de la cresta del giro dentado, mientras que la región CA3 es la menos afectada. En el estriado la región dorso-lateral es la más vulnerable, mientras que el tallo cerebral y la médula espinal son menos susceptibles (Auer *et al.* 1985)

La muerte neuronal hipoglucémica se relaciona con eventos desencadenados al inicio del período isoelectrico, como es la liberación de aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato), el daño mitocondrial resultante de la entrada de calcio, la falla energética, la pérdida de la homeostasis iónica (Auer *et al.* 1984) y el estrés oxidativo (Suh *et al.* 2007). Otros estudios demostraron que la muerte neuronal inducida por la administración de insulina en la rata se desencadena por la activación de los receptores a glutamato, principalmente los sensibles al NMDA, ya que antagonistas de dicho receptor previenen eficientemente la degeneración (Wieloch *et al.* 1984). Por esta razón se ha considerado que la muerte neuronal hipoglucémica es de tipo excitotóxica. Este tipo de muerte está mediada principalmente por la activación de los receptores de tipo NMDA, y es

dependiente de la elevación de la concentración de calcio intracelular (Choi, 1987). Las consecuencias de la entrada de calcio a la célula son diversas y entre ellas se encuentra la posible activación de sistemas productores de radicales libres como la xantina oxidasa y la óxido nítrico sintasa; la falla mitocondrial y el aumento de la producción de radicales libres mitocondriales; la activación de la fosfolipasa A₂ y la producción de superóxido; así como la activación de proteasas dependientes de calcio como las calpaínas capaces de romper diversos substratos, contribuyendo a la muerte neuronal (Goll *et al.* 2003). La excitotoxicidad es un mecanismo asociado también a la muerte neuronal isquémica, condición en la cual también se interrumpe el aporte de glucosa al cerebro, se han propuesto inductores de muerte similares en ambas condiciones patológicas. Sin embargo, la susceptibilidad neuronal a la isquemia y a la hipoglucemia no es idéntica, siendo más susceptibles en el caso de la isquemia las capas profundas de la corteza cerebral, la región medial de CA1 del hipocampo (mas no el giro dentado) y el cuerpo estriado (Petito, 1987). Por otra parte, el estrés oxidativo se ha propuesto como un mecanismo común de muerte en ambas condiciones, en particular en la isquemia cerebral éste se atribuye a la reperfusión y al suministro súbito de oxígeno (Sugawara y Chan, 2003). Recientemente se ha demostrado que la reintroducción de glucosa después de un periodo isquémico contribuye de manera muy importante a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Suh *et al.* 2007), sugiriendo la importancia del componente hipoglucémico en la patología isquémica. Los efectos de la hipoglucemia y la reintroducción de glucosa, aislados de los de la hipoxia y la reperfusión de oxígeno, no se conocen a profundidad, ni tampoco cual es su contribución al daño neuronal.

5. MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso inexorable que ocurre en cualquier organismo considerado “vivo” y está involucrada en diversos procesos como el desarrollo y la homeostasis de los tejidos, (Jacobson *et al.* 1997; Monk *et al.* 2001) para lo cual es necesario que se activen patrones moleculares precisos que lleven a la célula a morir de forma programada.

En la actualidad se han descrito distintos patrones de muerte celular, algunos de ellos son los siguientes: apoptosis, necrosis y muerte autofágica. En los siguientes párrafos describiré con mayor detalle los tipos de muerte mencionados.

5.1 APOPTOSIS

Es el tipo de muerte más estudiado y caracterizado tanto morfológica como bioquímicamente. Es considerada también como muerte celular programada tipo I. Es identificada en células únicas rodeadas de un ambiente sano.

La apariencia morfológica de una célula apoptótica depende del tipo celular, el estímulo y el estado temprano o tardío del proceso de muerte. Dentro de las características morfológicas se encuentran las siguientes: condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo, encogimiento del citoplasma y reducción del volumen celular, formación de protuberancias membranales y cuerpos apoptóticos (Mattson y Bazan, 2006).

Dicha apariencia morfológica es resultado de procesos bioquímicos como la activación masiva de caspasas y otras proteasas como las endonucleasas que fragmentan el DNA, condensación de la cromatina, la

pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria (Green y Kroemer, 1998), la permeabilización completa de la membrana externa mitocondrial (Green y Kroemer, 2005), la integridad de la membrana plasmática y la exposición de la fosfatidil serina como señal de fagocitosis para células como los macrófagos (DeSimone *et al.* 2004) (Figura 7).

Las proteasas orquestadoras de este tipo de muerte celular son llamadas caspasas. Éstas son sintetizadas en forma de zimógenos y señales corriente arriba convierten a estos precursores en proteasas maduras. Las caspasas iniciadoras (caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10) son activadas por autoprocésamiento para formar oligómeros, mientras que las caspasas efectoras (caspasa-3, -6, -7) son activadas por otras proteasas, incluyendo a las caspasas iniciadoras y la granzima B (Green, 1998).

Las principales vías que se han identificado de acuerdo a la caspasa iniciadora son tres: la vía extrínseca o del receptor de muerte, que involucra la caspasa-8 (Medema *et al.* 1997); la vía del estrés reticular en la que se atribuye la activación de la caspasa-12 (Nakagawa *et al.* 2000) y la vía mitocondrial, en la cual varias señales pueden liberar proteínas de la mitocondria al citoplasma, provocando la activación de caspasa-9 y el rompimiento de caspasa-3, -7 o -6 (Green y Kroemer, 1998).

La vía extrínseca involucra la unión de ligandos extracelulares (ej. FasL) a receptores localizados en la superficie de la membrana (ej. Fas/CD95) dando como resultado el reclutamiento de proteínas adaptadoras (ej. FADD), activación de caspasas iniciadoras (ej. caspasa-8) y la subsecuente activación de las caspasas efectoras (ej. caspasa-3, -6 y -7) (Nagata, 1999).

Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial integra señales generadas por una gran variedad de estímulos que convergen en la mitocondria, dentro de estos estímulos están: el daño al DNA, daño al citoesqueleto y pérdida de la adhesión celular entre otros. Dichos estímulos provocan que la membrana externa mitocondrial se vuelva permeable y con ello se liberen proteínas al citosol. Un ejemplo muy conocido es el citocromo *c* que forma parte de la cadena de transporte de electrones y que al liberarse sirve como cofactor de Apaf-1 para promover la formación del apoptosoma y la consecuente activación de caspasas tanto iniciadoras como efectoras, usualmente caspasa-9 y -3 respectivamente (Kroemer y Reed, 2000; Spierings *et al.* 2005).

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial no solo permite que se libere el citocromo *c*, sino también otras moléculas proapoptóticas como Smac/Diablo, Omi/HtrA2, las cuales pueden potenciar la apoptosis mediando la inactivación de varios inhibidores celulares de apoptosis (IAPs) (Verhagen *et al.* 2000; Salvesen y Duckett 2002).

5.2 NECROSIS

Estudios ultraestructurales que realizaron Kerr y colaboradores en 1972 evidenciaron al menos dos tipos de muerte en las células. Uno de ellos es la apoptosis previamente descrito en este trabajo y el otro tipo de muerte celular es conocido como necrosis, la cual es una forma de degeneración violenta y rápida, caracterizada por el hinchamiento de la célula, destrucción de los organelos, interrupción de la membrana plasmática liberando el contenido intracelular y provocando una reacción inflamatoria que afecta extensivamente

a las poblaciones celulares circuncidantes (Kerr *et al.* 1972) como se ejemplifica en la figura 7.

Se ha caracterizado a la calpaína como la principal proteasa involucrada en la muerte necrótica. Pertenece a la familia de cisteín proteasas citosólicas que contienen varios sitios de unión a calcio y afectan alostéricamente su actividad (Ohno *et al.* 1984). Se expresan abundantemente en los mamíferos, en donde se han reportado cerca de 15 miembros, dentro de los cuales se encuentran las llamadas calpaínas convencionales, la m-calpaína y la μ -calpaína, expresadas de manera constitutiva en todos los tejidos. La μ -calpaína es activada *in vitro* a concentraciones micromolares (50 μ M) mientras que la m-calpaína a concentraciones que van desde 200 μ M hasta milimolares (Goll *et al.* 2002). Estas enzimas son heterodiméricas, poseen una subunidad de 80 KDa (codificada en los genes *capn1* y *capn2* respectivamente) y una subunidad reguladora de 30 KDa (codificada en el gen *capn4*). La actividad de la calpaína es modulada por su inhibidor endógeno, la calpastatina. Generalmente la calpaína se encuentra de forma latente en el citosol y se transloca a la membrana en respuesta al calcio, entonces se autoproteolisa y la subunidad grande se disocia de la pequeña; una vez activa, la calpaína rompe proteínas de membrana y cuando se libera de la membrana es capaz de romper proteínas del citosol (Goll *et al.* 2003). Los sustratos de las calpaínas incluyen proteínas del citoesqueleto, proteínas asociadas a la membrana como transportadores, intercambiadores, canales, receptores, proteínas de señalización y factores de transcripción. En condiciones fisiológicas, cuando la concentración de calcio es de 100 nM, pequeñas modificaciones proteolíticas de algunos sustratos de la calpaína están asociadas con el funcionamiento

celular normal. La relación entre la calpaína y el rompimiento de su sustrato, la espectrina, es evidente durante la sinaptogénesis y el crecimiento de las neuritas (Wang 2000; Chan y Mattson, 1999). El papel fisiológico de la calpaína se ha visto en procesos de plasticidad como el remodelaje neuronal, en la creación de los nuevos contactos sinápticos y la formación de los conos axonales, en la motilidad celular, la proliferación y la progresión del ciclo celular (Gitler y Spira, 1998). Sin embargo, la actividad prolongada de la calpaína puede conducir a la muerte neuronal.

Tipo de muerte	Características	Proteasas efectoras
<i>Apoptosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Muerte programada • Reducción de volumen • Integridad de organelos • Requiere ATP • Cuerpos apoptóticos • Condensación de cromatina 	Caspasa-3 Caspasa-6 Caspasa-7
<i>Autofagia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de genes Atg • Formación de autofagosomas y autolisosomas • Secuestro de organelos • Degradación 	Catepsina B Catepsina D Catepsina L
<i>Necrosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso no regulado • Hinchamiento • Destrucción de la membrana • Lisis nuclear • Inflamación 	m-Calpaína μ -Calpaína

Figura 7. Cuadro comparativo que muestra las diferencias características de los tipos de muerte neuronal: apoptosis, autofagia y necrosis. (Modificada del libro *Basic Neurochemistry 2006*, capítulo 36, pág. 605).

5.3 AUTOFAGIA

Las células dependen de un balance estrictamente regulado entre la síntesis de proteínas y su degradación, así como el desmantelamiento y biogénesis de los organelos celulares. Mientras que el proteosoma es

responsable de la degradación y reciclaje de las proteínas, el recambio de los organelos es principalmente atribuido a la autofagia (Seglen y Bohley, 1992).

El proceso autofágico ocurre en la mayoría de tipos celulares eucariontes, donde los organelos y otros componentes son secuestrados y degradados en los lisosomas. El lisosoma es un compartimento celular enriquecido en hidrolasas capaces de romper proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, y que promueven la degradación de los organelos mediante la macroautofagia (Klionsky y Emr, 2000).

La autofagia se ha descrito en procesos de sobrevivencia durante privación de nutrientes y también como parte del remodelaje celular en la diferenciación, la metamorfosis y el envejecimiento, así como en la remoción de componentes celulares anómalos producto de estímulos tóxicos e incluso en la muerte celular (Dunn Jr. 1990). En el sistema nervioso, por ejemplo, se han observado signos morfológicos de autofagia en procesos fisiológicos, tales como en la remoción de los segmentos externos de los fotorreceptores en la retina, lo cual no está asociado a la muerte celular (Reme *et al.* 1999). La autofagia también está involucrada en la supresión de tumores, en la eliminación de virus y bacterias de células huésped, en la presentación de antígeno, en la neurodegeneración y en algunas miopatías. La autofagia se considera como un tipo de muerte celular programada, distinta de la apoptosis (Mizushima y Klionsky, 2007).

Con respecto a la limitación de nutrientes se han descrito dos tipos de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia. La mediada por chaperonas involucra la translocación de proteínas no plegadas directamente a través de la membrana lisosomal (Massey *et al.* 2006). Es una

respuesta secundaria a la privación de nutrientes en los mamíferos. La macroautofagia ó autofagia es la respuesta primaria a la limitación de nutrientes.

En estadios tempranos durante la autofagia, las células contienen pocas vacuolas autofágicas, y tanto el nucleoplasma como el citoplasma parecen oscurecerse, aunque la estructura nuclear se ve normal. La mitocondria y el retículo endoplásmico a veces se encuentran dilatados, y el aparato de Golgi aumenta de tamaño. La membrana plasmática pierde especializaciones tales como los complejos de adhesión celular. En algunos casos, se observa endocitosis, y esto probablemente lleve a la reducción del área de la membrana plasmática. Durante los últimos estadios de la autofagia, tanto el número como el tamaño de las vacuolas aumenta, y muchas contienen mielina o están llenas de lípidos, las cuáles parecen inclusiones gris pálido en el citoplasma (Clarke, 1990).

El primer paso en la autofagia es la formación del autofagosoma, lo cual ocurre cuando una porción del citoplasma es engullido por una vacuola de doble membrana que no contiene fosfatasas ácidas ni actividad aril sulfatasa. La doble membrana se deriva de una parte del retículo endoplásmico rugoso libre de ribosomas (Dunn Jr., 1990). Después de un período de maduración que promueve la acidificación de la vacuola, las hidrolasas son insertadas en el autofagosoma por la fusión con lisosomas preexistentes o con elementos provenientes del aparato de Golgi (Figura 8). Las proteínas intracelulares se degradan para mantener el recambio y proveer de una fuente de aminoácidos para la síntesis de proteínas y para la gluconeogénesis (Ivanova *et al.* 2008). Las macromoléculas resultantes son liberadas al citosol por medio de

permeasas que se encuentran en la membrana lisosomal, donde pueden ser recicladas para reacciones anabólicas o catabólicas (Yang *et al.* 2006). La autofagia es rápidamente inducida en condiciones de ausencia de nutrientes y de factores tróficos proveyendo a las células de energía, ó eliminando material dañino, como el producido durante el estrés oxidativo ó las proteínas agregadas.

La formación del autofagosoma es un proceso complejo que involucra a una maquinaria única, las proteínas Atg, las cuales fueron identificadas por primera vez en levaduras, actualmente se conocen 29 proteínas Atg específicas de la autofagia (Kawamata *et al.* 2005). Estas proteínas promueven la inducción y formación del autofagosoma en dos procesos interconectados en los que dichas proteínas se conjugan, similares a la ubiquitinación. Atg8 (LC3 en mamíferos) y Atg12 son proteínas tipo ubiquitina. Atg4 proteolisa a la proteína Atg8 removiendo residuos de la región carboxilo terminal exponiendo a la glicina como último aminoácido, mientras que Atg12 es sintetizada con la glicina expuesta. Ambas proteínas son activadas por Atg7, la cual es homóloga de una enzima activadora de ubiquitina (E1). Los intermediarios son transferidos a Atg3 y Atg10, respectivamente, que son análogas de proteínas conjugadoras de ubiquitina (E2). Atg8/LC3 por su parte, se une covalentemente a la fosfatidiletanolamina, lo cual permite su inserción en la membrana del autofagosoma. En mamíferos la forma precursora se conoce como LC3-I y la forma lipidada como LC3-II. Atg8/LC3-II es el único Atg que permanece asociado al autofagosoma, y es por tanto el único marcador de autofagia encontrado hasta la fecha. Aunque LC3-II también puede estar en la membrana de los autolisosomas, ésta se encuentra en niveles más bajos (Figura 8).

Después del descubrimiento de la autofagia en la década de los sesenta, resultó claro que los aminoácidos, producidos por el rompimiento de las proteínas en los autofagolisosomas, controlan negativamente la autofagia (retroalimentación negativa), y que este proceso es también inhibido por la insulina (en el hígado) y activado por el glucagon (Mortimore *et al.* 1996). Es muy conocido que las cinasas PI3K son las principales orquestadoras en la vía de la autofagia en mamíferos. Mientras que la PI3K clase III es requerida en los estadios tempranos de la formación del autofagosoma, la PI3K clase I tiene un efecto inhibitor, a través de la cinasa de mTOR. La ausencia de nutrientes es detectada por dicha cinasa mTOR (blanco de la rapamicina) y es el principal sistema inhibitor de la autofagia en condiciones donde los nutrientes abundan, mientras que la cinasa del factor de iniciación 2α (eIF2 α), activa la autofagia durante la ausencia de nutrientes. La señalización por PI3K y Akt media la respuesta a través de los receptores de tirosina cinasa que activan a mTOR reprimiendo la autofagia, en respuesta a factores de crecimiento y al factor parecido a la insulina (Levine y Yuan, 2005; Galluzzi *et al.* 2008; Mizushima y Klionsky, 2007). Río abajo de mTOR existen aproximadamente 17 productos génicos esenciales para la autofagia que se denominan Atg, y codifican para proteínas necesarias para la inducción de la autofagia y para la generación, maduración y reciclaje de los autofagosomas. Estas proteínas se dividen en 4 grupos: las que presentan actividad de cinasas de treonina/serina y responden a la activación de la cinasa TOR; cinasas de lípidos que participan en la vesiculación; las que participan en sistemas de conjugación parecidos a la ubiquitina; y las que se requieren para desensamblar complejos de proteínas

Atg de los autofagosomas maduros (Levine y Yuan, 2005; Galluzzi *et al.* 2008; Mizushima y Klionsky, 2007).

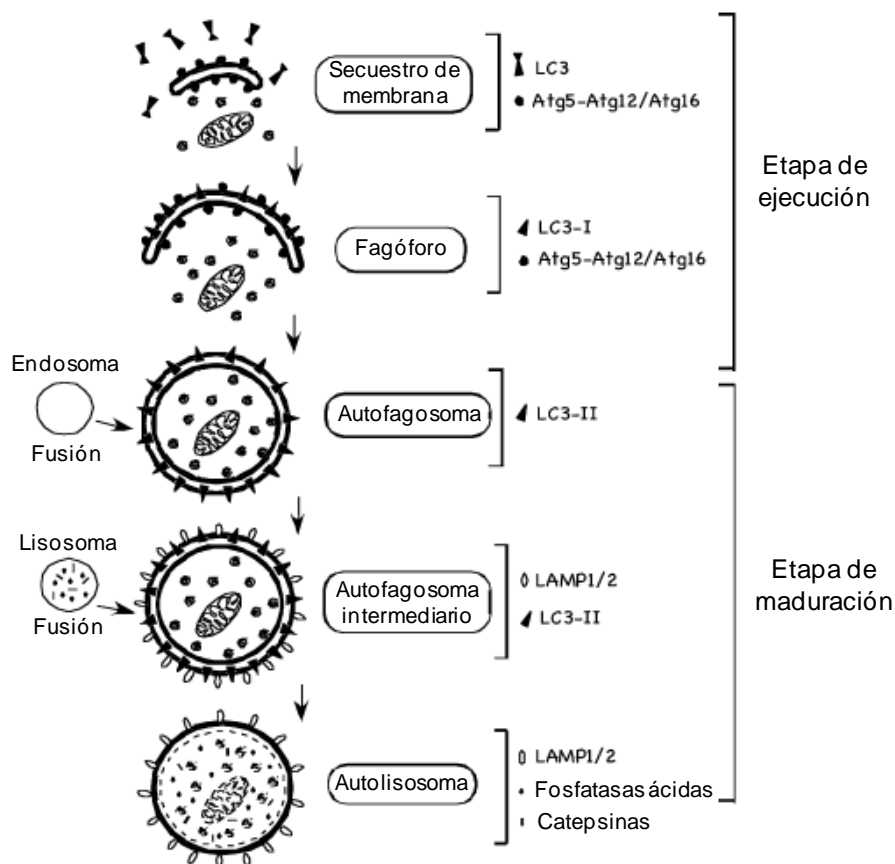


Figura 8. Proceso de formación del autofagosoma hasta su maduración y fusión con el lisosoma. (Modificada de Ameeta Kelekar, 2005).

Las catepsinas son proteasas lisosomales asociadas a la autólisis de la célula y por lo tanto son importantes ejecutoras de la muerte autofágica. Los lisosomas son compartimentos ácidos que forman parte del sistema endosomal-lisosomal. Las catepsinas son el grupo más grande de enzimas dentro de los lisosomas y está conformado por una familia de 11 cisteín proteasas en el humano (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y X), y la catepsina D que es una proteasa de aspartato. Las catepsinas B, L y D son las más abundantes en los lisosomas y por tanto se usan como marcadores de actividad lisosomal.

Las catepsinas B y D son ubicuas en los tejidos de los mamíferos. La catepsina B tiene una cisteína en su sitio activo y un peso molecular de 39 KDa como precursor, y de 29 y 26 KDa en su forma activa. La catepsina D contiene dos residuos de aspartato en su sitio activo y pertenece a la familia de la pepsina. Tiene un peso molecular de 56 KD como proenzima y de 42 y 30 KDa en su forma activa (Uchiyama, 2001; Ivanova *et al.* 2008).

6. HIPOGLUCEMIA, PROTEASAS Y MUERTE NEURONAL

Durante el daño hipoglucémico inducido *in vivo* por la administración de insulina, se conoce que la caspasa-3 se activa fuertemente después de un periodo de coma de 30 min, se sugiere que hay una redistribución del citocromo c de la mitocondria al citosol, así como del factor inductor de la apoptosis (AIF) al núcleo, además existe activación de calpaína y de caspasa-3, desde los 30 min de recuperación posteriores al período de coma (Ferrand-Drake *et al.* 2003). Estas observaciones sugieren la convergencia de muerte necrótica y apoptótica en la hipoglucemia, pero se desconoce la presencia de eventos autofágicos.

Por otra parte, se ha sugerido que la autofagia ocurre durante la apoptosis retardada asociada a la isquemia cerebral (Nitatori *et al.* 1995) y se piensa que tiene un papel protector. También se ha sugerido que toma parte en el proceso de muerte neuronal ya que la inhibición de la autofagia con 3-metiladenina (3-MA), reduce la muerte (Chaitanya y Babu, 2008). Entonces la autofagia puede tener un papel protector de la muerte, pero también contribuir a ésta durante la isquemia. Además, en la muerte apoptótica inducida por la privación de suero en células PC12 también se presentan signos de autofagia

como son la presencia de vacuolas de doble membrana ó autofagosomas, un aumento en la actividad de la catepsina D y protección de la muerte por 3-MA (Uchiyama, 2001). Entonces la apoptosis y la autofagia pueden converger durante un proceso de muerte. Apoyando esta hipótesis recientemente se ha observado que en la isquemia cerebral focal *in vivo*, existe una activación de la calpaína y de la catepsina B durante el período de isquemia así como en la reperfusión, mientras que la caspasa-3 se activa principalmente en la zona de penumbra y durante el periodo de reperfusión, sugiriendo una temporalidad diferencial en la activación de estas proteasas (Chaitanya y Babu, 2008).

Otros estudios indican que las distintas proteasas pueden activarse entre sí, de tal suerte que la actividad de la calpaína inducida por calcio contribuye al rompimiento de los lisosomas y a la liberación de catepsinas (Yamashima *et al.* 2003). La calpaína a su vez, es capaz de romper caspasas como las 3, 7, 8 y 9 y promover su activación (Wang *et al.* 2000). Por su parte, la caspasa-3 es capaz de romper a la calpastatina, un inhibidor endógeno de la calpaína, causando la activación de esta proteasa (Kato *et al.* 2000).

En el caso de la privación de glucosa en neuronas cultivadas, se desconoce si pueden activarse diferentes proteasas y por tanto converger varios tipos de muerte. Por ello es importante conocer la temporalidad de la activación de las distintas proteasas y determinar posibles blancos capaces de prevenir la muerte o conducir a una muerte ordenada, evitando el proceso inflamatorio inexorable en la muerte necrótica.

7. HIPÓTESIS

Durante la ausencia de glucosa habrá una activación diferencial de los distintos tipos de proteasas como la calpaína, la caspasa-3 y la catepsina B lisosomal en neuronas cultivadas de corteza cerebral. Su activación diferencial contribuirá a la muerte neuronal inducida en esta condición.

8. OBJETIVOS

- Establecer un modelo de muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa en cultivos primarios de neuronas corticales.
- Evaluar la activación de la calpaína en ausencia de glucosa a diferentes tiempos y determinar si su activación promueve la muerte neuronal.
- Evaluar la activación de la caspasa-3 en ausencia de glucosa a distintos tiempos y determinar si su activación promueve el daño neuronal.
- Evaluar la activación de la catepsina B en ausencia de glucosa a distintos tiempos y determinar si su activación promueve el daño y muerte neuronal.

9. METODOLOGÍA

9.1 CULTIVOS NEURONALES

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral obtenidas de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación de acuerdo a Brewer y cols. (1993) con algunas modificaciones. Una vez realizada la disección de la corteza cerebral de 10 embriones, el tejido se rebanó en cuadros de 300 μm y posteriormente se disoció en una solución Krebs con tripsina al 0.25% y se incubó 4 minutos a 37°C. La reacción de disociación se detuvo utilizando una solución con inhibidor de tripsina al 0.08% y DNAsa al 0.52%. Las células se suspendieron en medio neurobasal suplementado con una mezcla al 50% de B27 con y sin antioxidantes, 0.5 mM de glutamina y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina. Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células por mililitro de medio, en multicajas estériles de 24 pozos, previamente cubiertas con una capa de poli-L-lisina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para evaluar la viabilidad celular, y además se sembraron células en cajas de 35 mm de diámetro precubiertas también con poli-L-lisina para la obtención de homogenados celulares y la realización de los ensayos de Western blot y actividad enzimática.

9.2 TRATAMIENTOS

A los 10 días *in vitro* (DIV), se retiró el medio de cultivo a las células y se expusieron a un medio libre de glucosa, dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), durante diferentes períodos de tiempo: 30, 60, 75, 90 y 120 minutos, con el fin de conocer el periodo óptimo de privación de ausencia de glucosa para producir muerte neuronal. Al término de la exposición, el medio DMEM fue

removido y sustituido por el medio neurobasal en el que las células estaban incubadas antes del tratamiento. La viabilidad celular se midió 24 horas después de haber realizado el experimento por medio de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para cada tiempo se utilizó un control de cambio de medio, incubando a las células en medio DMEM con glucosa añadida a una concentración de 15 mM, este control se realizó para conocer el posible efecto negativo de la incubación en medio DMEM, ya que éste es un medio distinto al neurobasal en el que las neuronas fueron cultivadas previamente. Durante cada uno de los periodos de exposición las células fueron expuestas al medio sin glucosa en presencia de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H- dibenzo[a,d] ciclohepteno-5,10-imino maleato (MK-801, 10 µM), antagonista de los receptores a glutamato de tipo NMDA, esto se hizo para conocer la contribución de la excitotoxicidad mediada por los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA en la muerte neuronal.

En base a los experimentos descritos arriba, se eligió un tiempo de exposición de 2 horas de ausencia de glucosa para valorar el efecto protector de los siguientes fármacos: MDL-28170 (50 µM, 100 µM), inhibidor de la calpaína; QVDOPH (50 µM), inhibidor general de caspasas; ácido etilendiamino-tetraacético o EGTA (1 mM), quelante de calcio extracelular; MK-801 (10 µM), antagonista de los receptores NMDA y 6-nitro 7-sulfamobenzof[quinoxalin-2,3-diona o NBQX (50 µM), antagonista de los receptores no-NMDA; algunos de estos fármacos se incubaron en combinación.

La muerte celular en los cultivos mantenidos durante 10 días *in vitro* (DIV) es muy severa y se encontró un efecto protector muy pobre con los

fármacos mencionados arriba, por lo tanto se realizaron experimentos con células más jóvenes. A los 8 DIV se probó el efecto protector de los siguientes fármacos sobre la muerte inducida por la privación de glucosa: NBQX (50 μ M), QVDOPH (20 μ M), EGTA (1 mM), L-3-*trans*-(Propilcarbamil) oxiran-2-carbonilo)-L-isoleucil-L-prolina metil éster o CA-074 (500 μ M), inhibidor de la catepsina B; 6-amino-3-metilpurina o 3-MA (10 mM), inhibidor de la PI3K clase III y por ende inhibidor de la autofagia; pepstatina A (1 μ M), inhibidor de la catepsina D y MK-801 (10 μ M).

9.3 VIABILIDAD CELULAR

Este ensayo consiste en la cuantificación de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por las deshidrogenasas mitocondriales activas de las células vivas, éstas catalizan el corte del anillo de tetrazolio del MTT, transformando la sal de MTT a una sal insoluble de formazan, cambiando la coloración del compuesto de amarillo a azul violeta. El MTT se incubó en cada condición durante 1 hora a 37°C, y al término se observó la formación de cristales de color morado que se solubilizaron con isopropanol-HCl. La absorbancia de la solución azul violeta se cuantificó en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de MTT con respecto al control, el cual se normalizó al 100%.

9.4 HOMOGENADOS CELULARES

Después de exponer a las células a la ausencia de glucosa, en presencia o ausencia de los diferentes fármacos, las células se lavaron con PBS y fueron

homogenizadas en distintos amortiguadores para obtener proteína y evaluar la actividad de las diferentes proteasas. El amortiguador utilizado para monitorear la actividad de la calpaína contiene: HEPES 25 mM, EDTA 1.3 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, Tritón X100 al 0.1%, calibrado a pH 7.4. Para la caspasa-3 se utilizaron dos amortiguadores, uno para obtener proteína y otro para la lectura de la actividad, ambos contienen: HEPES 0.1 M, EDTA 1 mM, EGTA 0.02 mM, Sacarosa al 10%, DTT 0.1 M, CHAPS 0.1%, calibrado a pH=7.5; el amortiguador para obtener proteína contiene además un cocktail de inhibidor de proteasas (Complete de Roche) a una concentración de 2 mg/ml. Las células se incubaron en 100 µl del amortiguador descrito por 5 minutos a 4°C y al término se agregaron 100 ul de glicerol anhidro para homogenizarlas. Se utilizaron dos amortiguadores para la catepsina B, el amortiguador para obtener proteína contiene: acetato de sodio 0.4 M, EDTA 4 mM, tritón X-100 al 0.2%, calibrado a pH 5.5; el amortiguador para la lectura de la catepsina B contiene: Hepes 25 mM, EDTA 1 mM, CHAPS al 0.1%, sacarosa al 10% y DTT 3 mM (Del Rio and Massieu, 2008; Lee *et al.* 2007).

La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Lowry estandarizado y ajustado a una caja de 96 pozos, medido en un lector de placa.

9.5 WESTERN BLOT

La α espectrina es una proteína del citoesqueleto que es sustrato de la calpaína, cuando se activa dicha proteasa puede romper la espectrina en dos fragmentos, uno de 145 y otro de 150 kDa. También es sustrato de la caspasa-3 dando lugar a un fragmento de 145 kDa y otro de 120 kDa. Se eligió este ensayo para analizar la activación de la calpaína en las neuronas después de

la privación de glucosa, el cual se realizó de acuerdo a Del Río y Massieu, 2008 de la siguiente manera: las muestras (7.5 ug de proteína por cada condición) se corrieron en un gel de acrilamida al 7% durante 3 hrs a 70 volts. Se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa durante toda la noche a 30 volts y 4°C. La membrana fue bloqueada con TBS + 5% de leche descremada durante dos horas, después se incubó con los anticuerpos primarios que reconocen a la α espectrina y a la actina (1:10,000 para ambos) durante toda la noche. Se lavó dicha membrana con amortiguador TBS Tween al 0.25% (3 lavados por 10 min c/u) y se incubó durante 2 horas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:10,000 y 1:11,000 respectivamente); se lavó nuevamente la membrana con buffer TBS Tween 2 veces durante 10 minutos cada una y el último lavado se hizo con buffer TBS sin Tween por 10 minutos. Finalmente se reveló con sustrato quimioluminiscente. Se cuantificó la densidad óptica correspondiente a las bandas de 145 y 150 KDa, considerando ambas bandas como una, debido a su cercanía. Se reportó con respecto a la densidad de la banda correspondiente a la actina. El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa ImageJ del NIH.

9.6 ACTIVIDAD DE CASPASA-3

La actividad de caspasa-3 se midió en extractos celulares de los cultivos expuestos a las diferentes condiciones experimentales, a través del rompimiento del sustrato acoplado a metilcumarina Ac-DEVD-MCA (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA), en un lector placa como se ha reportado en el laboratorio anteriormente (Del Río y Massieu, 2008). Para medir la actividad de caspasa-3 se utilizaron 30 μ g de proteína por condición y fueron colocados en una placa

de 96 pozos negra; en cada condición se agregaron 200 μ l de amortiguador de lectura con el sustrato a una concentración de 25 μ M y se leyó cada minuto durante media hora a 37°C. Se utilizó un control positivo en el cual las neuronas se incubaron en presencia de estaurosporina (200 nM) durante 8 horas (dato no mostrado) como ya se ha reportado en el laboratorio (Massieu *et al.* 2004), pues la estaurosporina es un inductor de apoptosis e involucra la activación de la caspasa-3 en neuronas de corteza cerebral. Además se incubó con un inhibidor general de caspasas como el QVDOPH a 20 μ M para probar la especificidad del ensayo.

9.7 ACTIVIDAD DE CATEPSINA B

La forma más común de medir la actividad de las catepsinas es por fluorimetría utilizando sustratos que son di ó tripéptidos con un grupo reportero en el carboxilo terminal que es la 7-amino-4-metilcoumarina (AMC) (excitación a 370-380 nm y emisión a 460 nm). Este grupo es liberado después de su rompimiento por las catepsinas activadas emitiendo la fluorescencia. Para la actividad de la catepsina B se utilizó el sustrato Z-Arg-Arg-AMC, que es específico para esta proteasa. La determinación de la actividad de dicha catepsina se llevó a cabo en un lector de placa de acuerdo a la metodología reportada por Lee y colaboradores en 2007. Para medir la actividad de catepsina B se utilizaron 7.5 μ g de proteína por condición y fueron colocados en una placa de 96 pozos negra; en cada condición se agregaron 200 μ l de amortiguador de lectura con el sustrato a una concentración de 25 μ M y se leyó cada minuto durante media hora a 37°C. El inhibidor específico CA-074 se

incubó en el amortiguador de lectura a una concentración de 250 μM para probar la especificidad del ensayo.

9.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis de varianza, ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Fisher de comparación múltiple para todos los resultados obtenidos, expresado como el promedio \pm el error estándar.

10. RESULTADOS

A los 10 días de haber sido sembradas, las células se incubaron en ausencia de glucosa (medio DMEM sin glucosa) durante distintos periodos de tiempo y la sobrevivencia neuronal se monitoreó a las 24 horas de haber realizado el experimento por medio de la reducción del MTT (Figura 9). Puede observarse que la sobrevivencia disminuye de manera dependiente del tiempo de ausencia de glucosa, siendo significativo con respecto al control a partir de una hora, además la muerte es prevenida eficientemente por el MK-801, el cual es un antagonista de los receptores a glutamato de tipo NMDA.

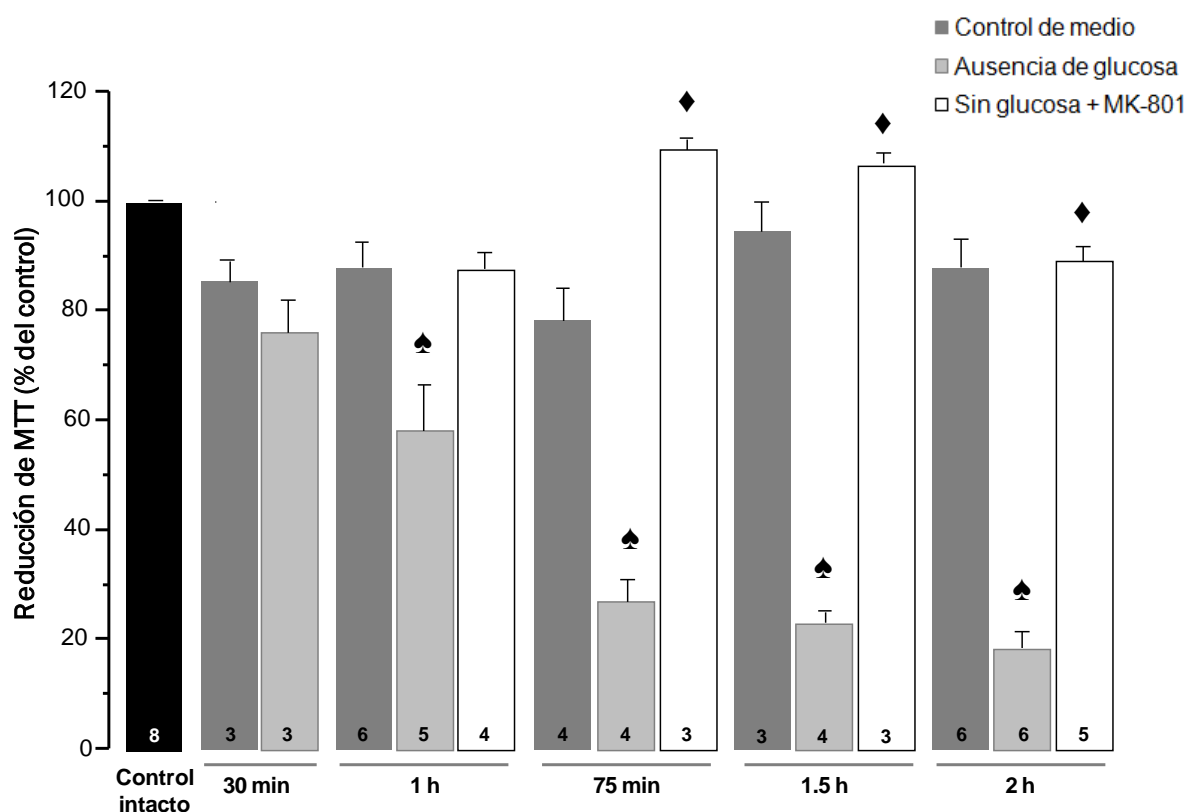


Figura 9. Curso temporal de viabilidad neuronal en ausencia de glucosa. Los tiempos de ausencia de glucosa que se evaluaron fueron: 30 minutos, 1 hora, 75 minutos, 1.5 y 2 horas. Se incluyó un control intacto y controles de medio. A partir de una hora en ausencia de glucosa, la sobrevivencia disminuye significativamente con respecto al control intacto (♠) ($p < 0.0001$). La muerte se revierte por completo cuando se incubaba con un antagonista de los receptores a glutamato de tipo NMDA, el MK-801. Este efecto es diferente significativamente con respecto a la condición de ausencia de glucosa (♦) ($p < 0.0001$). Los resultados se expresan como porcentaje del control (media \pm EE). Los números dentro de las barras representan el número de experimentos realizados en cada condición. s/g, sin glucosa.

Del mismo modo se realizó un curso temporal en ausencia de glucosa para evaluar la actividad de la calpaína a través de la proteólisis de la espectrina detectada por western blot, donde podemos ver claramente el fragmento de 145/150 kDa producido por la activación de la calpaína a partir de una hora en ausencia de glucosa, el cual incrementa a las dos horas, manteniéndose incluso dos horas después de retirar el estímulo, como se muestra en el gel representativo (Figura 10).

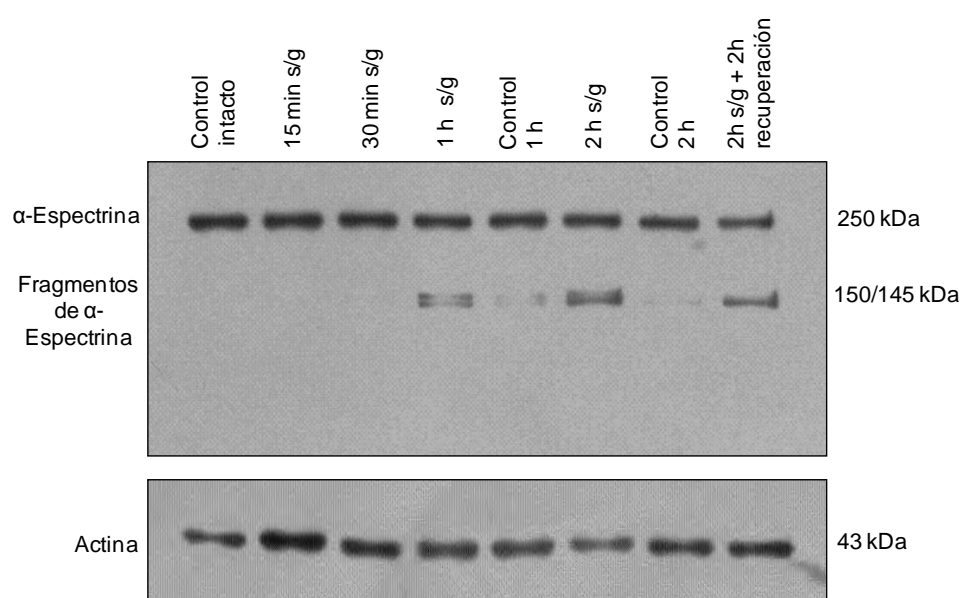


Figura 10. Actividad de calpaína durante la ausencia de glucosa. En este gel representativo podemos observar que la calpaína se activa una hora después de exponer a las neuronas en ausencia de glucosa. Se realizaron controles en medio DMEM con glucosa para descartar que la activación de la calpaína se deba a la incubación en este medio. s/g, sin glucosa.

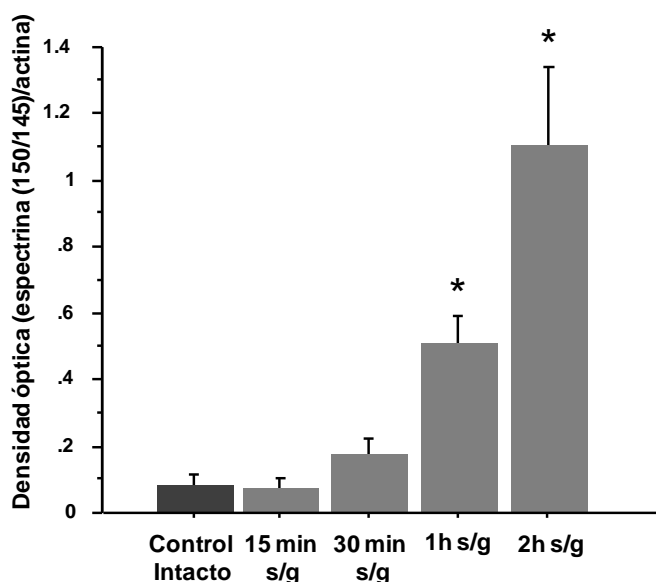


Figura 11. Análisis densitométrico de la actividad de la calpaína. La actividad de la calpaína aumenta a partir de media hora en ausencia de glucosa y el aumento es significativo a partir de una y dos horas comparado contra el control intacto. * (n=4 p<0.01). s/g, sin glucosa.

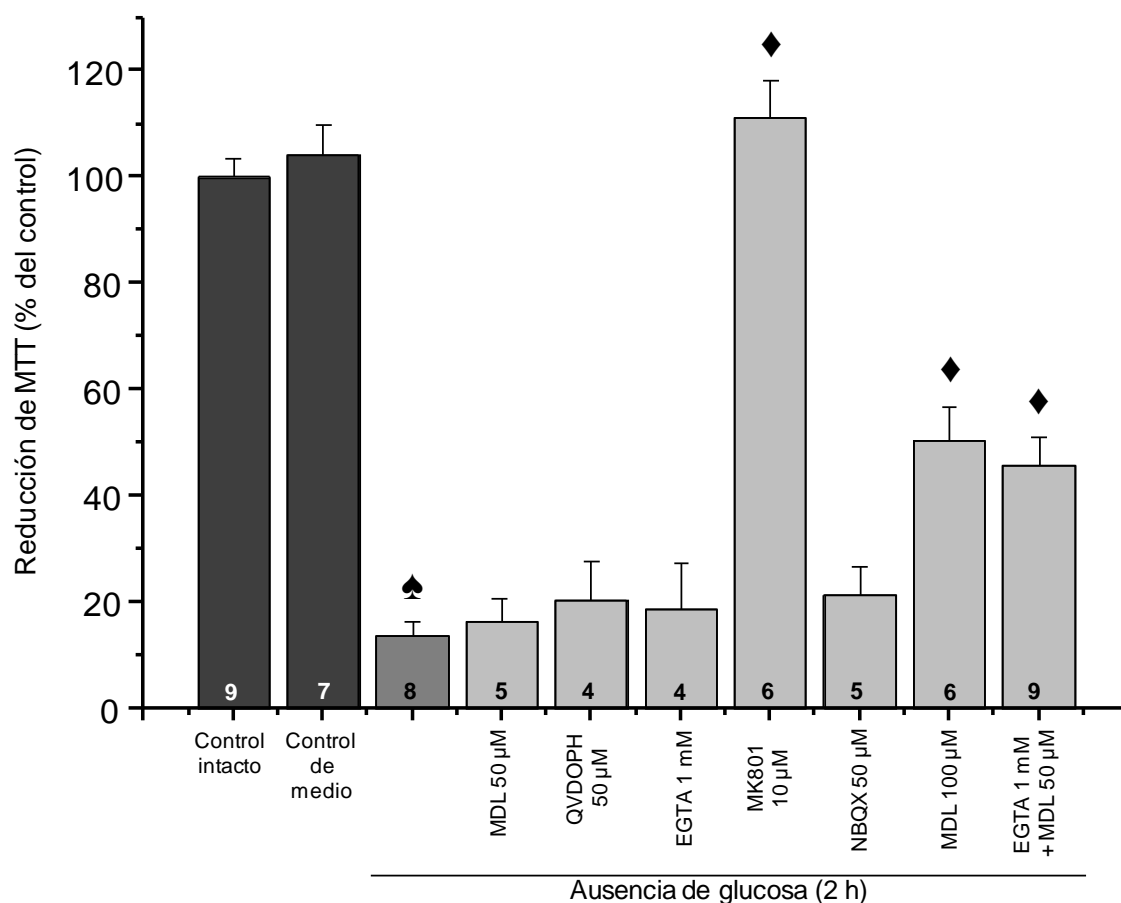


Figura 12. Efecto de diversos fármacos sobre la muerte inducida por ausencia de glucosa en cultivos mantenidos 10 DIV. ♠ ($P < 0.001$) Significativo con respecto al control intacto y cambio de medio. ♦ ($P < 0.001$) Significativo con respecto a la ausencia de glucosa, los resultados se expresan como porcentaje del control (media \pm EE). Los números dentro de las barras representan el número de experimentos realizados en cada condición. s/g, sin glucosa.

Adicionalmente se realizó un ensayo de incubación durante dos horas en ausencia de glucosa utilizando los siguientes fármacos para ver su efecto en la muerte neuronal: EGTA (1 mM) para quelar el calcio extracelular, MDL-28170 (50 μ M y 100 μ M) es un inhibidor de la calpaína, MK-801 (10 μ M) es antagonista de los receptores NMDA y QVDOPH (50 μ M) es un inhibidor general de caspasas. En estas condiciones se evaluó tanto la viabilidad celular (Figura 12) como la actividad de la calpaína (Figuras 10 y 11). Como podemos ver la muerte es prevenida por completo únicamente si se incubó a las neuronas en presencia de MK-801, mientras que es parcialmente reducida con MDL-28170 a una concentración de 100 μ M como se puede ver en la figura 12;

del mismo modo logramos rescatar a las células si incubamos al mismo tiempo MDL-28170 (50 μ M) con EGTA (1 mM).

Estos resultados sugieren que no es suficiente quelar el calcio extracelular para prevenir la muerte neuronal. Mientras que a 50 μ M el MDL-28170 no previno la muerte neuronal, éste mismo fármaco a mayor concentración (100 μ M) sí lo hizo. De acuerdo a los resultados de actividad de calpaína medida por inmunoblot (Figura 13), el MDL-28170 (50 μ M) inhibe completamente la actividad de la enzima en la condición de dos horas de ausencia de glucosa. Sin embargo, incubando MDL-28170 (100 μ M), la viabilidad incrementa a más del 50% (Figura 12).

Por otra parte, si incubamos MDL-28170 a la concentración baja (50 μ M) con EGTA (1 mM) al mismo tiempo, aumenta la viabilidad hasta 50%, sin embargo, si los incubamos por separado, la muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa no se previene (Figura 12). Cuando agregamos QVDOPH (50 μ M) en ausencia de glucosa, podemos observar que no previene la muerte neuronal en esta condición experimental. Del mismo modo, si incubamos con NBQX, inhibidor de los receptores a glutamato de tipo AMPA, en ausencia de glucosa, tampoco prevenimos la muerte neuronal.

Posteriormente se realizó un ensayo de western blot para evaluar la actividad de la calpaína en presencia de los fármacos anteriormente mencionados (Figura 13).

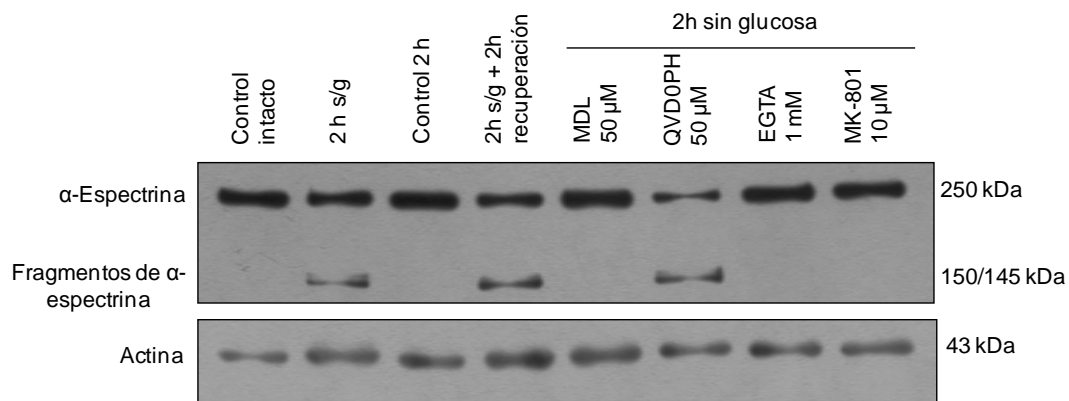


Figura 13. Actividad de la calpaína en presencia de fármacos. El MDL (50 μM), el EGTA (1 mM) y el MK-801 (10 μM) previenen eficientemente el corte de la espectrina, mientras que el QVDOPH (50 μM) no previene la activación de la calpaína. s/g (sin glucosa).

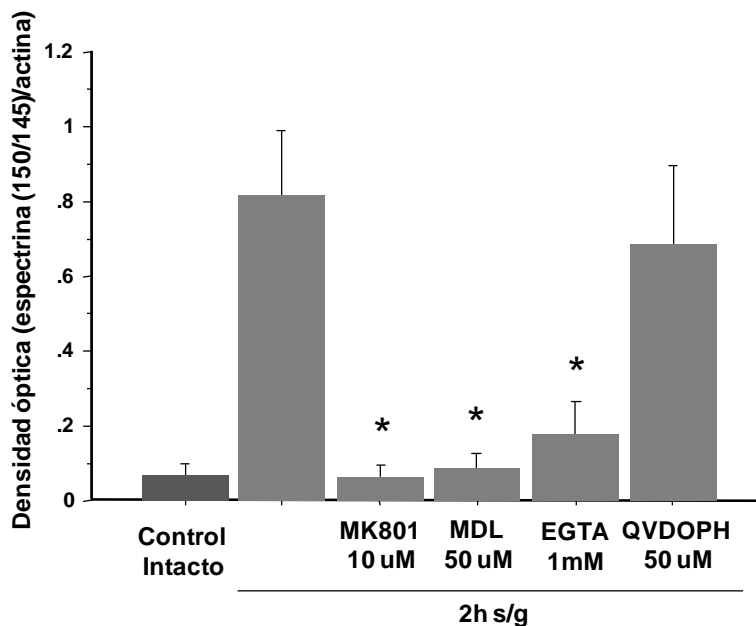


Figura 14. Análisis densitométrico de la activación de la calpaína. Las células se incubaron en ausencia de glucosa (2 h) y en presencia de diferentes fármacos. El inhibidor de la calpaína previene su activación y por tanto el corte de la espectrina, de igual manera sucede si se incuba en presencia de EGTA y de MK-801. * Significativo con respecto a dos horas de ausencia de glucosa (n=4 p<0.002). s/g, sin glucosa.

El inhibidor de la calpaína MDL-28170 inhibe por completo la activación de dicha proteasa y por ende previene el corte de la espectrina, lo mismo sucede si se incuba a las células con EGTA y MK-801. Sin embargo, ni el MDL (50 μM) y ni el EGTA (1 mM) protegen a las neuronas de la muerte a las concentraciones en las que sí previenen el corte de la espectrina. La espectrina también es sustrato de la caspasa-3, su corte genera un fragmento de 120 kDa,

el cual no observamos en estas condiciones experimentales. Por lo tanto, el QVDOPH (inhibidor general de caspasas) no previene el corte de la espectrina y tampoco es neuroprotector.

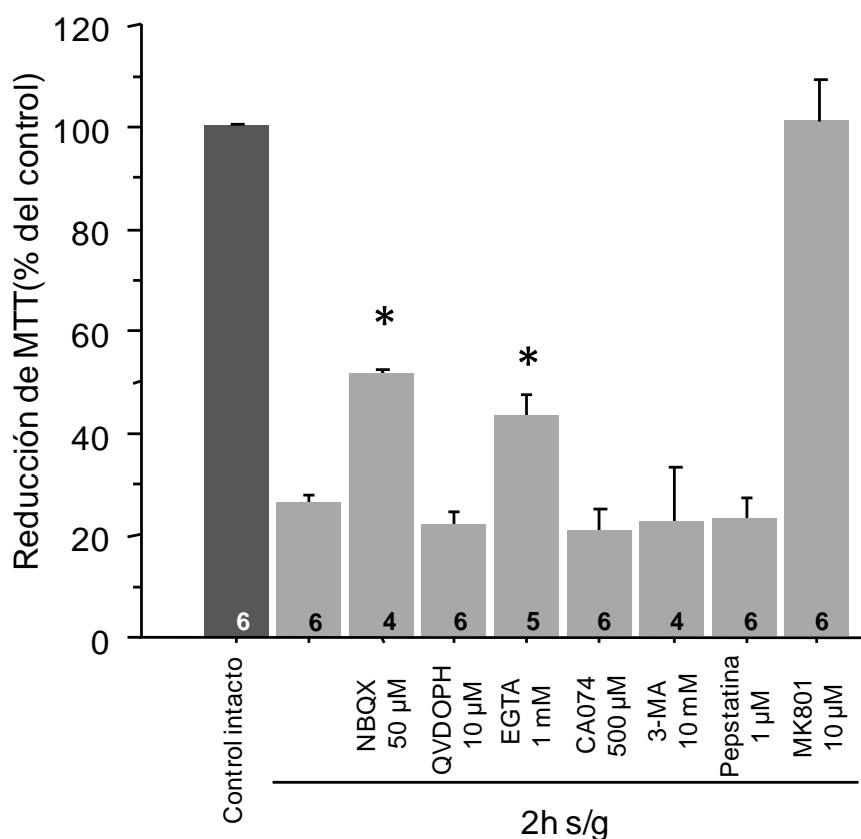


Figura 15. Efecto de diversos fármacos sobre la muerte inducida por ausencia de glucosa a los 8 días *in vitro*. * Significativo con respecto a 2 horas de ausencia de glucosa ($P < 0.02$). Los resultados se expresan como porcentaje del control (media \pm EE). Los números dentro de las barras representan el número de experimentos realizados en cada condición. s/g, sin glucosa.

La muerte celular inducida por ausencia de glucosa en los cultivos mantenidos durante 10 DIV es muy severa y se encontró un efecto protector muy pobre con los fármacos utilizados en los experimentos anteriores, por lo tanto se realizaron experimentos con células más jóvenes. A los 8 DIV se probó el efecto protector de los siguientes fármacos sobre la muerte inducida por la privación de glucosa: NBQX (50 µM), QVDOPH (10 µM), EGTA (1 mM), MK-801 (10 µM) CA-074 (500 µM), inhibidor de la catepsina B; 3-MA (10 mM),

inhibidor de la PI3K clase III y por ende inhibidor de la autofagia; pepstatina A (1 μ M), inhibidor de la catepsina D (Figura 15).

Ninguno de los inhibidores de las catepsinas B y D, CA-074 y pepstatina A respectivamente, lograron rescatar a las neuronas de la muerte neuronal (Figuras 15 y 16). En las imágenes representativas podemos ver que las neuronas pierden sus procesos y una gran cantidad de células mueren en respuesta a la privación de glucosa. Del mismo modo, al incubar a las neuronas con 3-MA, un inhibidor de la autofagia, no logramos rescatar a las neuronas de la muerte inducida por la privación de glucosa (Figura 15).

Durante la ausencia de glucosa las neuronas pierden su morfología casi por completo, se hincha el cuerpo o soma y los procesos tales como axones y dendritas comienzan a degradarse o degenerarse, el estímulo es tan severo que muere más del 70% de la población cuando se mide la viabilidad a las 24 horas. Por otro lado, si incubamos las células con fármacos, éstas presentan la misma morfología de hinchamiento que si se incuban únicamente en ausencia de glucosa (Figuras 15 y 16).

El NBQX es un antagonista de los receptores AMPA, y al incubarse en ausencia de glucosa, la viabilidad aumenta a más de 50%, lo cual es significativo con respecto a la condición de privación de glucosa, del mismo modo se puede ver este efecto protector si se incuban a las células en ausencia de glucosa con EGTA 1 mM (Figura 15). La morfología se recupera al día siguiente del estímulo en presencia de estos fármacos protectores, como se muestra la figura 17. Además el MK-801 protege por completo a las neuronas durante el estímulo de privación de glucosa. En esta condición las neuronas no

presentan el fenómeno de hinchamiento como en el resto de las condiciones de ausencia de glucosa y en presencia de distintos fármacos.

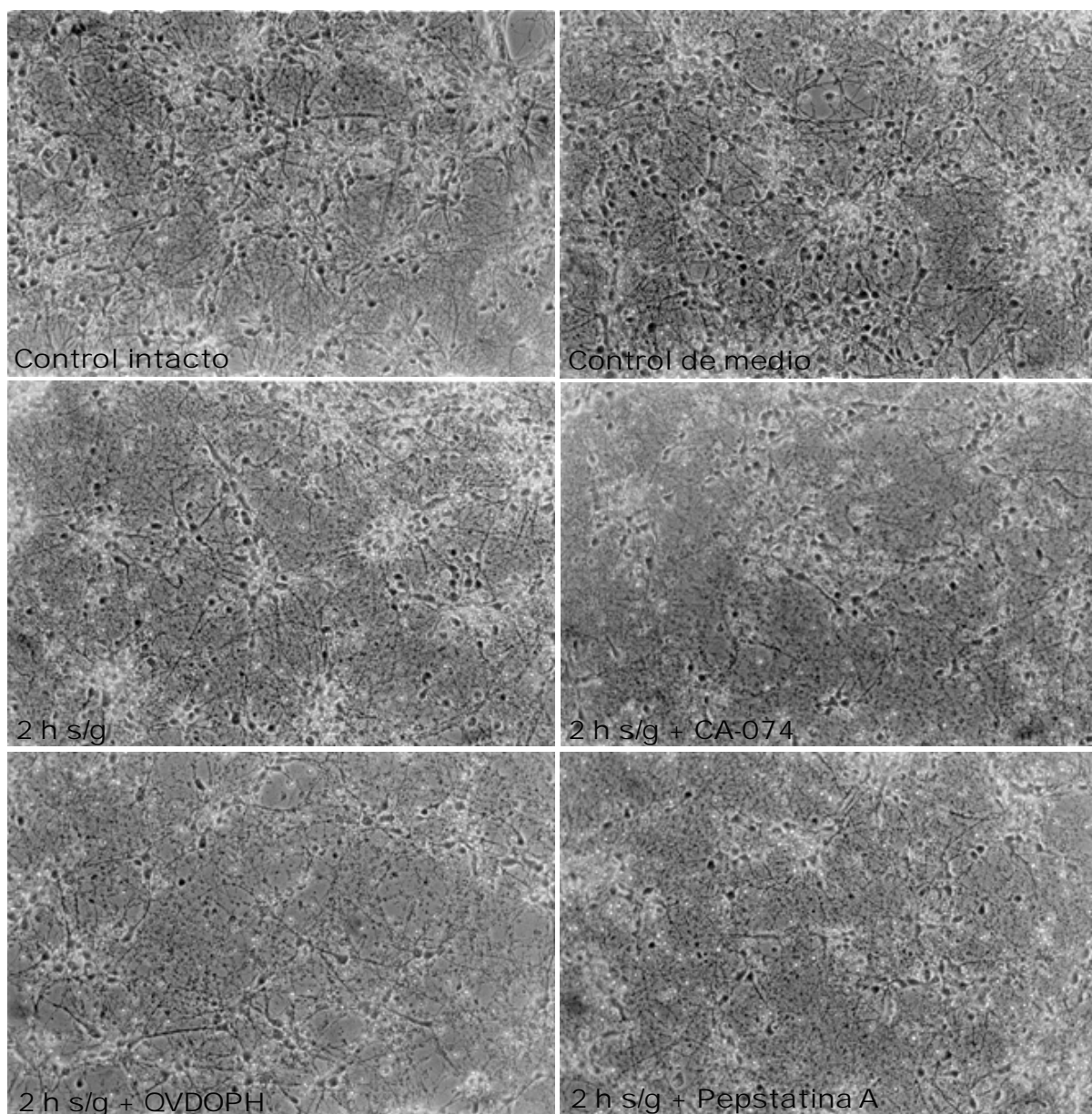


Figura 16. Imágenes representativas de los experimentos de ausencia de glucosa en presencia de los siguientes fármacos: CA074 500 μ M, QVDOPH 10 μ M y Pepstatina A 1 μ M. Las fotos fueron tomadas a las 24 horas de haber realizado el experimento. Se utilizó un microscopio Nikon TMS invertido y se tomaron las fotos con el objetivo de 40X. s/g, sin glucosa.

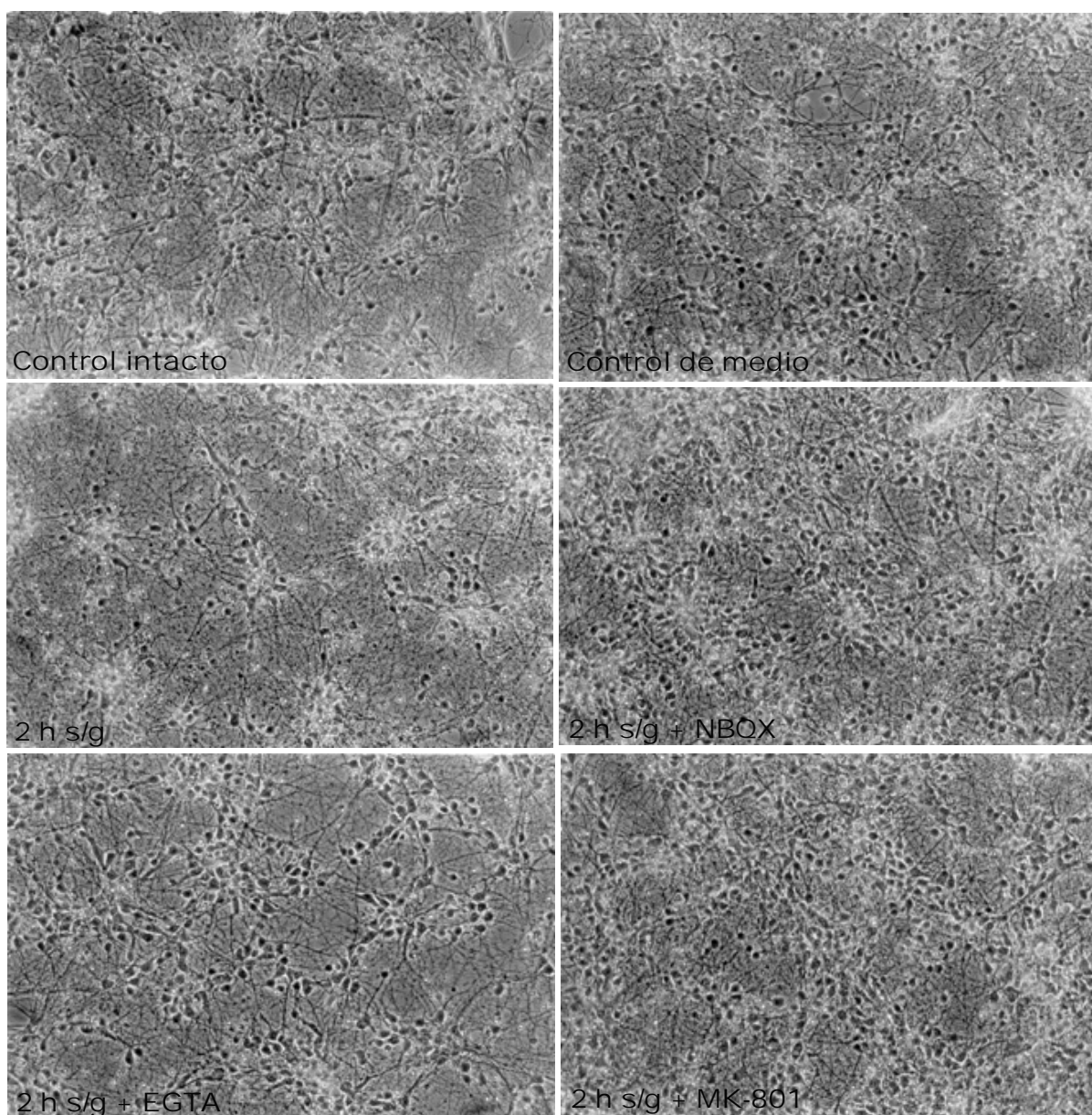


Figura 17. Imágenes representativas de los experimentos de ausencia de glucosa en presencia de los siguientes fármacos: NBQX 50 μ M, EGTA 1 mM y MK-801 10 μ M. Las fotos fueron tomadas a las 24 horas de haber realizado el experimento. Se utilizó un microscopio Nikon TMS invertido y se tomaron las fotos con el objetivo de 40X. s/g, sin glucosa.

Posteriormente se realizó un curso temporal para evaluar la actividad de la caspasa-3 obteniendo homogenados celulares en condiciones de ausencia de glucosa: 30 minutos, 1, 2, 4 y 6 horas. En la figura 18, podemos observar que a partir de las dos horas la actividad de la enzima disminuye. Sin embargo, estos cambios no son significativos en la activación de la caspasa-3 a ningún tiempo de ausencia de glucosa comparados con el control intacto.

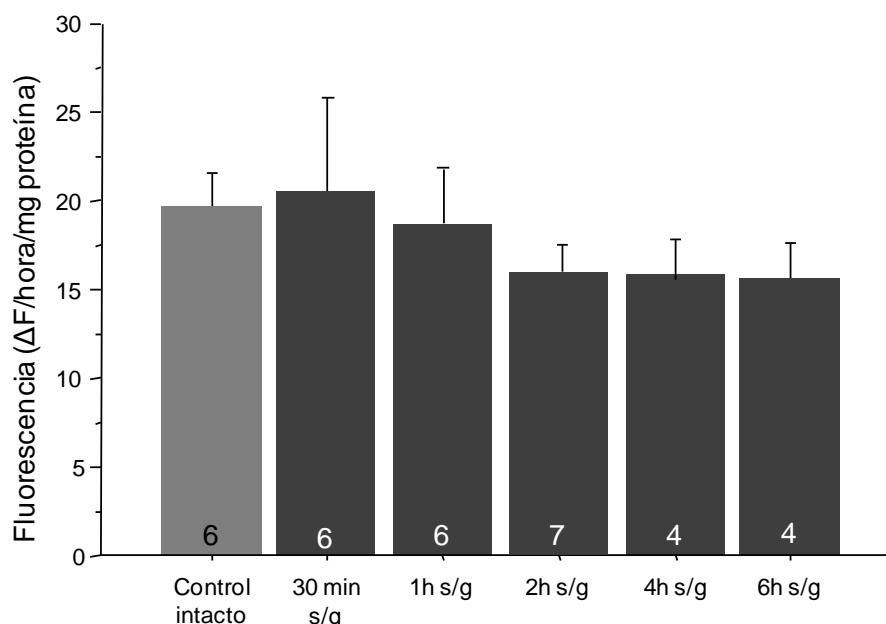


Figura 18. Actividad de caspasa-3 después de exponer a los cultivos en ausencia de glucosa durante diferentes periodos de tiempo. Los números dentro de las barras representan el número de experimentos realizados en cada condición. s/g, sin glucosa.

En base a estos resultados, se escogió el tiempo de 2 horas de ausencia de glucosa para ver el efecto de los siguientes fármacos en la actividad de la caspasa-3: EGTA 1 mM, MDL 50 μ M, EGTA 1 mM y MDL 50 μ M incubados al mismo tiempo durante la ausencia de glucosa (Figura 19). Tanto el EGTA como el MDL incubados por separado no promovieron cambios significativos en la actividad de la caspasa-3, mientras que al incubarse juntos tienden a incrementar la actividad de dicha proteasa y este incremento es significativo con respecto al control intacto y con respecto a las 2 horas de privación de glucosa.

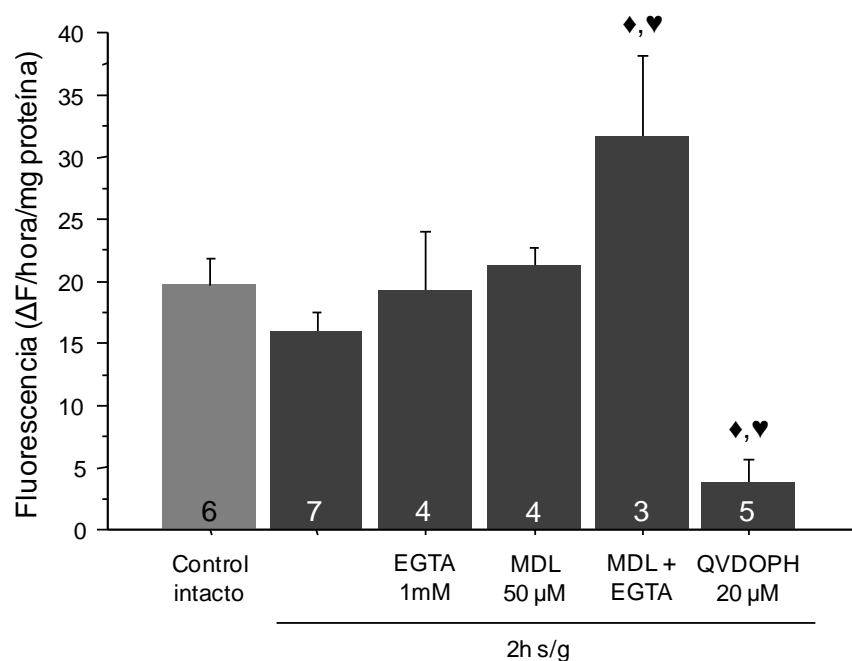


Figura 19. Efecto de distintos fármacos sobre la actividad de caspasa-3. ♦ Significativo con respecto al control intacto ($P < 0.009$). ♥ Significativo con respecto a las 2 horas de ausencia de glucosa ($P < 0.002$). Los números dentro de las barras representan el número de experimentos realizados en cada condición. s/g, sin glucosa.

El QVDOPH fue incubado para corroborar que la fluorescencia obtenida proviniera de la actividad de la caspasa-3, como control del ensayo y el valor obtenido es significativo con respecto a las 2 horas de ausencia de glucosa y con respecto al control intacto.

Finalmente se realizaron ensayos de privación de glucosa a distintos tiempos para evaluar la actividad de la catepsina B. Sorpresivamente encontramos una disminución de la actividad de la catepsina B dependiente del tiempo de privación de glucosa, siendo significativo el resultado a partir de las 2 horas de ausencia de glucosa con respecto al control intacto (Figura 20). Se incubó el inhibidor específico de la catepsina B (CA-074) en el amortiguador de lectura en la condición de 2 horas de privación de glucosa, para corroborar que la fluorescencia obtenida provenga del sustrato específico para la catepsina B.

Los valores obtenidos fueron incluso negativos y significativos con respecto al control intacto y con respecto a las 2 horas de ausencia de glucosa.

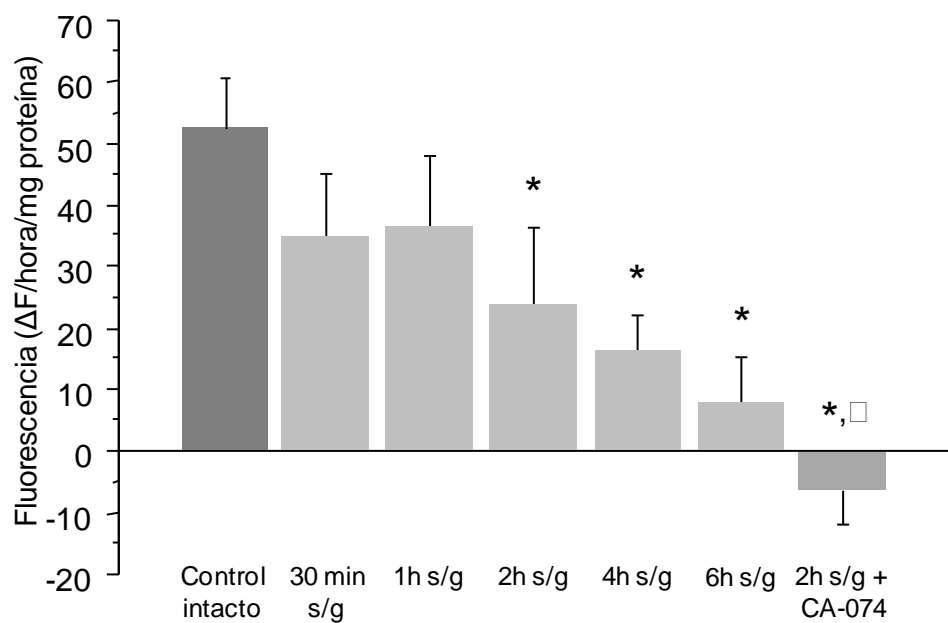


Figura 20. Actividad de catepsina B. Se incubaron a las neuronas en medio libre de glucosa los siguientes periodos de tiempo: 30 min, 1, 2, 4, y 6 horas. * Significativo con respecto al control intacto (n=3, p<0.04). También se incubó con CA-074 (250 μM) que es un inhibidor específico de la catepsina B. □ Significativo con respecto dos horas de ausencia de glucosa (n=3, p<0.036). s/g, sin glucosa.

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha visto que durante la hipoglucemia ocurren múltiples eventos que desembocan en el deterioro y la muerte de las neuronas, especialmente las más vulnerables como las neuronas de hipocampo y corteza cerebral. El propósito de esta tesis ha sido elucidar la participación que tienen distintas proteasas como la calpaína, la caspasa-3 y la catepsina B en condiciones *in vitro* que mimetizan la hipoglucemia, es decir, en condiciones de ausencia de glucosa, tensión de oxígeno y temperatura constantes. Las proteasas son ejecutoras de la muerte celular y su activación diferencial conduce a un fenotipo de muerte determinado. La activación de proteasas dependientes de calcio como las calpaínas, se asocia con la necrosis, la activación de caspasas con la apoptosis y la activación de las catepsinas lisosomales con la autofagia (Green, 1998; Ohno *et al.* 1984; Uchiyama, 2001). A través de ensayos de inmunoblot se analizó el corte de la espectrina, que es sustrato de la calpaína y de la caspasa-3, produciendo fragmentos de distinto peso molecular por la acción de ambas proteasas. Por ensayos espectrofluorométricos se analizó la actividad de caspasa-3 y de catepsina B en homogenados de neuronas cultivadas.

Las células a la edad de 10 DIV se incubaron en ausencia de glucosa, donde se puede observar que la sobrevivencia disminuye de manera dependiente del tiempo de privación de glucosa, es decir, a tiempos más largos en ausencia de glucosa, mayor es el daño que conduce a la muerte neuronal. Este daño es prevenido eficientemente por el MK-801, el cual es un antagonista de los receptores a glutamato de tipo NMDA, lo que sugiere que la muerte inducida en estas condiciones depende de la liberación de glutamato y

de la activación de dichos receptores, proceso que se conoce como excitotoxicidad.

La calpaína se activa a partir de una hora de ausencia de glucosa y se incrementa a las dos horas, manteniéndose activa incluso después del estímulo, ya que podemos ver claramente el fragmento de 145/150 kDa producto del corte de la espectrina por dicha proteasa, mediante la técnica de western blot.

Adicionalmente se realizó un ensayo de dos horas de privación de glucosa utilizando distintos fármacos para ver su efecto sobre la muerte neuronal. En estas condiciones se evaluó tanto la viabilidad celular como la actividad de la calpaína. La muerte es prevenida por completo únicamente si se incubaba a las neuronas en presencia de MK-801, mientras que es parcialmente prevenida a una concentración de MDL-28170 de 100 μ M como se puede ver en la figura 3, del mismo modo logramos rescatar a las células si incubamos al mismo tiempo al MDL (50 μ M) con EGTA (1 mM). Al incubarse por separado dichos fármacos no protegen a las neuronas de la muerte.

Los resultados sugieren que no es suficiente quelar el calcio extracelular para prevenir la muerte neuronal, sin embargo el EGTA sí inhibe completamente la actividad de la calpaína, ya que por medio de western blot no logramos ver los fragmentos de la espectrina. Posiblemente la muerte no se previene porque ocurren otros procesos dependientes de calcio activados por su liberación, ya sea del retículo endoplásmico o de la mitocondria, además porque pueden ocurrir otros procesos independientes de calcio. Por otro lado el MDL-28170 a 50 μ M no previno la muerte neuronal, mientras que éste mismo fármaco a mayor concentración (100 μ M) sí tuvo un efecto protector. De

acuerdo a los resultados de actividad de calpaína medida por inmunoblot, el MDL-28170 inhibe completamente la actividad de la enzima tanto a 50 μM como a 100 μM cuando exponemos las células a un medio libre de glucosa durante dos horas. Sin embargo, la viabilidad celular aumentó hasta 50%, únicamente con la concentración más alta del MDL-28170. Estos resultados sugieren que posiblemente la concentración de 50 μM , el MDL-28170 es capaz de mantener inhibida a la calpaína durante un tiempo corto y probablemente a tiempos más largos se restaure la actividad de la enzima produciendo daño. Es probable que la actividad de la calpaína se mantenga inhibida por más tiempo cuando se usa la concentración más alta de MDL-28170 y a esto se deba su efecto protector. Sería necesario monitorear la fragmentación de la espectrina por tiempos más largos en presencia y ausencia de MDL-28170 para corroborar esta hipótesis.

Más aún, si incubamos MDL (50 μM) con EGTA (1 mM) al mismo tiempo, la viabilidad neuronal aumenta hasta 50%, esto se debe posiblemente a que la calpaína no es el único componente que participa en la muerte inducida por la privación de glucosa, y otros procesos dependientes de calcio también tienen un papel. Si estos fármacos son incubados por separado a dichas concentraciones, no se protege a las neuronas de la muerte, lo que sugiere que es necesario abatir la actividad de la calpaína inhibiendo el aumento del calcio extracelular con un quelante y directamente a la enzima con un inhibidor. El QVDOPH, inhibidor general de caspasas, no previene la muerte neuronal en las presentes condiciones experimentales, probablemente debido a que las caspasas no se activan, ya que la muerte apoptótica es un proceso que requiere de ATP para llevarse a cabo y dicho recurso energético disminuye

drásticamente en ausencia de glucosa a partir de los primeros 15 minutos (Páramo *et al.* 2010). El NBQX es un inhibidor de los receptores a glutamato de tipo AMPA y en este modelo la inhibición de dichos receptores no previene la muerte neuronal en ausencia de glucosa usando las células a la edad de 10 DIV, lo que sugiere una participación más importante de los receptores NMDA. En conjunto, estos resultados indican que tanto el calcio como la calpaína son componentes importantes que participan en la muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa, ya que el calcio que entra a través de los receptores NMDA es capaz de activar a la calpaína y posiblemente a otras proteasas dependientes de calcio.

En el ensayo de western blot para evaluar la actividad de la calpaína encontramos que el MDL-28170 (50 μ M) inhibe por completo su activación ya que previene el corte de la espectrina, lo mismo sucede si se incubaba a las células con EGTA (1 mM) y MK-801 (10 μ M). Sin embargo, el MDL y el EGTA no protegen a las neuronas de la muerte a concentraciones en las que sí se previene el corte de la espectrina, lo cual sugiere que otras proteasas o procesos independientes de calcio, además de la calpaína, pueden estar participando. El QVDOPH no previene el corte de la espectrina en estas condiciones experimentales. Los resultados sugieren que la calpaína no está involucrada en la activación de las caspasas.

La muerte celular inducida por ausencia de glucosa en los cultivos mantenidos durante 10 días *in vitro* (DIV) es muy severa y se encontró un efecto protector muy pobre con los fármacos utilizados en los experimentos anteriores, por lo tanto se realizaron experimentos con células más jóvenes, encontrando lo siguiente: a los 8 DIV ni el CA-074 ni la pepstatina A,

inhibidores de catepsinas B y D, respectivamente, lograron rescatar a las neuronas de la muerte neuronal, esto puede deberse a que las catepsinas y los procesos autofágicos se activan durante la ausencia de nutrientes y dichas proteasas son necesarias para proteolisar proteínas (entre otros substratos) y liberar aminoácidos, generando moléculas que alimenten el ciclo de Krebs, produciendo energía necesaria para promover la sobrevivencia. Es posible que en nuestras condiciones de ausencia de glucosa las células estuvieran utilizando el proceso autofágico como un mecanismo de sobrevivencia y no de muerte, ya que al incubar las neuronas con el 3-MA, un inhibidor de la autofagia, no logramos rescatar a las neuronas de la muerte inducida por la privación de glucosa.

Por otro lado, al incubarse el NBQX en ausencia de glucosa, podemos reducir el porcentaje de muerte, del mismo modo podemos ver el efecto protector si se incuba al EGTA en ausencia de glucosa. En estudios realizados con cultivos a mayor edad se ha encontrado que éstos son más susceptibles a sufrir daño debido al glutamato y a los eventos excitotóxicos desencadenados por la activación de los receptores NMDA y la subsecuente entrada de calcio a través de ellos (Choi, 1988). Probablemente a esto se deba la diferencia en la protección por el NBQX y el EGTA en los cultivos más jóvenes (8 DIV).

Posteriormente se realizó un curso temporal para evaluar la actividad de la caspasa-3, no encontramos cambios significativos en la activación de la proteasa a ningún tiempo de privación de glucosa. Aunque el efecto no es estadísticamente significativo, los resultados muestran una ligera disminución después de las dos horas privación de glucosa posiblemente debido al agotamiento de los niveles de ATP (Páramo *et al.* 2010). Por otra parte, esta

pequeña disminución posiblemente se deba al corte de la caspasa-3 por la calpaína activa, ya que ésta es su sustrato (Chua *et al.* 2000) y se encuentra activada a las dos horas de ausencia de glucosa. Además, encontramos que tanto el EGTA como el MDL incubados por separado no promovieron cambios significativos en la actividad de la caspasa-3, mientras que al incubarse juntos tienden a incrementarla y este incremento es significativo con respecto al control intacto y con respecto a las 2 horas de privación de glucosa. Este fenómeno es posible ya que si se inhibe a la calpaína y además se quela el calcio extracelular que pudiera entrar y activarla, podemos prevenir la proteólisis de la caspasa-3 por la calpaína y esto a su vez, se traduce en un incremento en la actividad de dicha caspasa.

Finalmente, en los ensayos para evaluar la actividad de la catepsina B, encontramos una disminución de la actividad dependiente del tiempo de privación de glucosa, siendo significativo el resultado a partir de las 2 horas en ausencia de glucosa con respecto al control intacto. Una explicación a esto es que dicha proteasa puede liberarse del lisosoma una vez que éste se rompe ante un estímulo como el de ausencia de glucosa. En el citosol, la catepsina B podría ser inactivada por otra proteasa e incluso perder su conformación cuaternaria debido al pH fisiológico del citosol, lo cual estaría atenuando la actividad de la proteasa (Turk *et al.* 1995; Turk y Stoka, 2007).

12. CONCLUSIONES

En este modelo experimental, la muerte inducida por la ausencia de glucosa depende de la activación de los receptores NMDA y por lo tanto es excitotóxica.

El calcio y la calpaína son los componentes principales que participan en la muerte inducida por la ausencia de glucosa en las presentes condiciones experimentales. El calcio entra a través de los receptores NMDA y es capaz de activar a la calpaína y a otros procesos dependientes de este ión.

Ni la caspasa-3 ni la catepsina B participan en la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa por lo que podemos concluir que el principal mediador de la muerte neuronal es la calpaína y en estas condiciones la muerte sería fundamentalmente necrótica.

BIBLIOGRAFÍA

Agardh CD, Folbergrova J, Siesjo BK. 1978. Cerebral metabolic effects in profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *J. Neurochem.* 31: 1135-1142.

Attwell D and Laughlin SB. 2001. An energy budget for signaling in the gray matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 1133–1145.

Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjo B.K. 1984. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol.* 64: 177-191.

Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. 1985. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol.* 67: 25-36.

Auer RN, Siesjo BK. 1988. Biological differences between ischemia, hypoglycemia, and epilepsy. *Ann. Neurol.* 24: 699-707.

Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C, Escartin C, Saudou, F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E. 2003. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J. Biol. Chem.* 278: 43245-43253.

Braitenberg V and Schüz A. 1998. *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity.* 2nd. Edition Springer.

Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free combination. *J. Neurosci. Res.* 35: 567-576.

Chaitanya GV and Babu PP. 2008. Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem. Res.* 3: 2178-2186.

Chan SK and Mattson MP. 1999. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.* 58: 167-190.

Choi DW. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7: 369-379.

Choi DW, Maulucci-Gedde M and Kriegstein A. 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7: 357-368.

Choi DW. 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.* 8: 185-196.

Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.

- Choi DW. 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurol.* 23: 1261-1276.
- Chua BT, Guo K and Peng L. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* 275: 5131-5135.
- Clarke PGH. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213.
- Cryer, PE. 2007. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J. Clin. Invest.* 117: 868-870.
- Del Río P, Massieu L. 2008. Mild mitochondrial inhibition in vivo enhances glutamate-induced neuronal damage through calpain but not caspase activation: role of ionotropic glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 212: 179-88.
- DeSimone R, Ajmone-Cat MA and Minghetti L. 2004. Atypical anti-inflammatory activation of microglia induced by apoptotic neurons. *Mol. Neurobiol.* 29: 197-212.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7-61.
- Dirnagl U, Iadecola C and Moskowitz M. 1999. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22: 391-397.
- Dunn WA Jr. 1990. Studies in the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110: 1923-1933.
- Ferrand-Drake M, Zhu C, Gidö G, Hansen AJ, Karlsson JO, Bahr BA, Zamzami N, Kroemer G, Chan PH, Wieloch T, Blomgren K. 2003. Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem.* 85: 1431-1442.
- Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. 2008. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr. Mol. Med.* 8: 78-91.
- Gitler D and Spira ME. 1998. Real time imaging of calcium-induced localized proteolytic activity after axotomy and its relation to growth cone formation. *Neuron* 20: 1123-1135.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731-801.
- Green DR and Kroemer G. 1998. The executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8: 267-271.

- Green DR.** 1998. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695-698.
- Green DR and Reed JC.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Green DR and Kroemer G.** 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626–629.
- Hassel B and Dingledine R.** 2006. *Glutamate*. En “Basic Neurochemistry” editado por Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST y Price MD, Capítulo 15, páginas 268, 269, 275 y 276. 7ª Edición. Academic Press, New York.
- Hayashi T.** 1954. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* 3: 183-192.
- Ivanova S, Repnik U, Bojic L, Petelin A, Turk V, Turk B.** 2008. Lysosomes in apoptosis. *Methods in Enzymology* 442: 183-199.
- Jacobson MD, Weil M & Raff MC.** 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347–354.
- Kato M, Nonaka T, Maki M, Kikuchi H, Imajoh-Ohmi S.** 2000. Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J. Biochem.* 127: 297-305.
- Kawamata T, Kamada Y, Suzuki K, Kuboshima N, Akimatsu H, Ota S, Ohsumi M, Ohsumi Y.** 2005. Characterization of a novel autophagy-specific gene, ATG29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 1884–89.
- Kelekar Ameeta.** 2005. Autophagy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1066: 259–271.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257.
- Kew JNC and Kemp JA.** 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacol.* 179: 4–29.
- Klionsky DJ and Emr SD.** 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721.
- Kroemer G, Reed JC.** 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6: 513-519.
- Lee DC, Mason CW, Goodman CB, Holder MS, Kirksey OW, Womble TA, Severs WB and Palm DE.** 2007. Hydrogen peroxide induces lysosomal protease alterations in PC12 Cells. *Neurochem. Res.* 32: 1499–1510.

- Levine B and Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 115: 2679-2688.
- Li Y, Yang X, Ma C, Qiao J, Zhang C. 2008. Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neurosci. Letters* 447: 120-123.
- Lucas D y Newhouse J. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of retina. *Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 73: 205-235.
- Massieu L, Morán J, Christen Y. 2004. Effect of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Research* 1002: 76-85.
- Mattson MP and Bazan NG. 2006. *Apoptosis and necrosis*. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST y Price MD, Capítulo 15, página 603. 7ª Edición. Academic Press, New York.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16: 2794-2804.
- Mizushima N and Klionsky DJ. 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 19-40.
- Mohseni S. 2001. Hypoglycemic neuropathy. *Acta Neuropathology* 102: 413-42.
- Monk CS, Webb SJ, Nelson C. 2001. Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change. *Dev. Neuropsychol.* 19: 211-236.
- Mortimore GE, Miotto G, Venerando R, Kadowaki M. 1996. Autophagy. *Subcell. Biochem.* 27: 93-135.
- Nagata S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33: 29-55.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103.
- Nelson DL and Cox MM. 2005. Lehninger principles of biochemistry. 4th. Edition. Worth publishers, New York.
- Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, Kominami E, Uchiyama Y. 1995. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 15: 1001-11.

Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisarigi M, Suzuki K. 1984. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 312: 566-570.

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

Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez AM, Jimenez N, Hernández-Cruz A and Massieu L. 2010. Pathways involved in the generation of reactive oxygen species and nitrogen species during glucose deprivation and its role of death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167: 1057-1069.

Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. 1987. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37: 1281-1286.

Raine CS. 2006. *Neurocellular anatomy*. En "Basic Neurochemistry" editado por Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST y Price MD, Capítulo 1, páginas 9 y 11. 7ª Edición. Academic Press, New York.

Reme CE, Wolfrum U, Imsand C, Hafezi F, Williams TP. 1999. Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 2398-2404.

Salvesen GS, Duckett CS. 2002. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 401-410.

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

Seeburg PH, Hartner J. 2003. Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 279-283.

Seglen, PO and Bohley P. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48: 158-172.

Shen, J., Petersen, K. F., Behar, K. L. 1999. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8235-8240.

Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green DR. Connected to death: The (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005: 310: 66-67.

Sugawara T, Chan PH. 2003. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid. Redox Sign.* 15(5): 597-607.

Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. 2007. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 117: 910-918.

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

Turk B, Bieth JG, Bjork I, Dolec I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stoka V and Turk D. 1995. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376: 225-230.

Turk B and Stoka V. 2007. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Letters* 581: 2761-2767.

Uchiyama Yasuo. 2001. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.* 64: 233-246.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.

Wang KKW. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23: 20-26.

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

Wieloch T. 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230: 681-683.

Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T, Kominami E. 2003. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13: 791-800.

Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol. Biol. Cell* 17: 5094-5104.

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