



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto protector del D-B-Hidroxibutirato en contra de la
muerte neuronal excitotóxica y su relación con la
autofagia.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

(SUSANA FLORES YAÑEZ)

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
(2017)**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



1. Datos del alumno

Flores
Yañez
Susana
55 66 2257
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
304023931

2. Datos del tutor

Dra.
María de Lourdes
Massieu
Trigo

3. Datos del sinodal 1 (Presidente)

Dra.
Ana Brígida Clorinda
Arias
Álvarez

4. Datos del sinodal 2 (Secretario)

Dra.
María de Lourdes
Massieu
Trigo

5. Datos del sinodal 3 (Vocal)

Dra.
María Sandra
Cabrera
Benítez

6. Datos del sinodal 4 (Suplente 1)

Dra.
María Luisa
Escobar
Sánchez

7. Datos del sinodal 5 (Suplente 2)

Biol.
Teresa
Montiel
Montes

8. Datos del trabajo escrito

Efecto protector del D- β -
Hidroxi butirato en contra de la muerte
neuronal excitotóxica y su relación
con la Autofagia.
72 p.
2017

Efecto protector del D- β -Hidroxi butirato en contra de la muerte neuronal excitotóxica y su relación con la autofagia.

Reconocimientos.

Esta tesis de Licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo en el laboratorio AL-302, del Departamento de Neuropatología Molecular en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la colaboración y asesoría técnica de la Bióloga Teresa Montiel Montes en la realización de este trabajo en todos sus procedimientos experimentales.

Se reconoce la colaboración del Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo en la realización de este trabajo en la obtención de ratas expuestas a un periodo de isquemia focal por la oclusión de la arteria cerebral media.

Este proyecto de investigación fue apoyado y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN205416) otorgado a Lourdes Massieu.

Índice

Índice de abreviaturas	5
Resumen	7
I Introducción.....	9
1. Accidentes cerebrovasculares: isquemia cerebral	9
2. Mecanismos implicados en la muerte celular isquémica	11
2.1 Falla energética	11
2.2 Excitotoxicidad	14
2.3 Estrés oxidativo	17
2.4 Respuesta inflamatoria.....	19
3. Autofagia	23
3.1 Definición y tipos de autofagia (macroautofagia).....	23
3.2 Papel de la Autofagia en la isquemia cerebral	26
4. Cuerpos cetónicos.....	30
4.1 Síntesis y función de los cuerpos cetónicos	30
4.2 Papel de los cuerpos cetónicos en el daño neuronal	32
II. Planteamiento del problema.....	35
Hipótesis.....	36
Objetivos	36
III. Métodos.....	37
1. Animales.....	37
2. Modelo de isquemia cerebral focal transitoria (t-MCAO)	37
3. Supervivencia.....	39
4. Prueba motora: ensayo de la viga	39
6. Histología	41
6.1. Tinción de Fluoro-Jade B (FJ-B)	42
6.2. Conteo de células FJ-B positivas	42
6.3. Tinción de Violeta de Cresilo	43
7. Western blot	44
IV. Resultados.....	46
1.- Porcentaje de supervivencia post t-MCAO.....	46
2. Efectos sobre la actividad motora después de t-MCAO	47
2. Daño celular inducido por la t-MCAO	48

3.1 Detección de células FJ-B positivas	48
3.2 Medición del volumen de lesión	50
4. Daño celular inducido por la inyección de NMDA.....	53
5. Inducción del proceso autofágico por la administración de NMDA.....	55
6. Efecto del BHB sobre el proceso autofágico	59
7. Inducción de la autofagia por la t-MCAO y efecto del BHB	62
V. Discusión.....	63
VI. Conclusiones	67
Bibliografía.....	67

Índice de abreviaturas			
Acetil coenzima A	(acetil-CoA)	Intraperitoneal	(i.p.)
Acetoacetato	(AcAc)	Intravenosa	(i.v.)

Accidentes cerebrovasculares	(ACV)	N-metil-D-aspartato	(NMDA)
Ácido kaínico	(KA)	Nicotinamida adenina dinucleótido	(NADH)
Activador del plasminógeno tisular	(t-PA)	Oclusión de la arteria cerebral media transitoria	(t-MCAO)
Arteria cerebral media	(MCA)	Privación de glucosa y oxígeno	(OGD)
Barrera hematoencefálica	(BBB)	Proteína cinasa activada por AMP	(AMPK)
Beclina-1	(BECN1)	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3	(LC3)
Cloroquina	(CQ)	Rapamicina	(Rap)
D-β-hidroxibutirato	(BHB)	Retículo endoplásmico	(RE)
Especies reactivas de oxígeno	(ROS)	Salubrinal	(Sal)
Flujo sanguíneo cerebral	(CBF)	Trifosfato de adenosina	(ATP)
Fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III	(PtdIns3KII)	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato	(AMPA)
Intracerebral	(i.c.)		
Intracerebroventricular	(i.c.v.)		

Resumen

La autofagia, es un proceso de degradación dependiente del lisosoma que es inducida durante la isquemia como una respuesta asociada a la sobrevivencia neuronal. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que el proceso autofágico en esta condición se encuentra alterado lo cual resulta en la muerte celular. Por otra parte, se conoce que el cuerpo cetónico D- β -Hidroxiacetato (BHB) tiene un efecto neuroprotector en contra del daño isquémico, aunque los mecanismos implicados no son del todo claros. En un estudio reciente demostramos que el BHB aumenta la viabilidad de neuronas corticales en cultivo después de ser expuestas a la privación y reintroducción de glucosa. Se demostró que este compuesto es capaz de incrementar los niveles de ATP y prevenir la acumulación de autofagosomas, estimulando el flujo autofágico. En base a estos resultados hipotetizamos que el efecto protector del BHB en contra del daño isquémico podría explicarse en parte por la estimulación del flujo autofágico, evitando la acumulación de autofagosomas. Para demostrar dicha hipótesis, primero se puso a prueba el efecto protector del BHB en el modelo de isquemia focal inducida por la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO). Simultáneamente se implementó un modelo de excitotoxicidad inducida por la administración de N-metil-D-aspartato (NMDA) en el estriado de la rata, con el objetivo de simular los procesos moleculares que ocurren durante la isquemia y llevan a la muerte neuronal. En ambos modelos se investigó el efecto del BHB sobre tres marcadores moleculares del proceso autofágico: la Beclina-1 (BECN1), un marcador de iniciación, la conversión de la proteína LC3-I a LC3-II, un marcador de formación y maduración de los autofagosomas y p62/SQSTM1, un marcador del flujo autofágico.

Demostramos que el tratamiento con el cuerpo cetónico BHB, aumenta el porcentaje de sobrevivencia de los animales y mejora el déficit motor inducido por la t-MCAO, además de ser capaz de disminuir el volumen de lesión y el número de células en degeneración en la corteza cerebral (zona de penumbra isquémica) y en la zona de la lesión en los animales inyectados con NMDA. Por otra parte, en el modelo de administración de NMDA los resultados sugieren que el flujo autofágico se encuentra bloqueado a las 3 y 6 h después de la inyección de NMDA, ya que aumentan los niveles de LC3-II, pero no disminuyen los de p62/SQSTM1. La

administración de BHB disminuye los niveles de LC3-II, sugiriendo menos formación o acumulación de autofagosomas, sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de p62/SQSTM1 ni tampoco en los de BECN1. En el modelo de la t-MCAO, se observó un aumento en la conversión de LC3-I a LC3-II 3h después de la inducción de la isquemia cerebral, la cual fue ligeramente menor en las ratas tratadas con BHB. Los niveles de p62/SQSTM1 disminuyeron a las 3 h después de la isquemia y en las ratas tratadas con BHB, esta disminución fue ligeramente mayor, sugiriendo la estimulación del flujo autofágico. Sin embargo, estos resultados no alcanzaron significancia estadística posiblemente debido al número reducido de la muestra. En conclusión, los datos sugieren que el BHB previene la acumulación de autofagosomas en los dos modelos in vivo de daño agudo, aunque son necesarios más experimentos para corroborar si este efecto se debe a la estimulación del flujo autofágico.

I Introducción

1. Accidentes cerebrovasculares: isquemia cerebral

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) tienen una alta incidencia en todo el mundo, la cual tiende a duplicarse en cada década sucesiva en personas mayores a los 55 años, siendo más común en hombres que en mujeres, aunque en edades más avanzadas las mujeres resultan ser más susceptibles (Bramlett y Dietrich, 2004).

El informe sobre la Carga Global de Enfermedades 2010 (GBD 2010, por sus siglas en inglés: *Global Burden of Diseases*) colocó a los ACV como la segunda causa de muerte y la tercera en causar discapacidad en todo el mundo. Este estudio incluía una recopilación y análisis de la incidencia, mortalidad, prevalencia y discapacidad generada por los ACV en 21 regiones de todo el mundo incluyendo a México, en 1990, 2005 y 2010. Se estimó que, en el 2010, tuvieron lugar en todo el mundo 16.9 millones de casos nuevos, 33 millones de casos prevalentes, 5.9 millones de muertes y 102 millones de discapacitados, a causa de ACV. Al comparar dichas cifras con las reportadas en años anteriores éstas aumentaron significativamente desde 1990 en un 68%, 84%, 26% y 12%, respectivamente (Feigin *et al.*, 2014).

Según la OCDE (*Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico*) la tasa de mortalidad por ACV de México en el 2012 fue de 272.9 por cada 100.000 habitantes y actualmente es de 292 y aunque sigue siendo menor que el promedio estimado de la OCDE que es de 299, se ha encontrado un aumento significativo en muy poco tiempo (OCDE, 2014).

Existen dos categorías de ACV: La hemorrágica (que a su vez puede ser subdividida en hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral) y la isquemia cerebral, la cual puede ser global o focal y a su vez permanente o transitoria. El tipo más frecuente de ACV es la isquemia cerebral, representando el 87% de todos los casos (Doyle *et al.*, 2008). La isquemia global ocurre cuando el flujo sanguíneo cerebral (CBF) es reducido en gran parte o en todo el tejido cerebral, mientras que la isquemia focal se caracteriza por la reducción del flujo sanguíneo en regiones específicas del cerebro (Traystman, 2003). Cabe destacar que dentro de la isquemia focal se distinguen dos áreas: el núcleo isquémico y la penumbra isquémica. A los

pocos minutos de iniciada la isquemia cerebral se define el área del núcleo isquémico en donde la reducción del CBF es mayormente restringido y el daño generado es irreversible, aun cuando el flujo sanguíneo sea restaurado. Las neuronas del núcleo isquémico mueren en minutos por el déficit total bioenergético, el desbalance iónico, la excitotoxicidad y la necrosis (Doyle *et al.*, 2008; Bretón y Rodríguez, 2012). Este núcleo isquémico se encuentra rodeado del área de penumbra donde CBF es moderado y compensado con el CBF colateral, por lo que las neuronas en esta región se encuentran funcionalmente alteradas, pero metabólicamente activas, representando una oportunidad en la restauración funcional a través de terapias post-isquemia (Bretón y Rodríguez, 2012). Sin embargo, en esta área también tienen lugar mecanismos asociados con la muerte tales como: la apoptosis, la inflamación y las despolarizaciones (Doyle *et al.*, 2008). Por lo que la isquemia cerebral podría ser definida como la restricción del flujo sanguíneo al cerebro de manera focal o global, que resulta en la insuficiencia de oxígeno y glucosa necesarios para mantener la homeostasis celular.

El cerebro es muy vulnerable ante eventos isquémicos, 5 minutos de isquemia global son suficientes para generar muerte celular en regiones vulnerables tales como la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo; mientras que se necesitan entre 20 y 40 minutos para generar muerte en células del corazón o de riñón (Lee *et al.*, 2000). Esta susceptibilidad puede explicarse en parte por la presencia de un proceso excitotóxico desencadenado por la falta de oxígeno y glucosa, del cual se hablará más adelante. Además, del proceso excitotóxico, la ausencia de oxígeno y de glucosa desencadena una serie de procesos que culminan en la muerte celular tales como: falla energética, perturbación vascular, despolarización membranal, acidosis, necrosis, apoptosis, inflamación, estrés oxidante, desequilibrio iónico y autofagia (Figura 1). La extensión del daño puede variar dependiendo del tiempo de isquemia, la región cerebral y si existe o no reperusión.

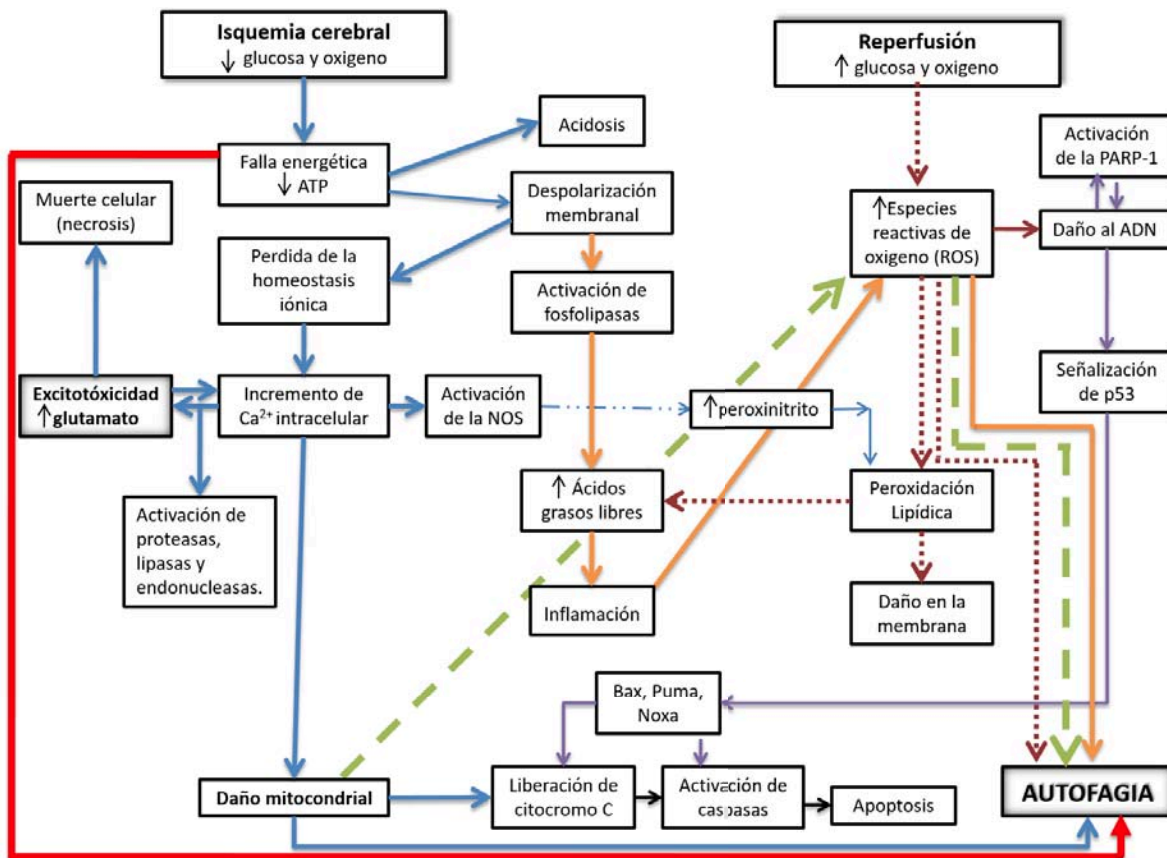


Figura 1.- Cascada de procesos moleculares desencadenados por isquemia cerebral transitoria (Adaptado de Chomova y Zitnanova, 2016).

2. Mecanismos implicados en la muerte celular isquémica

2.1 Falla energética

El cerebro humano adulto utiliza principalmente a la glucosa como sustrato energético y debido a que sus reservas de glucógeno son limitadas, este órgano es dependiente de la glucosa que llega a través del flujo sanguíneo. El cerebro humano consume el 25% de la glucosa total de la dieta y el 20% del oxígeno total a pesar de constituir sólo el 2% del peso corporal (Amilpas *et al.*, 2015).

Durante la isquemia las células cerebrales impulsan su actividad glucolítica consumiendo rápidamente sus reservas de glucosa (glucógeno). Sin embargo, dada la baja cantidad de glucógeno en las neuronas, las reservas de glucosa se agotan rápidamente (Haces y Massieu 2005). Además, en condiciones de isquemia muchas de las enzimas implicadas en procesos metabólicos están afectadas, por ejemplo,

se sabe que el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) es altamente susceptible a estados de hipoxia o a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Takahashi *et al.*, 2014), y dado que este complejo es necesario para la formación del grupo acetilo para generar acetil-CoA, la producción de ATP (trifosfato de adenosina) vía ciclo de Krebs, se compromete. Por otra parte, los transportadores electrónicos no pueden oxidarse por ausencia del aceptor final el O₂, comprometiendo la glucólisis que requiere de NAD⁺ libre. Por esta razón la célula transfiere los electrones de NADH al piruvato (que no puede ser oxidado por PDH) formando lactato (Nelson y Cox, 2007). Esto podría explicar en parte la acumulación y potenciación de la producción de lactato que generará posteriormente una lactoacidosis durante un proceso isquémico.

Durante el periodo isquémico la célula también hace uso de aminoácidos que pueden incorporarse al ciclo de Krebs (los cuales están limitados) o bien utilizar cuerpos cetónicos endógenos o exógenos como sustratos energéticos alternativos (Figura 2). Aunque la fuente principal de cuerpos cetónicos son las células del hígado, de donde son exportados al torrente sanguíneo mediante los transportadores de monocarboxilatos hasta las células cerebrales. Estudios *in vitro* han demostrado que las células astrogliales son capaces de sintetizar cuerpos cetónicos a partir de la oxidación de los ácidos grasos en condiciones fisiológicas, los cuales podrían ayudar a soportar el metabolismo energético neuronal; sin embargo, esta aportación es mínima debido a la baja tasa de oxidación de ácidos grasos en astrocitos (Blázquez *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2014). Un estudio reciente *in vitro* demostró que la producción de cuerpos cetónicos en astrocitos y neuronas se incrementa en condiciones de hipoxia y que es dependiente de la acetil-CoA derivada de la β -Oxidación en los astrocitos, mientras que en las neuronas es independiente, aunque la fuente de acetil-CoA utilizada por las neuronas se desconoce (Takahashi *et al.*, 2014).

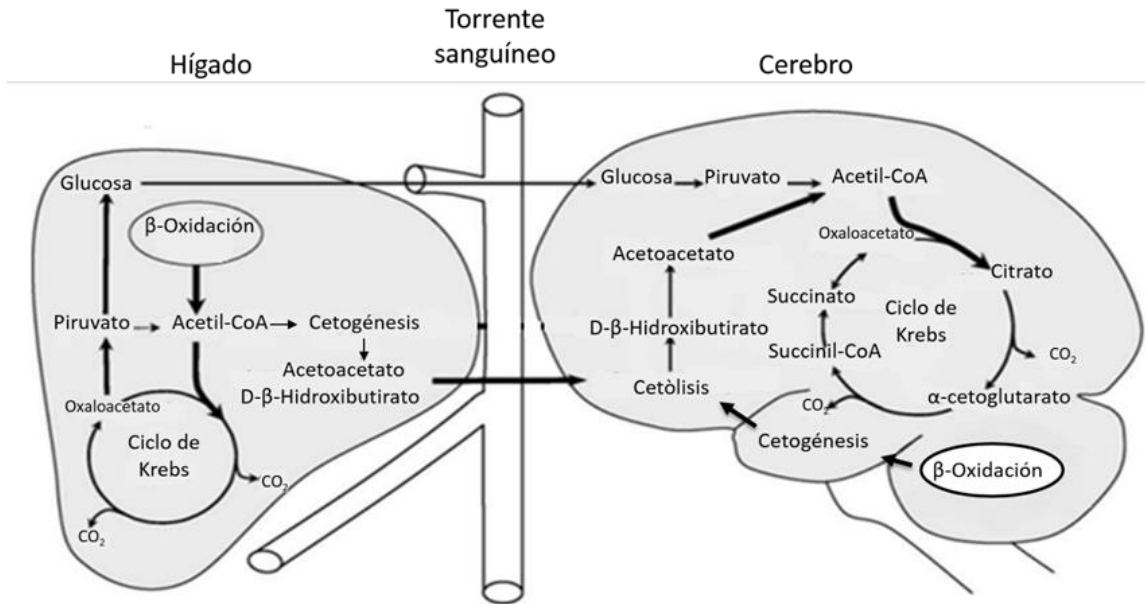


Figura 2.- Representación esquemática del consumo cerebral de cuerpos cetónicos como substratos energéticos alternativos a la glucosa en condiciones de isquemia cerebral (Adaptado de Melo *et al.*, 2006).

Gran parte de la energía en las neuronas se utiliza para mantener la excitabilidad de las membranas celulares, a través de la actividad de la bomba sodio-potasio (Na^+/K^+), la cual se encarga de mantener los gradientes iónicos necesarios para que se de un potencial de acción, es decir, mantiene concentraciones intracelulares altas de K^+ y bajas de Na^+ . Para conservar este gradiente la bomba consume alrededor del 70% de la energía suministrada al cerebro (Doyle *et al.*, 2008; Amilpas *et al.*, 2015). En condiciones isquémicas como ya se había mencionado, se genera una falla energética y el ATP se consume en alrededor de 2 minutos, interrumpiendo la función de la bomba sodio-potasio (Na^+/K^+) provocando la despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización conducirá a la salida de K^+ y entrada de Na^+ y Ca^{2+} . La elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular darán lugar a la activación de proteasas, endonucleasas, fosfolipasas, caspasas, lipasas, DNAsas, de la óxido nítrico sintasa (NOS) y la calpaína, así como la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) conduciendo a la apoptosis y necrosis. Además de estimular la liberación exacerbada de aminoácidos generando muerte neuronal excitotóxica, la

cual a su vez induce más influjo de calcio a las células (Haces y Massieu, 2005; Doyle *et al.*, 2008).

2.2 Excitotoxicidad

La capacidad de los aminoácidos excitadores, de causar neurodegeneración por la estimulación prolongada de sus receptores postsinápticos se denominó excitotoxicidad, término acuñado por primera vez por Olney en 1969 (Purves., 2007). Uno de los aminoácidos excitadores más importantes del cerebro es el glutamato, se sabe que el 80% de las neuronas excitadoras del sistema nervioso central (SNC) son glutamatérgicas (Sattler y Tymianski, 2001; Bélanger *et al.*, 2011). Este puede ser sintetizado por las neuronas a partir de precursores locales como la glutamina o bien por la transaminación del α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs (Purves., 2007). Una vez sintetizado, el glutamato es empaquetado en vesículas y liberado a la hendidura sináptica por exocitosis a través de la fusión vesicular dependiente de Ca^{2+} (Haces y Massieu, 2005). Ya en la hendidura sináptica, este se une a dos tipos de receptores: los ionotrópicos que son canales iónicos y los receptores metabotrópicos que están acoplados a segundos mensajeros (Figura 3).

En condiciones normales el glutamato o sus agonistas como el aspartato son eliminados de la hendidura sináptica por los transportadores de aminoácidos excitadores, EAAT, por sus siglas en inglés (*excitatory amino acid transporters*), los cuales son dependientes del gradiente de sodio. En la isquemia, el gradiente de sodio se altera y los EAAT realizan su función de manera reversa permitiendo la liberación excesiva de glutamato al espacio extracelular conduciendo a un proceso excitotóxico (Siegel *et al.*, 2005; Camacho y Massieu, 2006; Estrada *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2008).

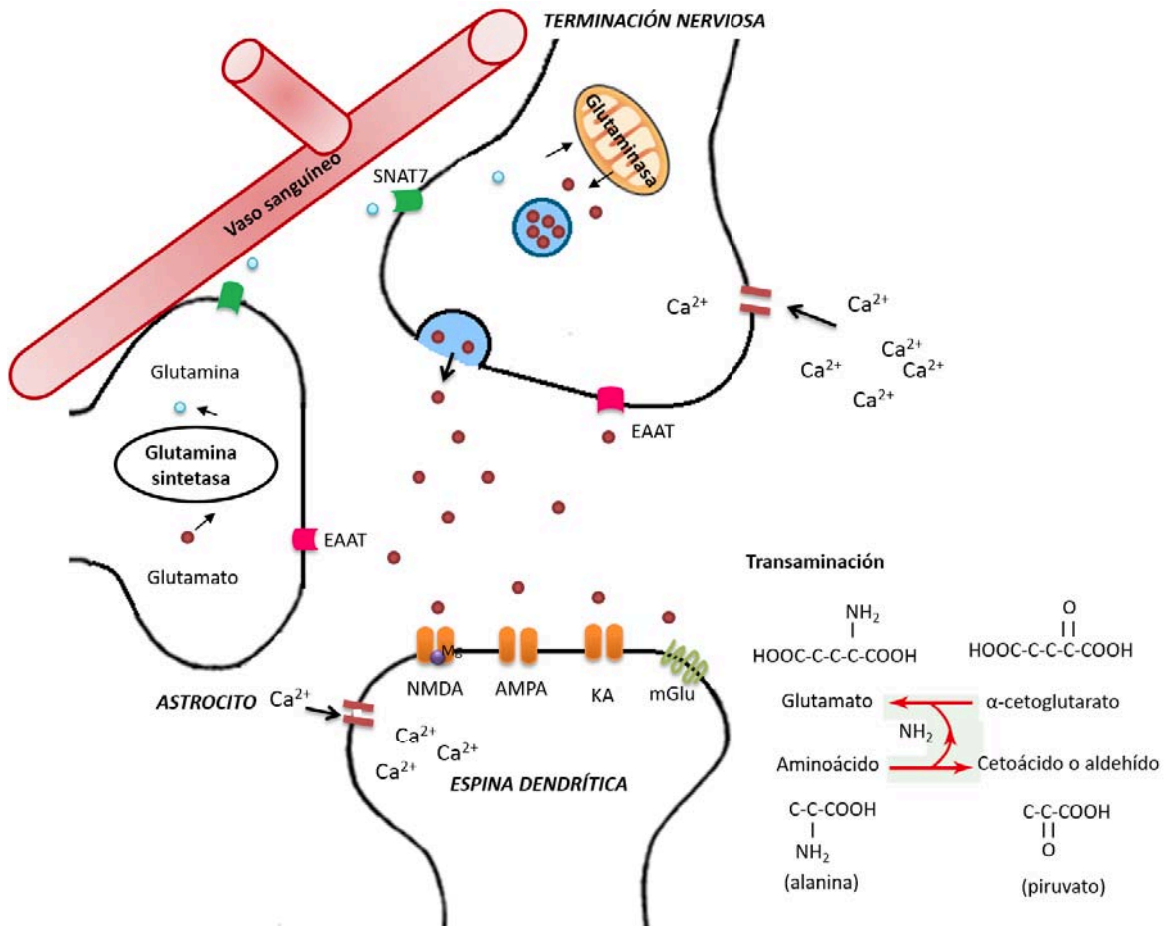


Figura 3.- Síntesis, liberación y recapturación del glutamato (Adaptado de Siegel *et al.*, 2005).

El daño excitotóxico tiene efectos principalmente sobre el núcleo isquémico; sin embargo, en la penumbra isquémica también, debido a que la liberación de aminoácidos excitadores por las neuronas dañadas del núcleo isquémico, generan pequeñas despolarizaciones consecutivas que producen un aumento de Ca^{2+} intracelular conduciendo de igual manera al daño neuronal (Doyle *et al.*, 2008) in vivo se han demostrado que éstas despolarizaciones tienen lugar principalmente en la corteza cerebral en modelos murinos, así como en primates no humanos. Además, el número de despolarizaciones en la penumbra está proporcionalmente relacionado con el tamaño del infarto isquémico (Strong *et al.*, 2000).

Dentro de los receptores ionotrópicos están los receptores NMDA, AMPA y Kainato (KA). Sus nombres son derivados de los agonistas que los activan: el N-

metil-D-aspartato, el α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato y el ácido kaínico respectivamente. Estos a su vez están clasificados en tipo NMDA y no-NMDA (AMPA y KA). Los primeros son permeables a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ mientras que los receptores no-NMDA son permeables principalmente a Na^+ . El daño excitotóxico generado por el glutamato ocurre principalmente a través de la activación de sus receptores tipo NMDA por ser altamente permeables a Ca^{2+} , ion que río abajo activa varios procesos que conducen a la muerte neuronal (Haces y Massieu, 2005; Doyle *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2009).

La mayoría de los receptores NMDA son heterotetrámeros, conformados por la combinación de la subunidad GluN1 con alguna de las subunidades GluN2 (A-C) o GluN3 (A-B). Además, los receptores NMDA poseen sitios de reconocimiento para dos diferentes agonistas (glutamato y glicina) y un sitio regulador por poliaminas, los cuales promueven la activación del receptor mientras que sus sitios de reconocimiento para Mg^{2+} , Zn^{2+} y H^+ actúan para inhibir el influjo iónico a través del receptor (Siegel *et al.*, 2005).

La relevancia de este receptor en el daño isquémico cerebral ha sido demostrada en varios estudios. Yu y colaboradores en el 2015 utilizaron el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 30 min en ratas Sprague Dawley, y observaron una reducción significativa del volumen del infarto y el daño motor y un aumento en la sobrevivencia de ratas tratadas con BQ-869 ($3\mu\text{M}$), un antagonista de los receptores NMDA. Otro grupo de trabajo dirigido por Jiang, también observó una reducción en el volumen de lesión inducido por hipoxia isquémica neonatal al inhibir a las cinasas de la familia Src (SFKs), las cuales regulan positivamente la activación de los receptores NMDA al fosforilar las subunidades GluN2A y GluN2B (Jian *et al.*, 2008).

Por su parte, los receptores AMPA que también son tetrámeros conformados por diferentes subunidades y son permeables principalmente a Na^+ , ya que la permeabilidad a Ca^{2+} se encuentra regulada negativamente por la subunidad GLUA2, presente en la mayoría de los receptores AMPA. Cuando esta subunidad no está presente los receptores son permeables a calcio. El RNA de esta subunidad puede estar editado o no editado. La mayoría de los receptores en el cerebro están

editados y contienen una arginina en el sitio Q/R (glutamina/ arginina) que hace que los canales sean impermeables a calcio. Cuando no está editado el RNA, la subunidad contiene una glutamina en el sitio Q/R del poro del canal y son permeables a calcio por lo que las neuronas que contienen la subunidad GluA2 no editada o cuando no la contienen son más vulnerables a la excitotoxicidad por AMPA. Peng y colaboradores en el 2006 demostraron mediante registros de patchclamp, un aumento en la permeabilidad de Ca^{2+} de los canales del receptor AMPA en la región CA1 del hipocampo a causa de una reducción en la expresión de ADAR2, una enzima nuclear encargada de editar el ARN de la subunidad GLUA2 (y por ende de producir receptores con impermeabilidad a calcio) después de la isquemia. Además, la administración de perampanel, un antagonista no competitivo del receptor AMPA, reduce la muerte celular apoptótica, la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y la baja viabilidad celular inducida por la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos de células endoteliales cerebrales (Jian *et al.*, 2016) sugiriendo un papel en el daño excitotóxico tardío de estos receptores.

2.3 Estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas por poseer un electrón desapareado en su último orbital que les obliga a donar o tomar un electrón de una molécula vecina desestabilizándola y provocando la pérdida de su función (Haces y Massieu, 2005). El alto metabolismo oxidativo cerebral provoca una elevada producción de especies reactivas del oxígeno, denominados ROS por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species) tales como: Radical anión superóxido, peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo y anión peroxinitrito. Estos son controlados en condiciones normales por enzimas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa y la catalasa, o bien por defensas antioxidantes no enzimáticas como el glutatión (GSH), el ácido úrico y vitaminas C o E, entre otros (Margaill *et al.*, 2005).

La respuesta antioxidante está regulada por el sistema Keap-Nrf2. En condiciones favorables el factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) es degradado por el proteosoma gracias a la unión del residuo de lisina ubicado en su

dominio Neh2 con el dominio BTB de su regulador Keap 1, lo que favorece su ubiquitinación por el complejo ligasa de ubiquitina permitiendo su degradación. Sin embargo, la presencia de ROS, electrófilos y óxido nítrico (NO) modifica los residuos de cisteína de Keap 1 conduciendo a su inactivación. Esto da lugar a la liberación y translocación de Nrf2 al núcleo donde induce la transcripción de numerosos genes citoprotectores mediante su heterodimerización con pequeñas proteínas Maf. Esta vía es conocida como la "vía canónica"; sin embargo, existe otra vía de inducción de la respuesta antioxidante por Nrf2 mediada por la proteína p62/SQSTM1 fosforilado, la cual compite por el sitio de unión de Nrf2 a Keap 1, inhibiendo competitivamente su interacción, lo que libera a Nrf2 permitiendo su translocación al núcleo y regulación de la transcripción de genes de proteínas antioxidantes y enzimas anti-inflamatorias (Ichimura *et al.*, 2013).

Durante la isquemia cerebral ocurre una sobreproducción de ROS que sobrepasa las defensas antioxidantes y genera estrés oxidante. En isquemia permanente, el estrés oxidante tiene lugar desde los 30 a 60 min a partir del inicio del periodo isquémico, el cual es acompañado de una reducción en los niveles de moléculas antioxidantes. Mientras que en la isquemia transitoria se ha observado que la producción de ROS es mayor durante las primeras horas de reperfusión y se mantiene incluso por días. Esta sobreproducción implica daño mitocondrial, peroxidación lipídica, la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XO), el metabolismo oxidativo del ácido araquidónico por la ciclooxigenasa 2 (COX), la infiltración de leucocitos polimorfonucleares y la activación de la NADPH oxidasa, entre otros (Margaill *et al.*, 2005).

La relevancia de estas moléculas en el daño neuronal isquémico se ha evidenciado tras la utilización de atrapadores de especies reactivas o inhibidores de la producción de radicales libres como alopurinol (inhibidor de la XO), oxipurinol (inhibidor de la XO), nimesulida (inhibidor de la COX), vitamina C, edaravone, SOD (cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno) entre otros, reduciendo el volumen de lesión desde un 16% hasta 86% (Margaill *et al.*, 2005).

2.4 Respuesta inflamatoria

Durante la isquemia y sobre todo durante la reperfusión isquémica se produce una respuesta inflamatoria la cual también contribuye a la producción de ROS. Las células inmunes generan ROS a través de varios sistemas enzimáticos (COX, NADPH, XDH/XO, mieloperoxidasa, monoamino oxidasa y la NOS). Por ejemplo, la NOS genera el anión superóxido y NO los cuales al reaccionar generan peroxinitrito, el cual es un oxidante muy tóxico (Masahito y Midori, 2015).

Por otra parte, tanto el estrés oxidante como la producción de NO conducen a la sobre activación de la poly-ADP-ribosa-polimerasa-1 (PARP-1), encargada de la reparación de las rupturas en la cadena de ADN, la cual utiliza NAD pudiendo comprometer procesos como la glicólisis anaerobia y la respiración mitocondrial, lo que contribuye también al déficit de ATP y a la muerte neuronal (Doyle *et al.*, 2008). El estrés también induce la activación de metaloproteasas de matriz (MMPs), las cuales degradan la lámina basal y colágeno comprometiendo la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) que contribuyen al aumento de la permeabilidad vascular generando una hemorragia parenquimatosa y la infiltración de neutrófilos al cerebro y linfocitos, generando una respuesta celular inflamatoria. Esta respuesta, puede tener un papel tanto en la limitación como en la potenciación del daño neuronal isquémico (Masahito y Midori, 2015; Doyle *et al.*, 2008).

El reclutamiento de los leucocitos también puede ser iniciado por la liberación de citocinas y quimiocinas por la microglía activada a causa de las ROS y por neuronas, astrocitos y células endoteliales dañadas, estos mediadores conducirán a la inducción de las moléculas de adhesión, las cuales permiten la laminación, adhesión y migración transendotelial de los leucocitos. Dichas moléculas se dividen en tres clases 1) selectinas: P-selectina E-selectina y L-selectina, 2) la superfamilia de inmunoglobulinas: CAM-1,2 y VCAM-1) y 3) Las integrinas (CD11 a-c) (Masahito y Midori, 2015).

Se ha observado que los neutrófilos son los primeros en aparecer, estos se adhieren alrededor de la pared del vaso endotelial aproximadamente a los 30 minutos después de iniciada la privación del CBF. Posteriormente estos migran hacia el parénquima cerebral gracias a la disrupción de la BBB, una vez dentro

liberan una serie de mediadores inflamatorios como las citosinas, ROS y enzimas proteolíticas que resultan tóxicas para el tejido cerebral. La infiltración cerebral de neutrófilos se ha detectado en las primeras 4 y 6 horas de la isquemia transitoria y a las 12 horas de la isquemia permanente (Wang *et al.*, 2007).

También se ha detectado la infiltración de linfocitos, pero a tiempos más tardíos alrededor de 3 y 6 días después del accidente cerebrovascular. Estos al igual que los neutrófilos producen citocinas proinflamatorias y sustancias citotóxicas que conducen al daño neuronal. Estudios sugieren que los linfocitos B juegan un papel preponderante en la respuesta inflamatoria de los ACV, mientras que los linfocitos T en la isquemia cerebral transitoria, aunque aún no se conocen las causas (Masahito y Midori, 2015). El recubrimiento y la infiltración de estos leucocitos también puede producir una obstrucción de la microcirculación generando una restauración incompleta o nula del flujo sanguíneo durante la reperfusión, fenómeno denominado como el no reflujo isquémico conduciendo a un adicional daño isquémico (Doyle *et al.*, 2008).

Las citocinas y quimiocinas liberadas también van a contribuir al daño cerebral isquémico. Dentro de la variedad de citocinas liberadas tenemos a la interleucina 1- α (IL1 - α), interleucina 1- β (IL1- β), interleucina 6 (IL6), interleucina 10 (IL-10) TNF- α y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). La isoforma IL1- β ha demostrado tener un alto potencial en el daño isquémico por inducir fiebre, liberación de ácido araquidónico, exacerbación del daño excitotóxico mediado por NMDA, y la estimulación de la síntesis de NO, sin embargo, el mecanismo de acción aún no está claro. El resto de las citocinas si bien contribuyen al daño por inducir a las moléculas de adhesión y permitir la entrada de leucocitos también pueden tener un efecto protector, por ejemplo, IL6 tiene la capacidad de inducir al antagonista del receptor IL1 limitando así el daño neuronal (Relton *et al.*, 1996).

Por otra parte, la respuesta inmune implica también la participación de la microglia y los astrocitos. La microglia constituye del 5 al 10% de la población de células cerebrales y es encargada de la respuesta fagocítica cerebral, para la cual necesita de una transformación morfológica de un estado ramificado latente a uno ameboideo activo. Esta se encuentra activa tras un periodo isquémico originalmente

como una línea de defensa para la eliminación de restos necróticos u otras sustancias con potencial dañino. Sin embargo, la sobreactivación de la microglía conduce al daño neuronal por la liberación de moléculas que pueden resultar tóxicas para el tejido cerebral; las citocinas proinflamatorias. Aunque no está completamente claro el papel que tiene la microglía en el daño cerebral, se ha observado que la reducción en su activación en isquemia cerebral conduce a la reducción del infarto cerebral; sin embargo, el bloqueo total de su actividad conduce a un aumento en el daño cerebral isquémico sugiriendo un papel dual (Masahito y Midori, 2015; Doyle *et al.*, 2008).

Los astrocitos también pueden contribuir al daño por la liberación de moléculas inflamatorias e inducir a la NOS. Su actividad se ha observado tempranamente entre las 4 y 24 horas después del periodo isquémico alcanzado un pico a los 4 días el cual persiste incluso 28 días después. Otra función astrogliar durante la isquemia cerebral es la cicatrización glial la cual es favorecida por la fagocitosis de desechos y la liberación de citocinas. Dicha cicatrización puede ser tanto benéfica como perjudicial ya que forma una barrera que evita el crecimiento interno axonal y la reinnervación impidiendo así la recuperación, pero a su vez al aislar el tejido dañado del tejido viable previene daño adicional al cerebro circundante (Masahito y Midori, 2015; Doyle *et al.*, 2008).

2.5 Necrosis y Apoptosis

Todos los procesos antes descritos van a contribuir a la inducción de la muerte neuronal isquémica. Dentro de los mecanismos de muerte isquémica más estudiados están la necrosis y la apoptosis. En el núcleo isquémico donde el flujo sanguíneo es mayormente restringido la muerte es predominante necrótica. La muerte necrótica fue descrita como un tipo de muerte pasivo y desordenado, caracterizado por el “hinchamiento temprano de los organelos celulares como las mitocondrias y el retículo endoplasmático (RE), así como de la célula en general (oncosis) y la ruptura de la membrana plasmática, mientras que el núcleo se mantiene relativamente preservado” (López *et al.*, 2012).

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, ocurre en la penumbra isquémica, ésta se caracteriza por la condensación de la cromatina, la disrupción de la envoltura nuclear, la fragmentación de ADN, la vacuolización citoplasmática y condensación de la misma sin dañar la membrana plasmática, todos estos pasos están orquestados por expresión génica, síntesis de proteínas y activación de caspasas (Rami *et al.*, 2008). Bajo condiciones isquémicas la apoptosis puede iniciarse tanto a través de la vía intrínseca como extrínseca.

La vía intrínseca es mediada por la liberación del citocromo C desde el interior de la mitocondria a través del poro de transición mitocondria (MTP). Proteínas de la familia Bcl 2 promueven (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid) o inhiben (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) la formación del poro. Se sabe que Bax y/o Bak tienen que ser oligomerizados en el interior de la membrana mitocondrial para la formación del MPT, y que la transcripción de Bax se induce por p53 tras el daño al ADN. Por su parte Bad, Bim y Bid que se encuentran normalmente en el citosol tienen que ser translocados a la membrana mitocondrial para inducir la liberación del citocromo C a través del MTP, aunque no se sabe bien el mecanismo implicado. Se sabe que Bim está secuestrado en el citoesqueleto y que tiene que disociarse del mismo para llegar a la membrana mitocondrial. Mientras que Bid, necesita ser cortado por caspasa 8 y Bad requiere ser desfosforilado por calcineurina para su translocación a la membrana mitocondrial y promover la liberación del citocromo C. Rio abajo de la liberación del citocromo C, se da la formación del apoptosoma (complejo formado por citocromo C, Apaf-1 y procaspasa 9) el cual cortará y activará caspasas efectoras como la caspasa 3, la cual induce la fragmentación de actina y activación de endonucleasas culminando con el proceso de muerte (Doyle *et al.*, 2008).

La vía extrínseca es independiente de la liberación del citocromo C, ésta ocurre por la activación de receptores de muerte tales como TNFR1, Fas/CD95 y TRAIL mediante la unión de sus ligandos que pertenecen a la familia TNF (FASL, TNF, LT- α , LT- β , CD40L, LIGHT, RANKL, TRAIL), que son liberados como parte de la respuesta inflamatoria a la isquemia, resultando en la activación de las caspasa 8 y 10 que a su vez pueden activar a las caspasas efectoras dando lugar a la muerte apoptótica (Doyle *et al.*, 2008).

Otro proceso implicado recientemente en la muerte neuronal inducida por la isquemia cerebral es la autofagia, ya que, a pesar de ser un proceso celular necesario para mantener la homeostasis celular, su alteración podría llevar a la muerte.

3. Autofagia

3.1 Definición y tipos de autofagia (macroautofagia)

La autofagia es un proceso catabólico conservado evolutivamente desde las levaduras, encargado de la degradación y el reciclaje de componentes citoplasmáticos como proteínas u organelos dañados o envejecidos para mantener la homeostasis celular. Existen varias formas de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La forma predominante es la macroautofagia en la cual nos centraremos y referiremos como autofagia. La autofagia está encargada de la degradación de estructuras grandes tales como organelos o bien agregados proteicos. Esta degradación puede ser no selectiva en la cual la degradación del contenido citoplasmático provee de recursos tales como aminoácidos, lípidos, nucleótidos y carbohidratos apoyando al metabolismo celular en condiciones de inanición o privación de nutrientes. O bien, puede ser selectiva para proteínas u organelos que puedan tener un potencial tóxico para la célula, por ejemplo, las mitocondrias que son una fuente importante de ROS tienen que estar altamente controladas para que los niveles de ROS no superen la respuesta antioxidante de las células y una de las formas de regularla es la autofagia selectiva a mitocondrias llamada mitofagia, o bien alcanzada la vida media de estos organelos también se remueven por vía mitofágica (Rabinowitz y White, 2010).

El proceso de autofagia involucra tres fases, una etapa inicial de inducción o de nucleación de los precursores del autofagosoma, seguida de una etapa de elongación y maduración del autofagosoma, y una etapa final de fusión con el lisosoma y degradación del cargo autofágico (Figura 4). El autofagosoma, es una estructura de doble membrana que captura las proteínas dañadas, agregadas o mal plegadas u organelos dañados a degradar. En las neuronas, los autofagosomas son formados en el extremo distal del axón desde donde son transportados mediante

transporte retrógrado mediado por dineína hasta la región perinuclear donde pueden fusionarse con otras vesículas formando un amfisoma los cuales subsecuentemente se fusionarán con lisosomas o bien pueden fusionarse directamente con lisosomas. La fusión entre el autofagosoma con el lisosoma forma una estructura denominada autolisosoma en donde las enzimas lisosomales culminarán la degradación del contenido del autofagosoma (Figura 4) (Menzies *et al.*, 2015; Gatica *et al.*, 2016). El proceso de formación de autofagosomas y la subsecuente degradación de su contenido en el autolisosoma es referido como flujo autofágico. Una alteración en el flujo autofágico conduce a la acumulación de autofagosomas, lo cual podría culminar en la muerte celular neuronal (Sarkar *et al.*, 2014; Camberos *et al.*, 2016).

Todas estas etapas están mediadas por una familia de genes autofágicos (ATG). Se sabe que la nucleación de la autofagia implica la estabilización del complejo cinasa ULK constituido por (ULK-1 o ULK-2/Atg1, ATG13/Atg13, ATG101 y FIP200). Posteriormente ULK-1 fosforila a Beclina 1, la cual a su vez va facilitar la formación de un segundo complejo, el complejo PtdIns3K, formado por la fosfatidilinositol-3-cinasa de clase III (PtdIns3KIII/Vps34), fosfatidilinositol-3-cinasa subunidad regulatoria 4 (PIK3R4/Vps15) y beclina -1 (BECN1/Vps30-Atg6). Tanto el complejo ULK-1 como PtdIns3k van a inducir el reclutamiento de proteínas que mediarán la fusión de segmentos membranales (provenientes de membranas mitocondriales, del RE, del aparato de Golgi e incluso de la membrana plasmática) para formar un saco de membrana aplanado llamado fagóforo. El complejo encargado de la construcción del fagóforo está conformado por el sistema de conjugación ATG5, ATG12 y ATG16, cuya formación requiere de la activación de otro sistema de conjugación formado por ATG7 y ATG10. Otra proteína que está involucrada en el reclutamiento membranal para la formación del fagóforo es la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3). LC3 es primero cortada por ATG4 para formar LC3-I la cual es conjugada con la fosfatidiletanolamina a través de ATG7 y ATG3 dando como resultado LC3-II. A medida que crece el fagóforo, el complejo ATG5-ATG12-ATG16 se disocia de la membrana mientras que LC3-II permanece unido a la membrana hasta la culminación de la formación del

autofagosoma. Por esta razón LC3-II es un marcador de las etapas tempranas de la autofagia (Rabinowitz y White, 2010; Menzies *et al.*, 2015; Ponpuak *et al.*, 2015; Gatica *et al.*, 2016).

El reclutamiento de las proteínas u organelos a degradar se da gracias a receptores autofágicos tales como p62/SQSTM1, Nrb 1, NDP52 y optineurina quienes reconocen proteínas ubiquitinadas a través de dominios de unión a ubiquitina y se unen al autofagosoma a través de la interacción con regiones de reconocimiento a LC3. Una vez cerrado el autofagosoma éste migra al espacio perinuclear para fusionarse con lisosomas donde su contenido será degradado por proteasas, lipasas, nucleasas y glicosidasas (Rabinowitz y White 2010). Cabe destacar que dentro de este proceso de degradación no solo se procesan las proteínas secuestradas por los receptores autofágicos, los receptores mismos también son degradados y por esta razón se interpreta la disminución de los niveles de p62/SQSTM1 (uno de estos receptores) como un marcador de la fase de degradación autofágica.

ULK-1 en condiciones de abundancia de nutrientes se encuentra inhibido por el complejo 1 mTOR (mTORC1) un complejo formado por 5 proteínas entre las cuales se encuentra Raptor que se une a ULK-1 y a la cinasa de serina/treonina, mTOR, quien fosforila a ULK-1 generando una estructura inestable para la formación del complejo ULK, inhibiendo así la autofagia. Pero en condiciones de estrés o inanición, mTORC1 es inhibido por fosforilación mediada por la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Señales de bajas concentraciones de nutrientes aumentan los niveles de AMP lo cual activará a AMPK quien fosforila a mTOR promoviendo su disociación de ULK-1 y estabilizando a ULK-1 para iniciar la autofagia. Cabe mencionar que esta vía de regulación no es la única, por ejemplo, se sabe que AMPK puede fosforilar a ULK-1 en una región distinta del blanco de mTOR, y dicha fosforilación también conduce la activación de ULK-1 (Rabinowitz y White 2010; Menzies *et al.*, 2015).

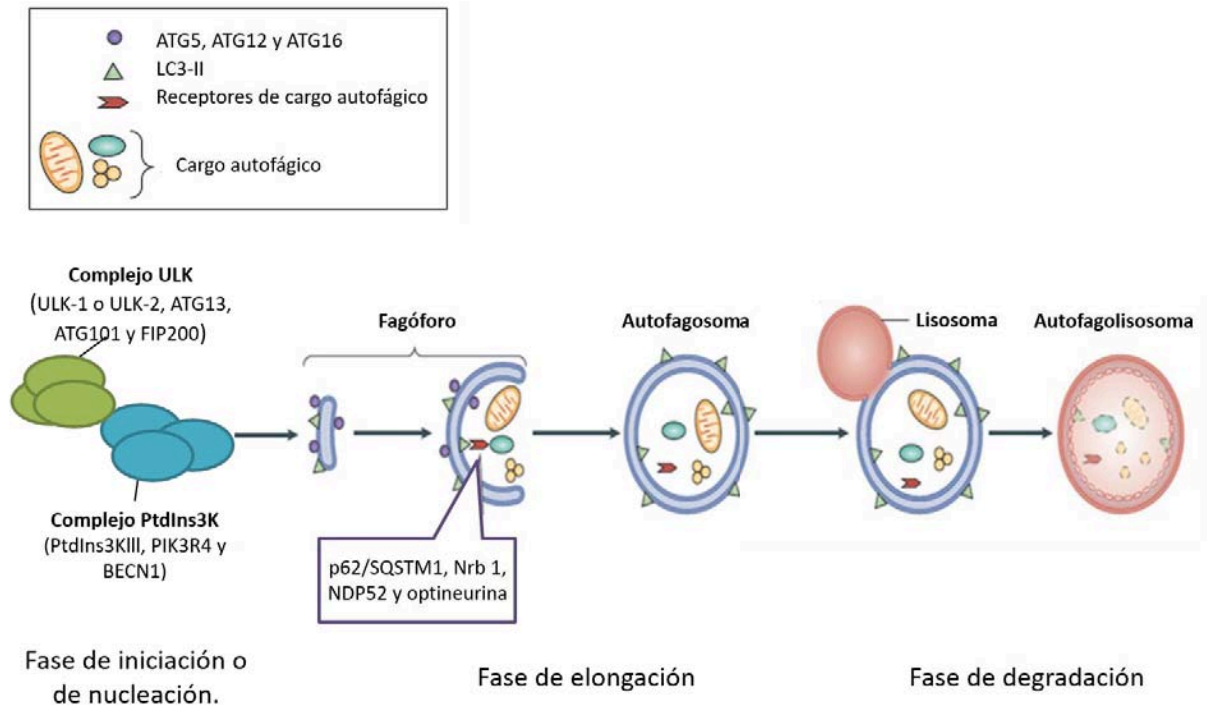


Figura 4.- Representación esquemática de las fases que componen al proceso autofágico (Adaptado de Menzies *et al.*, 2015).

3.2 Papel de la Autofagia en la isquemia cerebral

Los trabajos realizados hasta la fecha respecto al papel que juega el proceso de autofagia en modelos experimentales isquémicos son cuantiosos (cuadros 1, 2 y 3), sin embargo, existe gran discrepancia en los datos obtenidos, la cual, podría explicarse por las diferentes estrategias experimentales utilizadas y a las diferencias entre los modelos experimentales usados.

En varios estudios *in vitro* e *in vivo* donde se induce el proceso autofágico de manera farmacológica o molecular se observa una reducción del daño inducido por la isquemia cerebral (cuadro 1). Por ejemplo, la rapamicina (Rap) induce la autofagia vía inhibición de mTORC1, y los efectos neuroprotectores de este compuesto se han observado en varios estudios, uno de ellos realizado por Li y colaboradores en el 2014, donde demostraron en un modelo isquémico de la MCAO que la administración intracerebral de Rap durante 30 minutos después de MCAO

atenuaba la disfunción mitocondrial vía potenciación de la mitofagia (un tipo de macroautofagia selectiva). Lo que sugiere que la potenciación de la autofagia en tiempos tempranos podría eliminar organelos dañados claves evitando la evolución de un ambiente tóxico que induzca procesos de muerte como la apoptosis o la alteración de mecanismos de sobrevivencia como la autofagia. Sin embargo, otra serie de estudios tanto in vitro como in vivo al inhibir el proceso autofágico también observan protección en contra del daño neuronal isquémico (cuadro 2). Incluso algunos grupos de investigación apoyan un papel dual de la autofagia en la isquemia reperusión, dado que al inhibir el proceso autofágico de manera farmacológica (3-MA) o molecular (silenciando ATG7) durante el periodo isquémico, tanto in vivo (t-MCAO o p-MCAO) como in vitro (OGD), se observa una reducción tanto en el volumen de lesión como en la muerte apoptótica. Mientras que en el periodo de reintroducción o reperusión el inhibir el proceso autofágico aumenta el volumen de lesión y la muerte apoptótica, sugiriendo que la autofagia contribuye a la sobrevivencia celular durante el periodo de reintroducción mientras que durante el periodo isquémico parece tener un papel negativo en la sobrevivencia celular (Zhang *et al.*, 2013).

Por otra parte, también se ha obtenido evidencia de que el proceso autofágico se encuentra alterado después del periodo isquémico; Ratas Wistar macho fueron expuestas al modelo isquémico de oclusión transitoria de arterias carótidas durante 20 min, seguidas de 24 horas de reperusión, durante las que se administró cloroquina (CQ) (25 mg/kg i.c.v., 5 horas antes de ser sacrificadas), un inhibidor de la actividad lisosomal. El tratamiento con CQ provocó la acumulación de la proteína LC3-II en el grupo control, mientras que, en el grupo expuesto al periodo isquémico, no. Lo que sugiere que el proceso autofágico se encuentra alterado después de un periodo isquémico en este modelo (Liu *et al.*, 2010).

Estos trabajos sugieren que la autofagia es inducida durante el proceso isquémico como una respuesta asociada a la sobrevivencia neuronal, pero que ocurre de manera aberrante no pudiendo llevarse a cabo la fase degradativa, lo que finalmente conduce a la muerte, posiblemente por apoptosis.

Cuadro 1.- AUTOFAGIA CONTRIBUYE A LA PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO NEURONAL ISQUEMICO

Publicación	Modelo	Fármacos: Dosis	Papel de la autofagia
Carloni <i>et al.</i> , 2008 (<i>Neurobiology of Disease</i>)	Isquemia/hipoxia (HI) In vivo. (Sprague–Dawley) Oclusión de la arteria carótida común (CCAO) seguida de 2.5 h de hipoxia (92% nitrógeno y 8% de oxígeno).	In vivo. (i.c.v.) 3-MA 10 Mm (5 ul) Rap 0.5 ng (0.5 µl)	La inhibición de la autofagia con 3-MA aumentó el número de células positivas a yoduro de propidio (PI), aunque el volumen de infarto no fue alterado. Mientras que la inducción de la autofagia con Rap. disminuyó tanto el número de células positivas a PI como el volumen del infarto de manera significativa.
Liu <i>et al.</i> , 2010 (<i>Journal of Neurochemistry</i>)	Isquemia/reperfusión (IR) In vivo. (Wistar) Sujeción de arterias carótidas durante 20 min, seguidas de 0.5, 4, 24 y 72 h de reperfusión.	In vivo. (i.c.v.) CQ 25mg/kg	El tratamiento con CQ resultó en la acumulación de LC3-II en ratas Sham, pero no en ratas isquémicas. Lo que sugiere que el proceso autofágico se encuentra alterado después de un periodo isquémico. Y esta alteración conlleva a un aumento en la acumulación de proteínas mal plegadas.
Sheng <i>et al.</i> , 2012 (<i>Autophagy</i>)	Pre-condicionamiento isquémico (IPC) In vitro. (cultivos corticales) OGD (por 30min) seguida o no de OGD letal (por 3 a 6h) 24 h después In vivo. (Sprague-Dawley) t-MCAO (por 10 min) seguida o no de t-MCAO (90 min) a las 24h después.	In vitro. 3-MA (5-20nM) BAF (37.5-150nm) In vivo (i.c.v.) 3-MA 200 nmol (1µl) Sal 75 pmol (1µl) Rap 35 pmo (4µl)	Durante Pre-condicionamiento isquémico (IPC) se induce estrés del RE, ante esto se activa la autofagia como mecanismo de sobrevivencia regulando positivamente chaperonas moleculares y la degradación de proteínas mal plegadas dentro del lumen del RE.
Papadakis <i>et al.</i> , 2013 (<i>Nature medicine</i>)	Isquemia/reperfusión (IR) In vitro. cultivos hipocampales Inducción de OGD (3hr) In vivo. (ratón) isquemia global.	In vivo. siRNATcs1(hamartina) Rap 10nM 3-MA 10mM	La sobreexpresión de hamartina en la región CA3 del hipocampo le confiere resistencia ante un estímulo isquémico por inducir autofagia a través de un mecanismo dependiente de mTORC1.
Buckley <i>et al.</i> , 2014 (<i>Experimental & Translational Stroke Medicine</i>)	Isquemia/reperfusión (IR) In vivo (ratones C57BL J6) Ligación de la arteria cerebral media (MCAL) o MCAO suplementado con fibrinógeno humano (1mg/kg)	In vivo. (i.p.) CQ 60mg/kg Rap. 1.25 mg/kg	En ambos modelos la inducción de la autofagia con Rap. disminuyó el volumen del infarto, y el tratamiento con CQ, disminuyó el volumen de lesión solo en el modelo de MCAO.
Gao <i>et al.</i> , 2013 (<i>Acta Pharmacologica Sinica</i>)	Pre-condicionamiento isquémico (IPC) In vivo. (Sprague-Dawley) t-MCAO (10 min) seguida por t-MCAO (90 min) 24hr después.	In vivo. (i.c.v.) SAL 150 pmol	El IPC induce estrés del RE moderado que conduce a las células a generar una respuesta adaptativa a través de la autofagia. Esta relación podría estar mediada por la expresión de chaperonas tales como HSP70 inducidas por el estrés del RE.

Jiang <i>et al.</i>, 2015 (Mol Neurobiol)	Pre-condicionamiento isquémico (IPC) In vivo. (Sprague-Dawley) t-MCAO (10min) seguida por t-MCAO (90 min) 24hr después.	In vivo. (i.p./ i.c.v.) Compuesto C 20 mg/kg 3-MA 200nmol	El IPC confiere neuroprotección a través de la inducción del proceso autofágico dependiente de AMPK.
Zhang <i>et al.</i>, 2014 (Autophagy)	Isquemia/reperfusión In vivo. (ratón) t-MCAO (60min) seguidos de 24 h de reperfusión. In vitro. (cultivos corticales) 2h de OGD.	In vivo. (i.c.v.) Tunicamicina 3µg Tapsigargina 20ng In vitro. Tunicamicina 3µg Tapsigargina 20ng 3-MA 15µg 4-PBA 150 µg Atg7 siRNA	Al inducir de manera controlada estrés del RE durante la fase isquémica se activan el proceso de mitofagia en la fase de reintroducción protegiendo contra el daño neuronal.

Cuadro 2.-AUTOFAGIA CONTRIBUYE A EL DAÑO NEURONAL ISQUEMICO

Publicación	Modelo	Fármacos: Dosis	Papel de la autofagia
Adhami <i>et al.</i>, 2006 (The American Journal of Pathology)	Isquemia/hipoxia (HI) In vivo CCAO mas diferentes periodos de hipoxia (30. 35, 40 o 60 minutos)	No utilizaron ningún inhibidor o inductor de la autofagia.	Determinaron por microscopia electrónica la presencia del proceso autofágico en este modelo
Wen <i>et al.</i>, 2008 (Autophagy)	Isquemia In vivo. (Sprague-Dawley) Se indujo isquemia por p-MCAO	In vivo. (i.c.v.) 3-MA (300-600 nM) BFA (4nM) BZ-FA-fmk (19-26 nM).	La p-MCAO indujo un aumento en los marcadores de autofagia y una disminución en los niveles de la proteína Bcl2, una proteína antiapoptotica. Por otra parte, la inhibición de la fase de iniciación y degradación de la autofagia con 3-MA y BAF o BZ-FA-fmk respectivamente, disminuyó el volumen del infarto cerebral, el contenido de agua y el déficit motor inducido por la isquemia cerebral.
Koike <i>et al.</i>, 2008 (The American Journal of Pathology)	Isquemia/hipoxia (HI) In vivo. (Ratón) CCAO seguidos de 1hr de hipoxia.	In vivo. Ratones deficientes a ATG 7.	La ausencia de ATG7 previene la muerte neuronal dependiente de caspasa-3 inducida por HI, sugiriendo que la autofagia desencadena estos procesos de muerte.
Ginet <i>et al.</i>, 2009 (The American Journal of Pathology)	Isquemia/reperfusión (IR) In vivo. (Rata) CCAO más 2 hr de hipoxia	No utilizaron ningún inhibidor o inductor de la autofagia.	La marca positiva a LC3-II, colocalizaba con la marca positiva a TUNEL (marcador de apoptosis) en células de la corteza después de 24 horas de HI.
Zheng <i>et al.</i>, 2012 (Neuroscience)	Isquemia/reperfusión (IR) In vivo. (ratón CD-1)	In vivo. (ip/ i.c.v.) NAD ⁺ (50mg/kg) 3-MA	La inhibición de la autofagia con 3-MA redujo de manera el volumen del infarto. Y el efecto protector del NAD ⁺ en contra del daño isquémico también fue

	t-MCAO por 90 min. seguidos de 6, 12, 24 y 48 h de reperusión.		relacionado con la regulación negativa de la autofagia.
Gao et al., 2012 (PLoS ONE)	Isquemia/reperusión (IR) In vivo. (Ratas) MCAO por 30 min y analizadas a las 1, 6, 12, 24 y 48hr. Pre-condicionamiento isquémico (IPC) In vivo. (Ratas) CCAO (30 seg cada 10 seg) seguida de 30 min de MCAO y analizadas a las y 24hr.	In vivo. (i.c.v.) Rap 35pmol 3-MA	El efecto protector del IPC fue relacionado con la prevención del aumento en los niveles de LC3-II y Bleclina 1 inducido por la MCAO a las 6 y 24 hr así como la disminución de p62. A demás, dicha protección se vio revertida en las ratas tratadas con Rap, mientras que en las ratas tratadas con 3-MA no se modificó el efecto protector.
WANG et al., 2013 (J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci)	Isquemia/reperusión (IR) In vitro. (línea celular N2a) OGSD por 15, 30, 45, 60 o 90 min, seguidos de 1,3, 6, 9, 12 o 24 hr de reperusión.	In vivo. Rap 100nmol/L 3-MA 10 nmol/L	La inhibición del proceso autofágico con 3-MA durante la reintroducción de glucosa, oxígeno y suero, aumento la viabilidad mitocondrial en comparación con la Rap.

Cuadro 3.- PAPEL DUAL DE LA AUTOFAGIA EN EL DAÑO NEURONAL ISQUEMICO

Publicación	Modelo	Fármacos: Dosis	Papel de la autofagia
Zhang et al., 2013 (Autophagy)	Isquemia/reperusión (IR) In vivo. t-MCAO (60min) seguidos de 24 hr de reperusión o p-MCAO por 24 hr. In vitro. (cultivos corticales) ODG por 2 o 4 hr.	In vivo. 3-MA 15µg (i.c.v.) In vitro. 3-MA 2.5mmol/L Baf. 50nM ATG7 siRNA Mdivi-1 25µmol/L	En la fase isquémica tanto in vivo como in vitro se reduce el volumen de lesión y la muerte apoptótica al inhibir la autofagia. En la fase de reperusión por el contrario al inhibir la autofagia aumenta el volumen de lesión y la muerte neuronal apoptótica. Al inhibir la mitofagia con Mdivi-1 en la fase de reperusión también se aumenta el daño neuronal.

4. Cuerpos cetónicos

4.1 Síntesis y función de los cuerpos cetónicos

La privación de glucosa es un componente importante del daño isquémico. Sin embargo, en estas condiciones las neuronas pueden consumir substratos alternativos a la glucosa para contrarrestar el estrés energético. Los cuerpos cetónicos: acetona, acetoacetato (AcAc) y D-β-Hidroxibutirato (BHB) pueden consumirse en el cerebro en ciertas condiciones como el ayuno prolongando, la

hipoglucemia y la isquemia cerebral. Estos se sintetizan principalmente en las mitocondrias de los hepatocitos mediante un proceso denominado cetogénesis, el cual inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA obtenidos de la β -Oxidación de los ácidos grasos, la cual es catalizada por la enzima tiolasa. Posteriormente el acetoacetil-CoA formado se condensa con acetil-CoA generando β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) gracias a la HMG-CoA sintasa. En un tercer paso el HMG-CoA es cortado por una liasa produciendo AcAc y una molécula de acetil-CoA libre. Finalmente, el AcAc puede ser reducido por la enzima mitocondrial D- β -Hidroxi- β -butirato deshidrogenasa o puede ser descarboxilado de manera espontánea o por la acetoacetato descarboxilasa para formar D- β -hidroxi- β -butirato y acetona, respectivamente (Figura 5). Cabe mencionar que la acetona se produce en menores cantidades en comparación de los otros dos cuerpos cetónicos y es eliminado durante la exhalación (Nelson y Cox, 2007).

El AcAc y el BHB pueden ser transportados del torrente sanguíneo hasta otros órganos tales como corazón, corteza renal, musculo esquelético y cerebro a través de los transportadores de monocarboxilatos para ser utilizados como substratos energéticos mediante un proceso llamado cetólisis. La cetólisis consiste en una serie de pasos a la inversa de la cetogénesis que inicia con la oxidación del grupo carbonilo del BHB por la D- β -Hidroxi- β -butirato deshidrogenasa para formar AcAc y NADH. Posteriormente la β -cetoacil-CoA transferasa le transfiere al AcAc una molécula de CoA proveniente de la succinil-CoA para generar acetoacetil-CoA. Finalmente, la enzima tiolasa rompe el acetoacetil-CoA en dos moléculas de acetil-CoA las cuales pueden entrar al ciclo de Krebs y ser oxidadas para la obtención de energía (Amilpas *et al.*, 2015). Recientemente se ha sugerido que los cuerpos cetónicos también pueden ser sintetizados en el cerebro, principalmente las células gliales, mediante las mismas vías, pero en mucho menor proporción que en el hígado (Takahashi *et al.*, 2014).

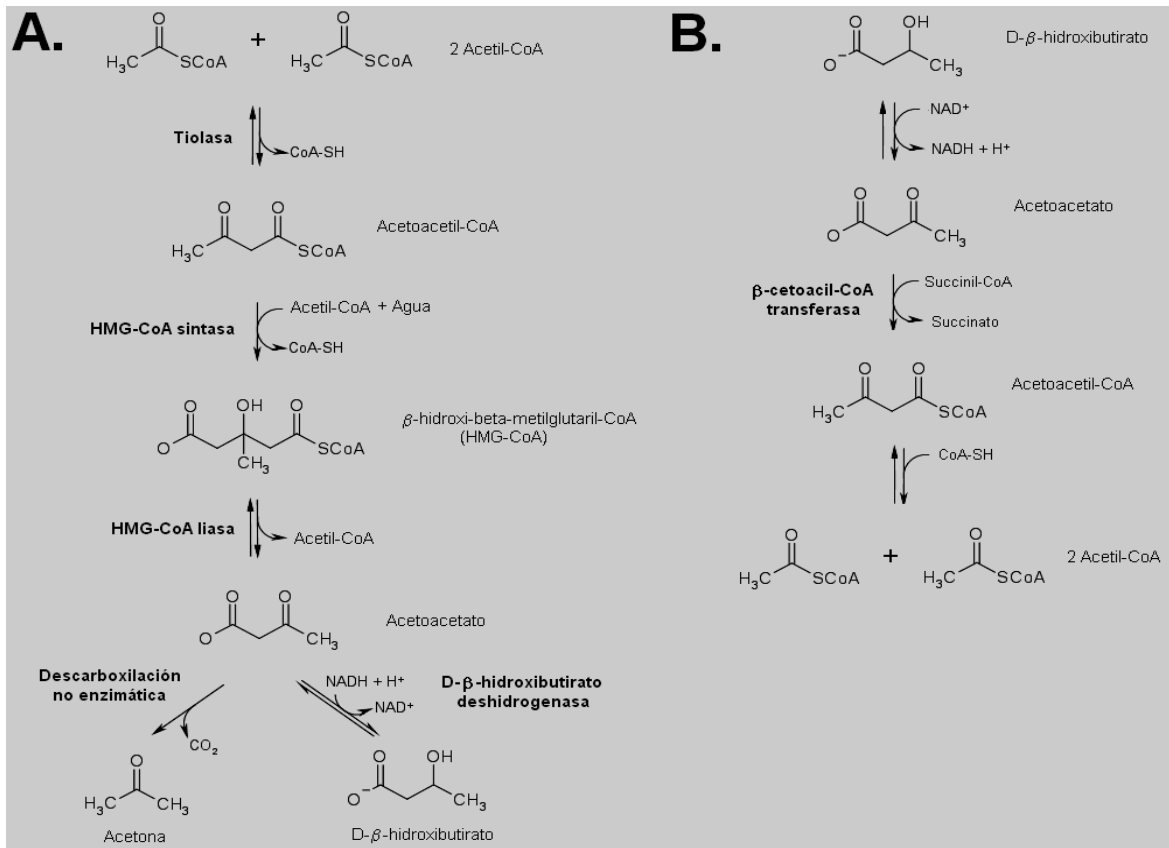


Figura 5.- Representación esquemática del metabolismo de cuerpos cetónicos. **A.** síntesis de AcAc, acetona y BHB a partir de Acetil- CoA proveniente de la β -oxidación (cetogénesis). **B.** Producción de acetil-CoA a partir de cuerpos cetónicos (cetólisis) (Adaptado de Amilpas., 2015)

4.2 Papel de los cuerpos cetónicos en el daño neuronal

Diferentes estudios han demostrado el efecto protector de los cuerpos cetónicos en contra del daño inducido por la hipoxia (Suzuki *et al.*, 2001) isquemia (Suzuki *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2015; Puchowicz *et al.*, 2008), hipoglucemia (Amilpas *et al.*, 2015) y excitotoxicidad (Maalouf *et al.*, 2007; Massieu *et al.*, 2003). Su efecto protector ha sido principalmente atribuido al mantenimiento del metabolismo energético celular. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el BHB, es capaz de aumentar los niveles de ATP en modelos de privación de glucosa e isquemia cerebral (Amilpas *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2001). Además, en un modelo *in vitro* de excitotoxicidad por glutamato se observó que el tratamiento con cuerpos cetónicos mejora el metabolismo mitocondrial y aumenta el cociente NAD/NADH conduciendo a una disminución en la producción de ROS ocasionada por el daño

excitotóxico (Maalouf *et al.*, 2007). Además, estudios posteriores demostraron que los cuerpos cetónicos también poseen capacidad de atrapar de diferentes ROS principalmente para el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Haces *et al.*, 2008) sugiriendo otro mecanismo de acción por el cual los cuerpos cetónicos pueden disminuir los niveles de ROS en distintas condiciones patológicas. No obstante, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad del cuerpo cetónico BHB de inhibir la actividad del inflammasoma NLRP3 inducida por distintas partículas asociadas a daño (DAMPs), por la prevención del exflujo de K^+ y la reducción en la oligomerización de la proteína adaptadora ASC, sugiriendo otra vía de protección del BHB mediante el abatimiento de la respuesta inflamatoria (Youm *et al.*, 2015).

También se ha sugerido que el efecto protector del BHB está relacionado con efectos epigenéticos inducidos por la inhibición de las deacetilasas de histonas (HDAC). En un estudio *in vitro*, la incubación de células HEK293 con 4.5 mM de BHB (concentraciones alcanzadas durante el ayuno prolongado o restricción calórica) durante 8 horas disminuyó la actividad de las HDAC de clase I conduciendo a un aumento en la acetilación de histonas H3 en sus residuos de lisina 9 y 14 incrementando la expresión de RNA mensajero de FoxO3a y Mt2, dos factores de transcripción de genes de la respuesta antioxidante. Sugiriendo que, durante el ayuno prolongado o la restricción calórica, el aumento en los niveles de cuerpos cetónicos podría estar favoreciendo la respuesta al estrés oxidante (Shimazu *et al.*, 2013). Por otra parte, Yin y colaboradores utilizando el modelo de t-MCAO observaron que el tratamiento con cuerpos cetónicos induce un aumento en la función del complejo I mitocondrial y con ello incrementa el cociente NAD/NADH, al igual que lo observado por Maalouf en el 2007 en el modelo excitotóxico. En el mismo estudio se observó un aumento en los niveles de Foxo3a, de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) y de la Sirtuina 3 (SIRT3). Esta es una HDAC de clase III dependiente de NAD⁺ y que induce la acetilación del factor de transcripción FoxO3a y con ello su translocación al núcleo y la regulación transcripcional de distintos genes de la respuesta antioxidante como la SOD2 (Yin *et al.*, 2015).

Además, un grupo de investigadores descubrió una nueva modificación post-transducional de las histonas H3 en sus residuos de lisina 9, en el sitio promotor de

varios genes implicados en diferentes vías importantes, tales como la fosforilación oxidativa, el metabolismo alanina-aspartato-glutamato, la vía de señalización PPAR entre otras, en condiciones de ayuno. Dicha modificación consiste en la unión de una molécula de D- β -Hidroxibutirato a los residuos de lisina de las histonas a la cual denominaron β -Hidroxibutirilación, la cual constituye una nueva marca de la cromatina (Xie *et al.*, 2016).

Finalmente, estudios previos del laboratorio demostraron que el BHB previene la muerte inducida por privación (PG) y reintroducción de glucosa (RG) de neuronas corticales cultivadas, a través de la estimulación del flujo autofágico. Cultivos de neuronas corticales expuestos a 2h de PG seguidas de 3h de RG presentan un aumento significativo de LC3-II y p62/SQSTM1 durante la fase de PG, y una disminución de ambos durante la RG. En presencia del BHB, los niveles de LC3-II y p62 no aumentan tanto durante la PG y disminuyen más rápidamente durante la RG, sugiriendo la estimulación del flujo autofágico. Por otra parte, al monitorear los marcadores de autofagia a tiempos tardíos de la reintroducción (6 y 20 h de GR), las células que no fueron tratadas con BHB, mostraron un nuevo aumento en los niveles de LC3-II indicando una nueva formación de autofagosomas y aumento de p62/SQSTM1 sugiriendo el bloqueo del flujo autofágico. Las células tratadas con BHB no mostraron un aumento en los niveles de estas dos proteínas. Estos resultados nos llevaron a proponer que el BHB, estimula el flujo autofágico previniendo la acumulación de autofagosomas, lo cual podría contribuir a su efecto protector en condiciones de falla energética (Camberos *et al.*, 2016).

II. Planteamiento del problema

En 1996 la FDA (Food and drug administration) aprobó el empleo intravenoso del activador de plasminógeno tisular (t-PA) como tratamiento para infartos encefálicos de menos de tres horas de evolución, en base a los estudios realizados por el Instituto Nacional de desórdenes Neurológicos en 1995. La administración de esta enzima induce la degradación de coágulos que obstruyen el flujo sanguíneo, permitiendo así la reperfusión (Paramo *et al.*, 1985). Hoy en día el t-PA es el único tratamiento aprobado por la FDA, sin embargo, el número de candidatos a este tratamiento es reducido debido al rango de tiempo tan corto para su administración. Por otra parte, sabemos que la isquemia cerebral involucra una cascada de procesos neuroquímicos desencadenados por la repentina interrupción del flujo sanguíneo cerebral por lo que la rápida reperfusión que confiere la administración de t-PA o los procesos endógenos de fibrinólisis es un paso esencial para la prevención de la muerte celular. Sin embargo, el proceso de reperfusión también agrava el daño cerebral isquémico debido al incremento en la generación de ROS y daño neuronal (Chomova y Zitnanova, 2016). Por esta razón el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas es de vital importancia.

Se ha demostrado que la administración exógena de cuerpos cetónicos protege en contra del daño isquémico y excitotóxico (Suzuki *et al.*, 2002; Maalouf *et al.*, 2007). Sin embargo, los mecanismos implicados en dicha protección aún siguen siendo objeto de estudio. Recientemente se demostró que el BHB previene la muerte de neuronas corticales cultivadas al evitar la acumulación excesiva de autofagosomas, resultado del bloqueo del flujo autofágico desencadenado por la PG y RG (Camberos, *et al.*, 2016). De aquí que en el presente estudio se planteó investigar si la administración exógena de cuerpos cetónicos después de iniciada la reperfusión isquémica es capaz de disminuir el daño inducido por la t-MCAO, y si dicho efecto protector está relacionado con la autofagia.

Dado que, el modelo experimental de t-MCAO, es muy complejo y el porcentaje de sobrevivencia a esta cirugía es reducido, se decidió implementar un segundo modelo in vivo para evaluar los efectos del BHB sobre tres marcadores de autofagia. Una forma más sencilla de desencadenar los procesos moleculares que

tienen lugar en la isquemia cerebral, es la administración de agonistas de los receptores a glutamato, tales como el NMDA, el cual genera un daño excitotóxico agudo causando falla energética, despolarización membranal e influjo de calcio, que a su vez inducen estrés oxidante, apoptosis, necrosis y autofagia de manera similar a lo que ocurre durante la isquemia cerebral.

Hipótesis

- ❖ La excitotoxicidad inducida la t-MCAO y por la administración de NMDA conducirá al bloqueo del flujo autofágico y con ello, a la acumulación de autofagosomas, lo cual será prevenido por la administración de BHB.

Objetivos

- a) Investigar el efecto protector del BHB sobre la muerte neuronal y el daño neurológico producido por la t-MCAO y por la inyección de NMDA en el cuerpo estriado de la rata.
- b) Investigar los cambios en los marcadores de autofagia después de la administración de NMDA y la t-MCAO
- c) Investigar si el efecto protector del BHB previene la acumulación de autofagosomas en estas condiciones patológicas.

III. Métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho obtenidas del instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con un peso de entre 280 y 300 gramos, las cuales fueron alojadas con libre acceso al agua y al alimento en condiciones controladas de temperatura (22°C), luz (un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad) y humedad (30%) hasta su uso.

2. Modelo de isquemia cerebral focal transitoria (t-MCAO)

Los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina 80 mg/kg vía intramuscular, seguida de una exposición continua a isoflurano (un anestésico inhalatorio) y oxígeno. El CBF fue monitoreado en el área de la arteria cerebral media (MCA) mediante laser Doppler flowmetry. Una sonda de fibra óptica flexible, se fijó en el cráneo sobre la corteza en base a las siguientes coordenadas: 2 mm caudal al bregma y 6 mm lateral a la línea media (Paxinos y Watson, 1986).

La isquemia cerebral focal fue inducida por t-MCAO como describe Longa y colaboradores en 1989, con pequeñas modificaciones. Brevemente, un monofilamento de nylon recubierto con 1% de poli-l-lisina, se insertó 10 mm en la carótida interna para ocluir el origen de la MCA. La perfusión se permitió después de 90 minutos por la eliminación del monofilamento (Figura 6).

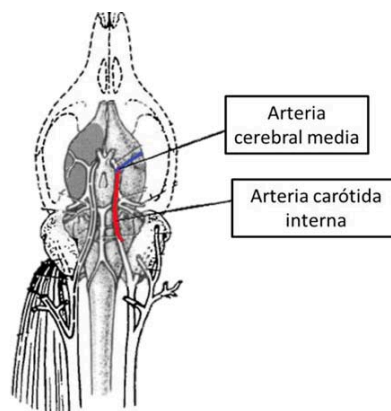


Figura 6.- Representación esquemática de la anatomía cerebrovascular en ratas (Adaptado de Longa et al., 1989)

De manera general, las ratas fueron divididas en dos grupos, el grupo con vehículo (t-MCAO-VEH), en el cual al iniciar el periodo de reperfusion se administraron 500 μ l de solución salina (NaCl 0.9%) vía intraperitoneal (i.p.), y el grupo con BHB (t-MCAO-BHB), en el cual al iniciar el periodo de reperfusion se administraron 500 μ l de una solución 1M de BHB vía i.p. y posteriormente se implantó una minibomba Alzet subcutánea, implantando el catéter de administración epidural para mantener un flujo constante de administración (1 μ l/hr) de D-BHB 2 M, hasta su sacrificio (entre 24 y 96 h) (Figura 7). Cabe destacar que la vía de administración del cuerpo cetónico en los animales destinados a las pruebas de Western blot fue modificado debido al tiempo tan corto entre la cirugía y el sacrificio (tres horas). Iniciado el periodo de reperfusion se administraron 500 μ l de una solución 1M de BHB vía i.p. y posteriormente se administraron 3 μ l de una solución 2M de BHB vía intracerebroventricular (i.c.v.) equivalentes a los 3 μ l de administración durante 3 horas por vía epidural.

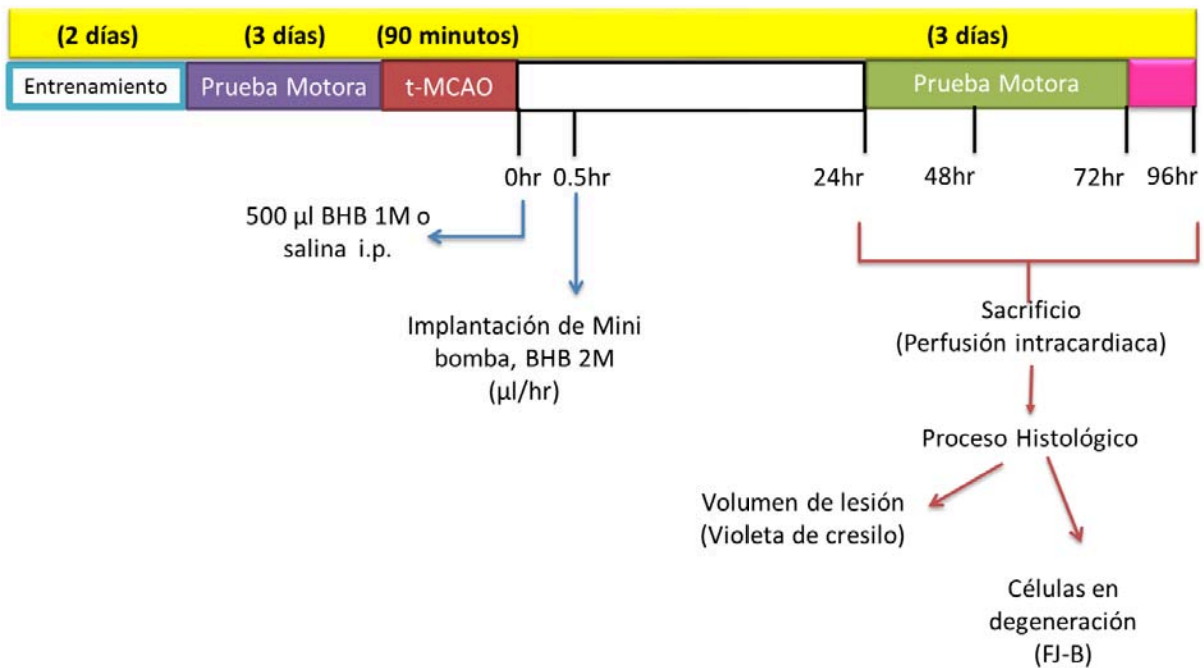


Figura 7.- Representación esquemática del protocolo de ischemia cerebral focal transitoria por la oclusión de la arteria cerebral media (t-MCAO)

3. Supervivencia

Se evaluó el porcentaje de supervivencia de los grupos t-MCAO-VEH y t-MCAO-BHB, por un periodo de hasta cuatro días después de iniciada la reperusión. Para ello se mantuvo en observación a cada animal y si este mostraba una conducta de inmovilidad y respiración accidentada era sacrificado inmediatamente; de lo contrario se dejaba progresar al animal hasta que dichos síntomas se presentaran o bien se cumplieran los cuatro días de supervivencia.

4. Prueba motora: ensayo de la viga

La coordinación motora fina y equilibrio se evaluó mediante el ensayo de la viga descrita por Brailowsky en 1986, la cual consiste en hacer caminar a la rata sobre una viga de 2.5 cm de grosor, 40 cm de alto y 2 m de largo (dividida en 4 cuadrantes de 50 cm). Esta prueba se llevó a cabo durante 7 días consecutivos: 2 días de entrenamiento, 3 días de prueba antes de la t-MCAO y 2 días de prueba después de la t-MCAO. El desempeño en la viga se valoró en función de una escala de déficit motor (Cuadro 4; Figura 9), donde 6 representaba el máximo de daño motor. En cada prueba se asignó un puntaje por cuadrante, posteriormente se hizo la sumatoria de los cuatro cuadrantes para obtener el puntaje final, siendo el puntaje máximo de daño 24.

Cuadro 4.-Escala de déficit motor.

Ensayo de la viga (normal=0; daño máximo=6).	Camina firmemente sobre la viga	0
	Al caminar se sujeta con las garras ligeramente a la viga	1
	Al caminar resbalan sus patas derechas una o más veces	2
	Apoya mal sus patas derechas al caminar, pero logra corregir	3
	Arrastra las patas derechas al caminar	4
	Se arrastra sobre la viga	5
	No logra avanzar, se abraza a la viga y cae	6

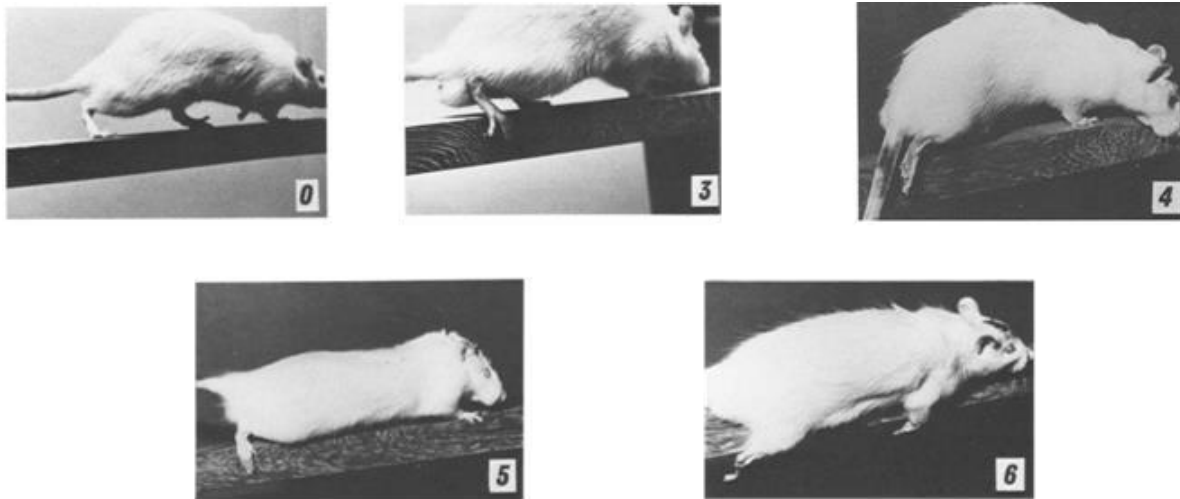


Figura 9.- Escala utilizada para la cuantificación de la función motora fina y equilibrio (Adaptado de Brailowsky et al., 1986)

5. Modelo excitotóxico por la administración de NMDA

Las ratas fueron montadas en un equipo estereotáxico con una exposición continua a isoflurano mas oxígeno. Se indujo muerte excitotóxica mediante una inyección intracerebral (i.c.) de 1 μ l de NMDA (200 nmol) en el estriado izquierdo de la rata. La inyección se realizó con estereotaxia siguiendo las coordenadas: AP +0.7, L +2.8, V-4 a partir de bregma (Paxinos y Watson, 1986) (Figura 8).

Los animales fueron divididos en 2 grupos, el grupo con vehículo (NMDA-VEH), al cual posterior a la inyección i.c. de NMDA se le administraron 500 μ l de solución salina vía i.p. y el grupo con BHB (NMDA-BHB), al cual posterior a la inyección i.c. de NMDA se administraron 500 μ l de una solución 1 M de BHB, a través de una inyección intravenosa (i.v.) y 3 horas después se realizó una segunda inyección de 500 μ l BHB 1 M vía i.p. (Figura 8). En este caso los animales se sacrificaron 24 horas después de la administración de NMDA.

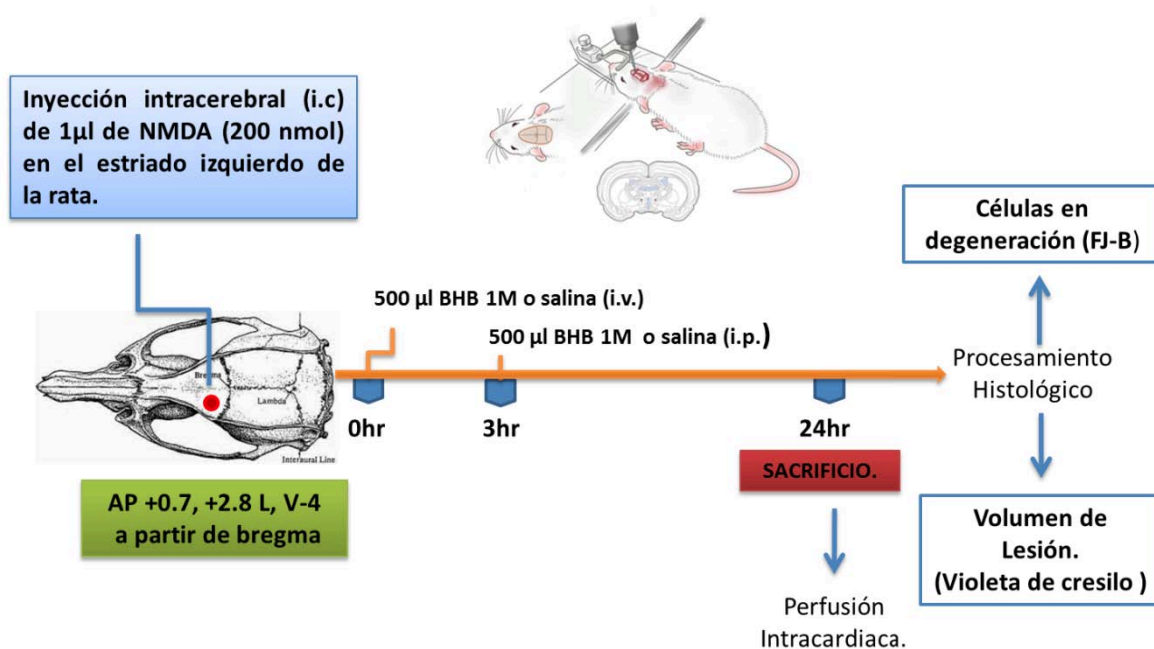


Figura 8.- Representación esquemática del protocolo de excitotoxicidad por la administración de NMDA.

6. Histología

Sin importar el protocolo de trabajo, los animales se sacrificaron con una sobredosis de Pentobarbital sódico, y posteriormente fueron perfundidos con 300 ml de solución salina seguidos del mismo volumen de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M por vía intracardiaca. Inmediatamente después se extrajo el cerebro para su procesamiento histológico.

El tejido cerebral recién extraído se colocó en paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M por un periodo de 24 horas. Transcurrido este tiempo, se expuso a gradientes de sacarosa: primero se colocó en sacarosa al 20% en PB 0.1 M por 24 horas seguido de sacarosa al 30% en PB 0.1M por 72 horas.

Finalmente, el tejido cerebral fue cortado por congelación en un criostato (Leica CM 1510 S, Alemania) obteniendo series de cortes coronales de 40 µm y 25 µm de grosor, con un intervalo de separación de 200 µm. Los cortes fueron colectados aproximadamente desde +4.68 mm hasta - 4.80 mm respecto a Bregma de acuerdo al atlas del cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1986) mismos que fueron montados sobre portaobjetos recubiertos con gelatina.

6.1. Tinción de Fluoro-Jade B (FJ-B)

El colorante Fluoro-Jade B (FJ-B) es un fluorocromo derivado desde la fluoresceína, utilizado como un marcador de células en proceso de degeneración de acuerdo con el protocolo descrito por Haces & Cols en el 2010. Los cortes fueron secados a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente fueron cubiertos con etanol al 80% durante 5 minutos seguidos de 2 minutos de exposición a etanol al 70%. Enseguida, los cortes fueron lavados con agua durante 2 minutos, después, fueron cubiertos con KMnO₄ al 0.06% por 10 minutos. Inmediatamente después el KMnO₄ se eliminó lavando nuevamente con agua durante 2 minutos. Al término del lavado, fueron cubiertos con FJ-B al 0.0004% disuelto en ácido acético al 0.1% durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, el colorante se eliminó con varios lavados con agua y se dejó secar a temperatura ambiente por una noche. Finalmente, los cortes fueron aclarados en xilol por 2 minutos y cubiertos con Permout (Fisher Scientific, New Jersey, USA).

6.2. Conteo de células FJ-B positivas

Modelo de isquemia cerebral (t-MCAO)

Los cortes de los dos grupos (t-MCAO-VEH y t-MCAO-BHB) fueron analizados bajo microscopio de epifluorescencia en busca de células positivas a Fluoro-Jade B en la corteza parietal (área de penumbra isquémica). Se revisó un total de tres cortes con 400 µm de distancia entre corte y corte, abarcando aproximadamente desde 0.20 mm hasta -0.92 mm con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1986). Se capturaron nueve campos de la corteza parietal por corte, para el posterior conteo de células Fluoro-Jade B positivas con ayuda del programa ImageJ. Finalmente se realizó la sumatoria del número de células positivas a FJ-B de los tres cortes (Figura10).

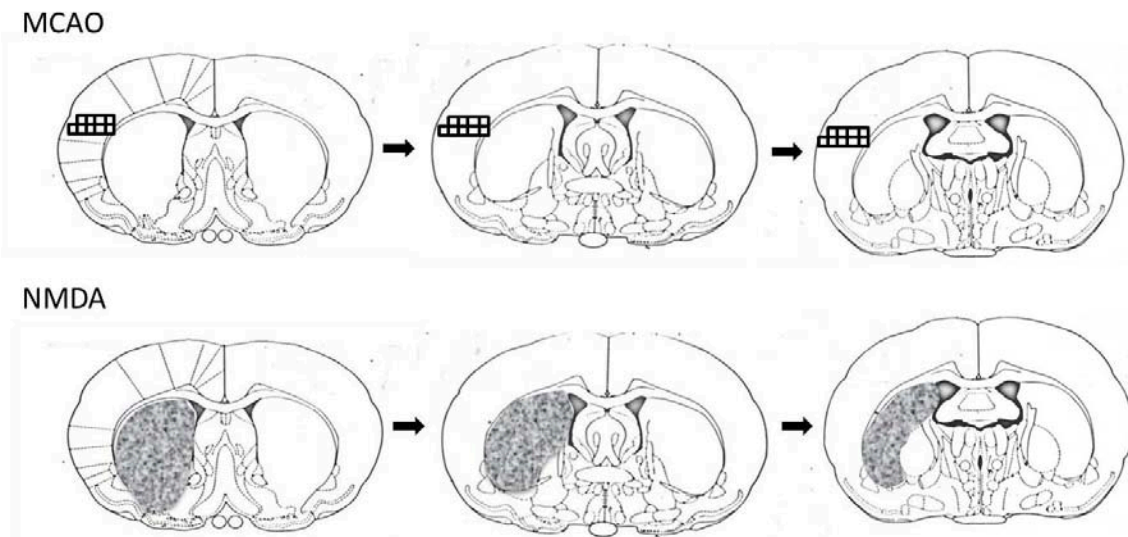


Figura 10.- Representación esquemática de los campos capturados y su localización aproximada

Modelo excitotóxico por la administración de NMDA

Los cortes de los dos grupos (NMDA-VEH y NMDA-BHB) fueron analizados bajo microscopio de epifluorescencia en busca de células positivas a Fluoro-Jade B en el cuerpo estriado de la rata. Se revisó un total de tres cortes con 400 μm de distancia entre corte y corte, abarcando aproximadamente desde 0.20 mm hasta -0.92 mm con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1986). Se capturaron una serie de campos que comprendían toda el área correspondiente al estriado por cada corte para el posterior conteo de células FJ-B positivas con ayuda del programa ImageJ. Finalmente se realizó la sumatoria del número de células positivas a FJ-B de los tres cortes (Figura 10).

6.3. Tinción de Violeta de Cresilo

El violeta de cresilo es un colorante azul básico que puede unirse a moléculas con cargas negativas como los ácidos nucleicos. Por tanto, tiene la particularidad de teñir los núcleos celulares, así como los llamados cuerpos de Nissl (ribosomas libres o asociados a membranas celulares). Básicamente, la técnica consiste en una serie de hidrataciones y deshidrataciones antes y después de la exposición del tejido al colorante. Primeramente, el tejido fue sumergido en agua por 2 minutos.

Enseguida, se expuso al tejido a 4 minutos en cada solución de alcohol al 70%, 96% y absoluto. Posteriormente, se rehidrataron siguiendo los gradientes de alcohol de manera inversa. Luego, el tejido fue sumergido en el colorante violeta de cresilo al 0.1% de 4 a 8 minutos. Inmediatamente después, se eliminó el exceso del colorante con agua durante 2 minutos, el tejido se deshidrató en el gradiente de alcoholes y se aclararon en xilol y se cubrieron con permount (Fisher Scientific, New Jersey, USA).

6.4. Medición de volumen de lesión

Los cortes de los cuatro grupos (MCAO-VEH, MCAO-BHB, NMDA-VHE y NMDA-BHB) fueron analizados bajo microscopio óptico de campo claro en busca del área lesionada. Se revisó un total de cuarenta y dos cortes para los grupos MACAO y de 24 cortes para NMDA con un intervalo de 200 μm . Se capturaron fotos panorámicas de cada uno de los cortes y posteriormente se delimitó y calculó el área lesionada mediante el programa ImageJNH. Finalmente se realizó la sumatoria de áreas y se multiplicó por la distancia entre corte y corte para la obtención del volumen de lesión.

$$\sum_A^* (D)$$

Donde A, es el área lesionada y D, la distancia entre corte y corte (200 μm).

7. Western blot

Independientemente del protocolo, las ratas fueron sacrificadas con una dosis letal de Pentobarbital Sódico vía i.p. y posteriormente se obtuvo el tejido cerebral mediante decapitación disectando las regiones de interés (corteza e estriado). Inmediatamente después se homogenizó el tejido con un buffer de lisis el cual contenía: Tris-HCl pH 8.0 50mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 1%, cocktail de inhibidores de proteasas (2 mg/ml) y PMSF 1%). Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo al método de micro Lowry

(KIT DE BIORAD). Después se añadió a las muestras un buffer de carga (Laemmli simple buffer) y enseguida fueron desnaturalizadas a 96°C por 5 minutos. Desnaturalizadas las muestras, 30 µg (Beclina-1 y p62) o 50 µg (LC3) de proteína fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% (Beclina-1 y p62) o 16% (LC3) mediante SDS-PAGE y subsecuentemente transferidas a membranas PVDF. Las uniones inespecíficas fueron inhibidas por incubación en leche al 5% diluida en TBST 1% a temperatura ambiente por 1 hora. Las membranas fueron incubadas por una a 4°C con los anticuerpos primarios de diferentes marcadores de autofagia: LC3 (1:1300), p62/SQSTM1 (1:500) y Beclina-1 (1:1000) así como el anticuerpo de β -actina (1:4000) empleado como control de carga. Pasado el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas con TBST 0.1% e inmediatamente incubadas con su anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) durante 2 horas. Finalmente, el anticuerpo secundario fue removido con lavados con TBST. La inmunoreactividad fue detectada con un substrato de HRP quimioluminiscente, y revelado por placa de rayos X y/o C Digyt Lycor. Para evaluar los resultados del Western blot, cada banda fue cuantificada por densitometría utilizando el programa de ImageJ.

8. Análisis estadístico

La estadística se realizó con el programa StatView para Windows. Todos los datos fueron sometidos a una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Fisher (las diferencias se consideran significativas si $p < 0.05$). Todos los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar (ES). Los datos conductuales se analizaron por una prueba de U de Mann-Whitney

IV. Resultados

El primer objetivo fue dilucidar si el BHB era capaz de brindar un efecto protector en contra del daño inducido por excitotoxicidad en los dos modelos in vivo, para ello se realizaron de análisis histológicos y conductuales.

1.- Porcentaje de sobrevivencia post t-MCAO

En el modelo de isquemia cerebral focal, se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de los animales de los grupos t-MCAO-VEH y t-MCAO-BHB, hasta por cuatro días después de iniciada la reperfusion. Al día uno post t-MCAO, el porcentaje de sobrevivencia no fue diferente entre los grupos, el cual oscilaba alrededor del 83%. Sin embargo, a partir del día dos post t-MCAO, el porcentaje de sobrevivencia del grupo tratado con vehículo disminuyó con respecto al grupo tratado con BHB, dicha diferencia se hizo más evidente al día tres y para el día cuatro post t-MCAO, el porcentaje de sobrevivencia para el grupo t-MCAO-VEH fue de 14%, mientras que porcentaje del grupo t-MCAO-BHB fue de 62% (Figura 11).

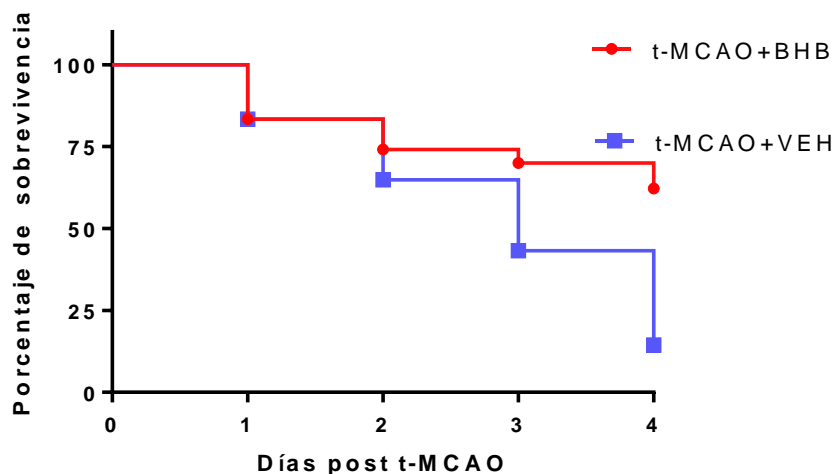


Figura 11.-Efecto del BHB sobre la sobrevivencia post t-MCAO. Se muestra el porcentaje de sobrevivencia post t-MCAO evaluado por un periodo de cuatro días. t-MCAO-VEH n=9, t-MCAO-BHB n=6.

2. Efectos sobre la actividad motora después de t-MCAO

En el modelo de isquemia cerebral focal, también se evaluó la actividad motora después de la t-MCAO de los grupos tratados o no con BHB. Para ello se utilizó el ensayo de la viga, el cual involucra un periodo de entrenamiento y pruebas antes y después de la cirugía. Ambos grupos aprendieron la tarea sin dificultades, y el puntaje promedio de las pruebas antes de la t-MCAO osciló entre 1 y 3, indicando un buen funcionamiento motor como era de esperarse. El puntaje promedio de daño para el grupo t-MCAO-VEH, a las 24 y 48 h post isquemia, fue de 19.17 ± 2.71 y 21.05 ± 1.40 respectivamente, indicando un alto índice de déficit motor. Mientras que para el grupo t-MCAO-BHB el puntaje promedio de daño a las 24 y 48 h post isquemia, fue de 11.96 ± 3.10 y 9.76 ± 3.19 respectivamente, indicando un índice de déficit motor menor al del grupo tratado con vehículo, el cual fue significativo a las 48 horas después de la t-MCAO (Figura 12). Los datos individuales de la prueba motora se muestran en el lado derecho de la figura 12, en donde se puede observar que uno de los animales del grupo tratado con vehículo a las veinticuatro horas presenta un puntaje de 9.30, déficit motor muy parecido a los animales tratados con BHB, sin embargo, a las 48 h su puntaje de daño fue de 18.00, indicado un déficit motor más parecido al resto de los integrantes de su grupo. Por otra parte, en el grupo tratado con BHB, también se observa un animal fuera del promedio, teniendo un puntaje de daño de 20.00 a las 24 h y un puntaje de daño de 21.30 a las 48 h post t-MCAO, lo que indica cierta variabilidad en los datos que podría corregirse aumentando el número de animales en cada grupo.

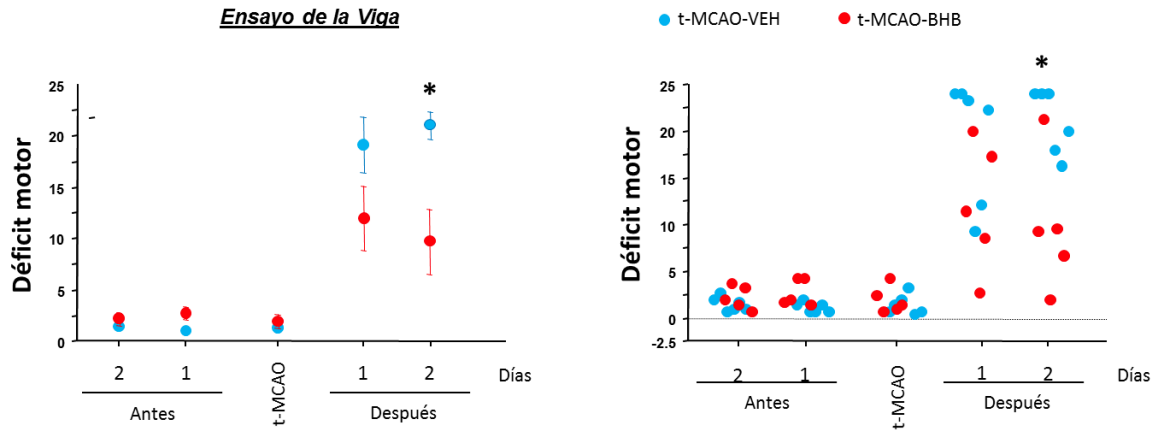


Figura 12.- Efecto del BHB sobre el daño motor inducido por la t-MCAO. Se muestra la media \pm ES, así como los datos individuales del déficit motor antes y después de la t-MCAO. MCAO-VEH n=6, MCAO-BHB n=5. Mann-Whithney; * $p < 0.05$.

2. Daño celular inducido por la t-MCAO

La evaluación del daño celular inducido por la isquemia cerebral focal, fue analizado a través de las técnicas histológicas: tinción de FJ-B y Violeta de Cresilo. La técnica de FJ-B permite detectar células en proceso de degeneración, mientras que el Violeta de Cresilo permite visualizar el volumen de lesión.

3.1 Detección de células FJ-B positivas

En la figura 13A se muestran imágenes representativas de tejidos teñidos con FJ-B en la región de la corteza parietal caudal y el estriado medial de los diferentes grupos. En el grupo Sham, la marca a FJ-B es nula en ambas regiones como era de esperarse. Sin embargo, la t-MCAO indujo un aumento en la abundancia de células FJ-B positivas tanto en el estriado medial como en la corteza parietal. El tratamiento con BHB disminuyó el número de células FJ-B positivas en la corteza parietal caudal. En la misma figura 13 se muestran los datos del conteo de células FJ-B positivas, como la media \pm el ES, así como los datos individuales (Figura 13B). Estas fueron cuantificadas en la zona de penumbra, la corteza parietal como se describe en la metodología. Como era de esperarse, en conteo piloto se observó que el tratamiento con BHB no reducía en el número de células dañadas en el

estriado que representa el foco de la lesión isquémica, por lo que no se hizo el conteo en esta región.

El número promedio de células FJ-B positivas en el grupo t-MCAO-VEH (n=5) fue de 2747.40 ± 476.62 , cifra elevada en comparación con el grupo t-MCAO-BHB (n=5) que fue de 1013.00 ± 280.324 (Figura 13 B). Los datos individuales se muestran en el lado derecho de la figura 13B en donde se observa una alta variabilidad entre los animales del grupo t-MCAO-VEH, puesto que, tres animales tienen un número de células FJ-B positivas mayor a 2000 (3283 y 4315, respectivamente) mientras que los otros dos animales obtuvieron un número menor a 2000 (1865 y 1766, respectivamente). Esta variabilidad también tiene lugar en el grupo t-MCAO-BHB, sin embargo, el número de células FJ-B positivas siempre fue menor a 2000 (1573, 1508, 1198 y 73). Lo anterior demuestra que el tratamiento con el cuerpo cetónico BHB es capaz de disminuir el número de células en proceso de degeneración inducido por la t-MCAO.

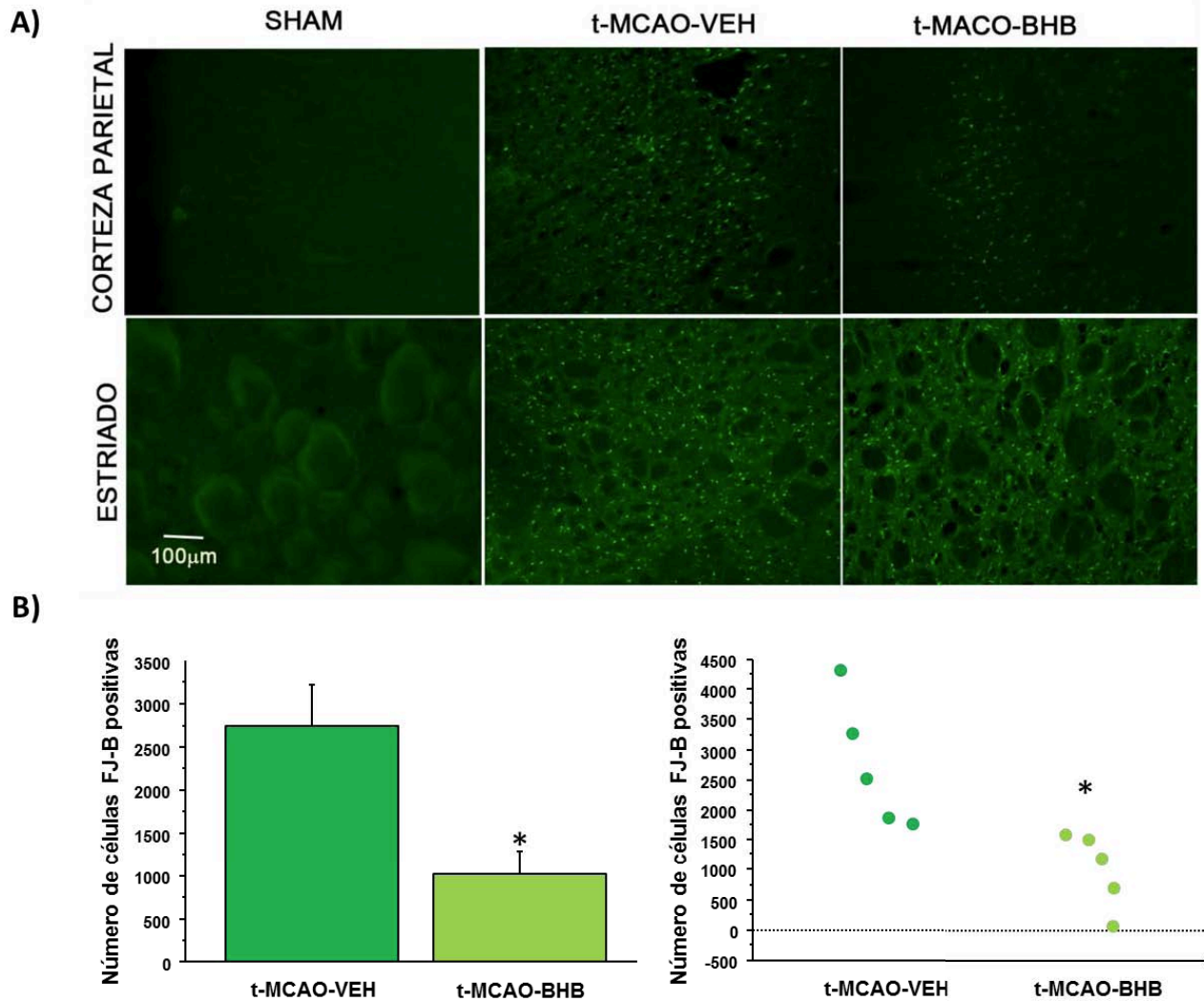


Figura 13.- Efecto del BHB sobre el número de células FJ-B positivas inducido por la t-MCAO. En **A**, se muestran imágenes representativas de la marca positiva a FJ-B en tejidos de la corteza parietal y estriado de los grupos: Sham, t-MCAO-VEH y t-MCAO-BHB. En **B**, se muestra que el número de células FJ-B positivas disminuye con el tratamiento con BHB. Los datos corresponden a la media grupal \pm ES, así como los datos individuales. t-MCAO-VEH n=5, t-MCAO-BHB n=5 ANOVA post-hoc de Fisher's; * $p < 0.05$.

3.2 Medición del volumen de lesión

En el modelo de isquemia cerebral focal, la tinción con violeta de cresilo, permitió dilucidar que el daño causado por la t-MCAO, el cual se extendió desde los 4.68 mm hasta -4.80 mm respecto a bregma, abarcando la corteza cerebral parietal y el cuerpo estriado (Figura 14). Sin embargo, cuando los animales fueron tratados

con el cuerpo cetónico BHB, la extensión del daño disminuyó, comprendido desde los 2.28 mm hasta -2.30 mm respecto a bregma (Figura 14).

Los datos cuantitativos del volumen de lesión se muestran en la figura 15B, donde se puede observar que el volumen de lesión del grupo t-MCAO-VEH (n=8) en promedio es de $121.53 \text{ mm}^3 \pm 20.87$, mientras que el volumen de lesión del grupo t-MCAO-BHB (n=5) fue significativamente menor con $40.60 \text{ mm}^3 \pm 14.35$. En el lado derecho de la misma imagen se muestran los datos individuales donde se observa que los datos del grupo tratado con vehículo tienen alta variabilidad, sin embargo, la mayoría de los animales presentan un volumen de lesión mayor a 90 mm^3 (214.61, 170.30, 169.67, 119.47 y 94.09 mm^3) y solo dos animales presentaron un volumen de lesión menor a 90 mm^3 (59.33 y 44.24 mm^3). Mientras que los datos de los animales del grupo tratado con BHB exhiben una menor variabilidad y todos están por debajo de 90 mm^3 (73.42, 71.21, 41.89, 10.18 y 6 mm^3).

Dicho efecto protector también se observó a nivel morfológico. En la figura 15A, se muestran imágenes representativas de tejidos teñidos con violeta de cresilo de la corteza parietal y el estriado medial de los diferentes grupos. La morfología de las células en el grupo Sham es normal mostrando células grandes con citoplasma claramente visible; contrariamente, en el grupo t-MCAO-VEH se muestra una pérdida celular y un cambio en la morfología de las células en ambas regiones, las cuales se observan principalmente picnóticas y con una forma más geométrica. Dichas alteraciones lograron ser revertidas en el grupo tratado con el BHB principalmente en el área de la corteza parietal.

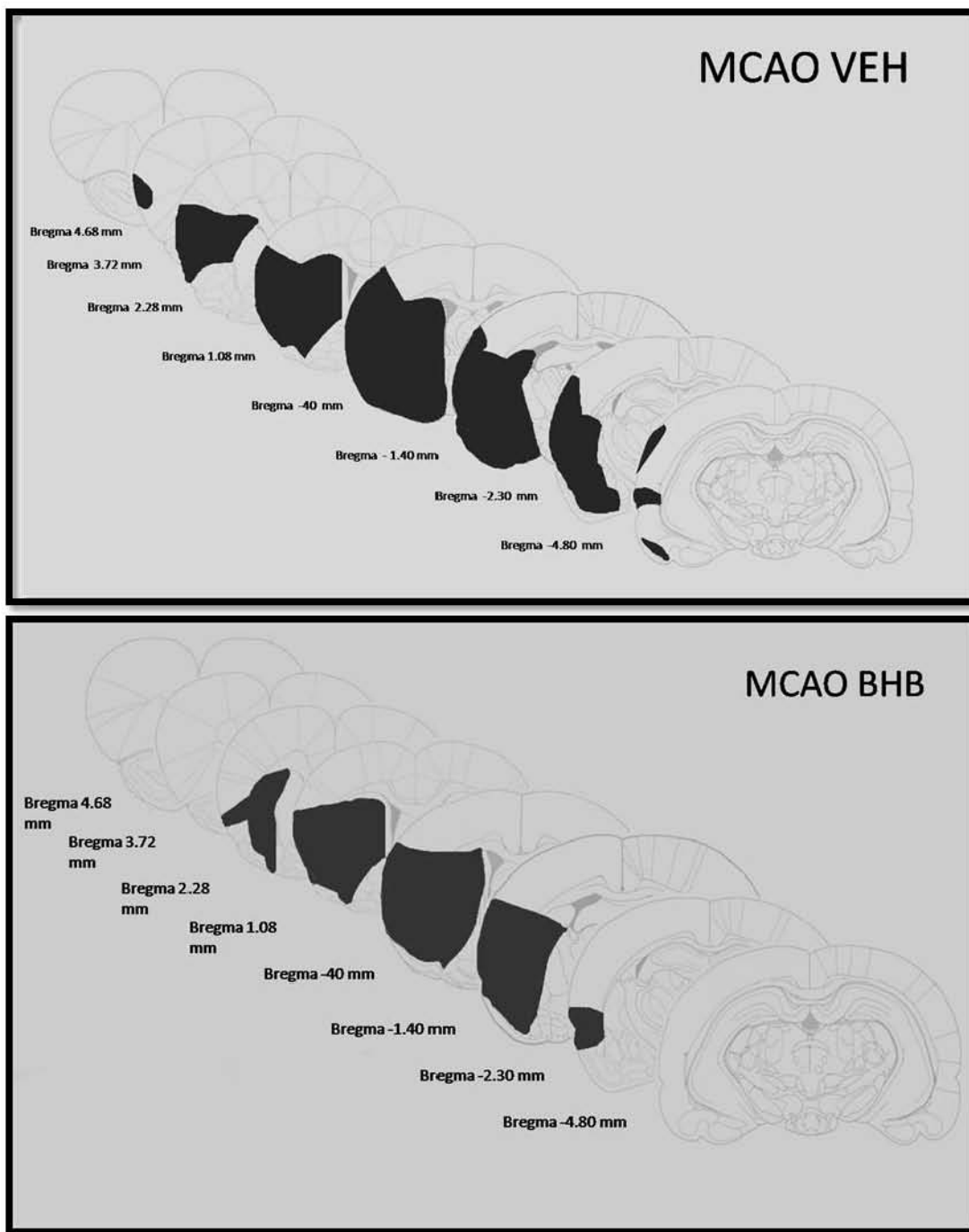


Figura 14.- Representación esquemática de la distribución del daño inducido por la t-MCAO. Se observa que el tratamiento con BHB disminuye la extensión del daño inducido por la t-MCAO.

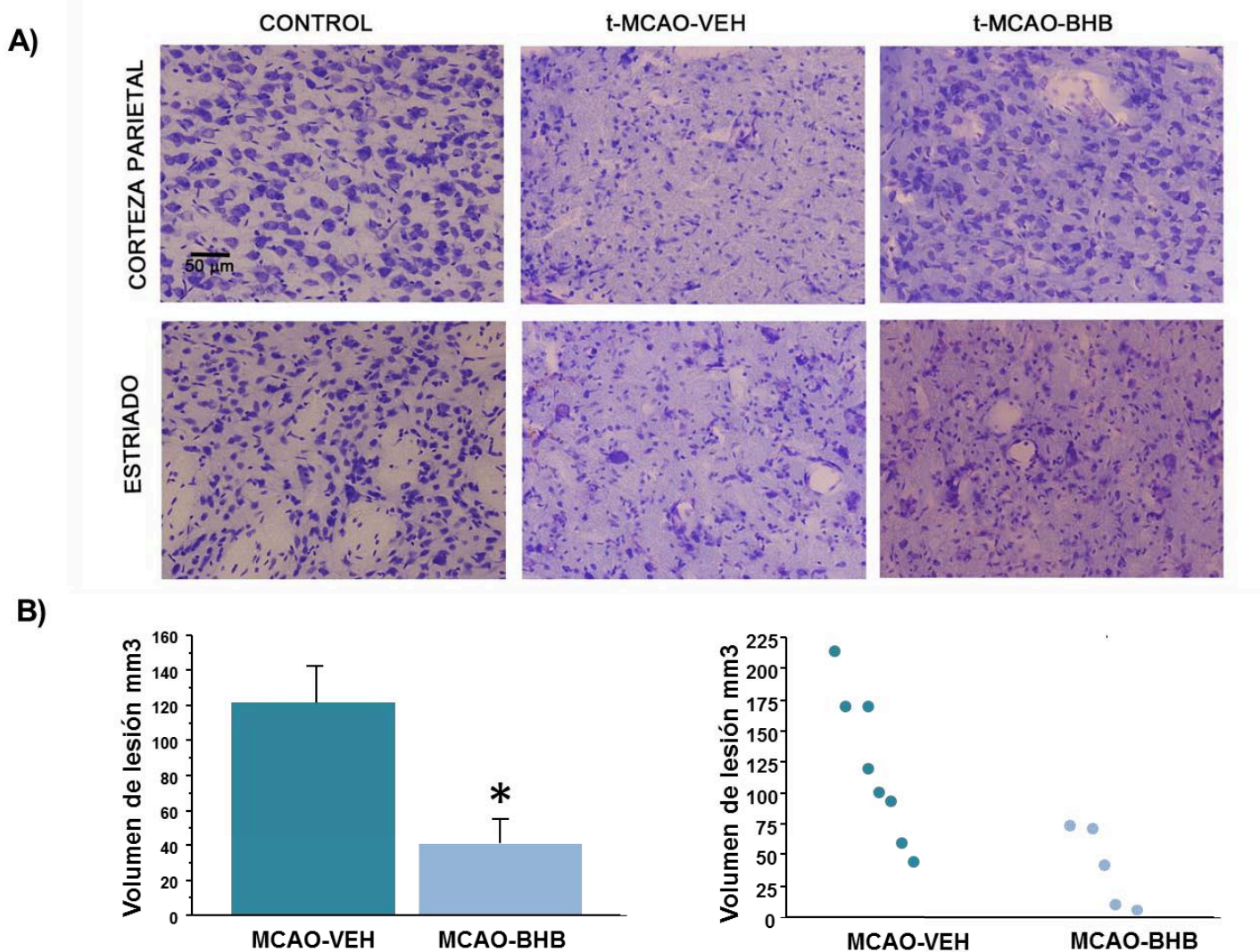


Figura 15.-Efecto del BHB sobre el volumen de lesión inducido por la t-MCAO. En **A**, se muestran imágenes representativas de tejidos teñidos con violeta de cresilo de los diferentes grupos. En **B**, se observa que el tratamiento con BHB reduce el volumen de lesión de manera significativa; NMDA-VEH n=8, NMDA-BHB n=5. Los datos corresponden a la media \pm ES, así como los datos individuales. ANOVA post-hoc de Fisher's; * $p < 0.05$.

4. Daño celular inducido por la inyección de NMDA

Para la evaluación del daño celular inducido por la administración de NMDA se siguió el mismo protocolo. En la figura 16A se muestra una reconstrucción del tejido estriatal teñido con FJ-B de animales representativos de los grupos tratados

y no tratados con BHB, con dos ampliaciones de la misma en el área dorsal y lateral del estriado, así como una imagen panorámica de su tejido homólogo teñido con violeta de cresilo. En dicha imagen se observa como el tratamiento con BHB disminuye la marca de células FJ-B positivas y el área de células picnoticas al igual que en el modelo de isquemia cerebral focal. En la misma figura se muestran los datos cuantitativos del conteo de células FJ-B positivas y el volumen de lesión, como la media + ES (Figura 16B, 16C).

El tratamiento con el cuerpo cetónico redujo de manera significativa el número de células en proceso de degeneración. Siendo el número promedio de células FJ-B positivas del grupo NMDA-VEH (n=5) de 14500.6 ± 631.1 y para el grupo NMDA-BHB (n=5) de 7996.4 ± 1175.5 (Figura 16B). Por otra parte, se observa que volumen de lesión del grupo NMDA-VEH (n=5) en promedio es de $23.286 \pm 1.606 \text{ mm}^3$ mientras que el volumen de lesión del grupo NMDA-BHB (n=5) fue significativamente menor con $8.381 \pm 1.316 \text{ mm}^3$ (Figura 16C). Demostrando con lo anterior la capacidad del BHB de proteger en contra del daño excitotóxico inducido por la administración del NMDA.

Una vez demostrado el efecto protector del BHB en ambos modelos, se procedió a investigar si uno de los mecanismos implicados en dicha protección era la facilitación del flujo autofágico. Para esto primero se realizó un monitoreo en homogenados del estriado mediante análisis de Western blot de los marcadores de iniciación, maduración y degradación de autofagia a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la administración de NMDA con el objetivo de conocer la dinámica de la autofagia durante el daño excitotóxico. Cabe destacar que para estos experimentos se usó como control el estriado del hemisferio contralateral a la inyección de cada animal tratado con NMDA, el cual en principio se encuentra inalterado.

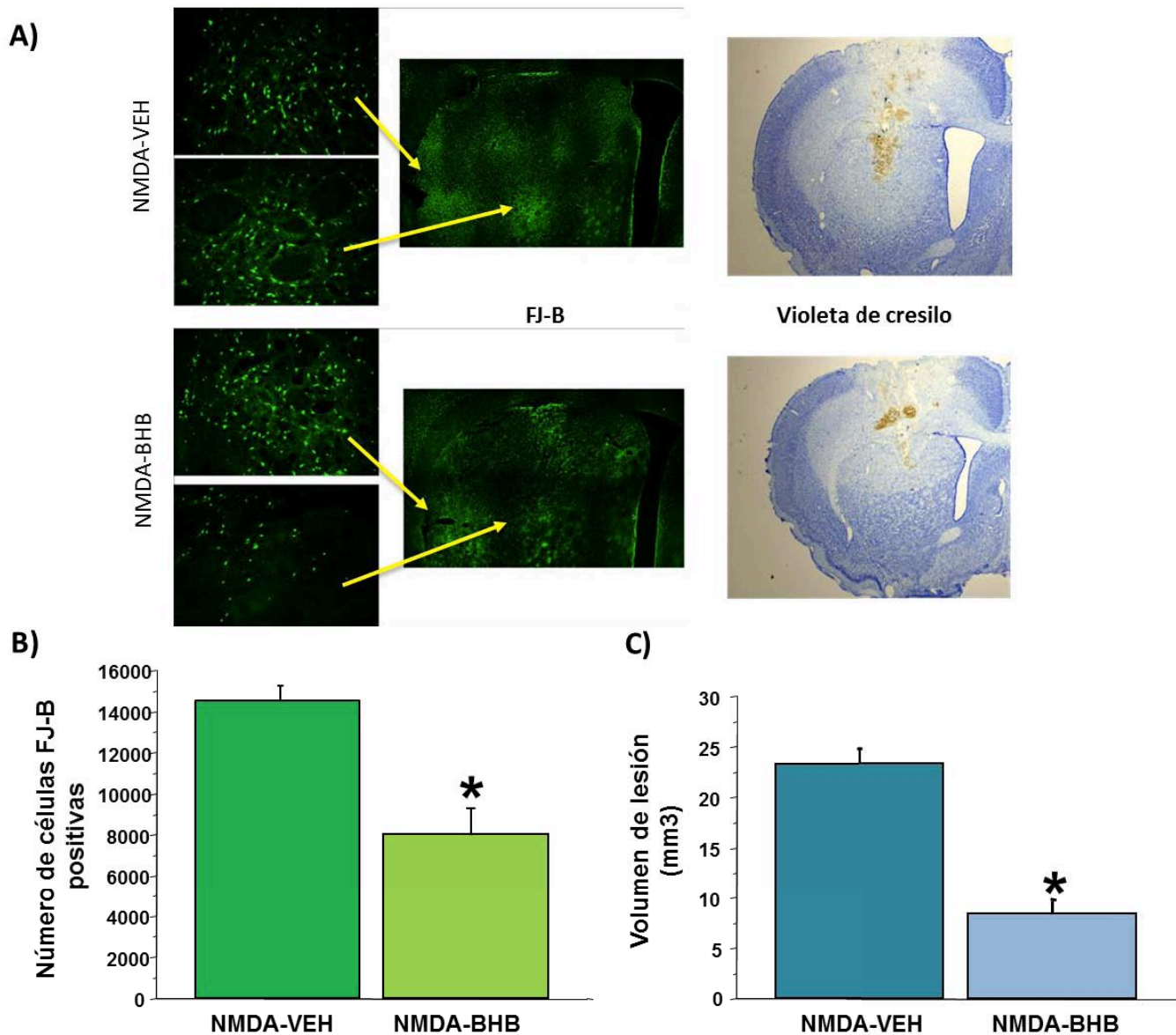


Figura 16.- Efecto del BHB sobre el daño celular inducido excitotóxico. En **A**, se muestran reconstrucciones de tejidos teñidos con FJ-B y Violeta de cresilo, tratados o no con BHB. En **B** y **C** se observa que el tratamiento con BHB reduce el número de células FJ-B positivas de manera significativa al igual que el volumen de lesión. Los datos corresponden a la media \pm ES; NMDA-VEH $n=5$, NMDA-BHB $n=5$. ANOVA post-hoc de Fisher's; $*p < 0.05$.

5. Inducción del proceso autofágico por la administración de NMDA

Como se había mencionado anteriormente el proceso autofágico consta de tres etapas: iniciación, elongación/maduración y degradación. En la etapa de iniciación es indispensable que la proteína BECN1 se una a otras proteínas

(PtdIns3KIII y PIK3R4) para formar al complejo PtdIns3k encargado del reclutamiento de proteínas autofágicas implicadas en etapas posteriores. Por lo que un aumento en los niveles de BECN1 sobre el basal es interpretado como una inducción del proceso autofágico. En la figura 17A, se muestra que a pesar de que se observa una tendencia de aumento entre las 3 y 12 horas, y una disminución a las 24 horas posteriores a la administración de NMDA de los niveles de BECN1, no se observan cambios significativos entre los diferentes tiempos, ni respecto al hemisferio contralateral. Esto podría interpretarse como que el daño excitotóxico no induce un aumento de la autofagia, sin embargo, hay que tener en cuenta que BECN1 normalmente se encuentra unida a la proteína Bcl-2, de la cual debe ser disociada para formar el complejo PtdIns3k e iniciar la autofagia (Wei, *et al.*, 2008) y que la técnica utilizada para este estudio es incapaz de discernir entre la BECN1 unida a PtdIns3KIII/PIK3R4 o Bcl-2, por lo que lo que el análisis de esta proteína no es suficiente para decir que existe o no una inducción de autofagia por el daño mediado por el NMDA.

La conversión de LC3-I a LC3-II es indispensable para la formación del fagóforo y la maduración del autofagosoma, y a diferencia de otras proteínas implicadas en esta etapa, LC3-II permanece unida al autofagosoma maduro, por lo que es un buen marcador de la etapa de maduración de la autofagia. A diferencia de BECN1, los niveles de LC3-II aumentaron significativamente a la 3, 6, 12 y 24 horas con respecto al hemisferio contralateral. Además, se observa que los niveles más elevados son alcanzados entre las 3 y 6 horas post NMDA y que a las 12 y 24 horas estos niveles bajan de manera significativa (Figura 17B). Interesantemente este patrón se repitió en el hemisferio contralateral, aunque los resultados no son diferentes estadísticamente (Figura 17B).

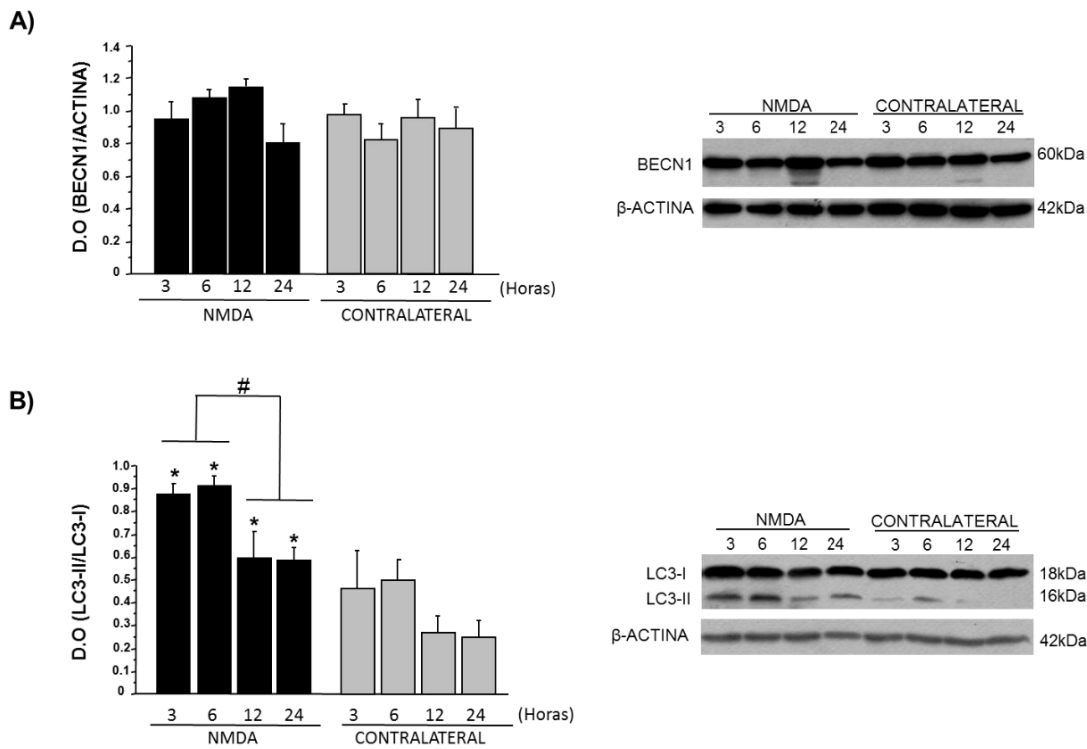


Figura 17.- Curso temporal de marcadores de iniciación y maduración de la autofagia post administración de NMDA. Los niveles de proteínas de BECN1 y LC3-II fueron detectados por Western blotting a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la inyección de NMDA, en el estriado del hemisferio inyectado y del hemisferio contralateral. **A)** Expresión de BECN1 corregido por β -Actina, **B)** Expresión de LC3-II corregido por LC3-I. Los datos corresponden a la media \pm ES. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo. NMDA 3 hr n=5, NMDA 6hr n=5, NMDA 12hr n=3, NMDA 24 hr n=3. ANOVA post-hoc de Fisher's; * $p < 0.05$ vs Contralateral. # $p < 0.05$

Estudios recientes han resaltado la importancia de una buena interpretación del marcador autofágico LC3-II, puesto que esta proteína no solo se genera durante la autofagia, sino que también es degradada en la etapa final de la misma. Por lo que un aumento en los niveles de este marcador, podrían significar un aumento del proceso autofágico o bien un bloqueo en la degradación autofágica basal (Kulbe *et al.*, 2014). Por esta razón se decidió analizar como marcador de flujo autofágico a la proteína p62/SQSTM1, una proteína receptora de cargo autofágico que no necesita síntesis de novo para que se lleve a cabo la autofagia y que es degradada

durante la etapa final. Una disminución en los niveles basales de esta proteína indican flujo autofágico.

Los datos obtenidos de estos experimentos mostraron que los niveles de p62/SQSTM1 en el hemisferio contralateral disminuyen con respecto al grupo control intacto, desde las 3 horas siendo significativo a las 12 y 24 horas post NMDA indicando flujo autofágico en dicho hemisferio (Figura 18). En contraste, en el hemisferio inyectado a las 3 y 6 horas post NMDA no se ven cambios en los niveles de la proteína p62/SQSTM1 respecto al control, a pesar de que a estos tiempos se detectan niveles elevados de LC3-II. Estos resultados sugieren que el flujo autofágico está bloqueado a estos tiempos. No obstante, a tiempos posteriores, si se observa una disminución en los niveles de p62/SQSTM1, lo cual podría sugerir la restauración del flujo autofágico a las 12 y 24 horas post NMDA. Sin embargo, dado el daño existente a las 24 horas post NMDA (Figura 16A) la disminución de los niveles de los marcadores de autofagia a estos tiempos podría deberse a la muerte celular (Figura 17 A-B, Figura 18).

Dicha incógnita podría ser resuelta con la utilización de inhibidores de la actividad lisosomal tales como la cloroquina, con el cual esperaríamos observar un incremento sobre los niveles basales de p62/SQSTM1 en los tiempos posteriores a la administración de NMDA si existe flujo autofágico en estas condiciones.

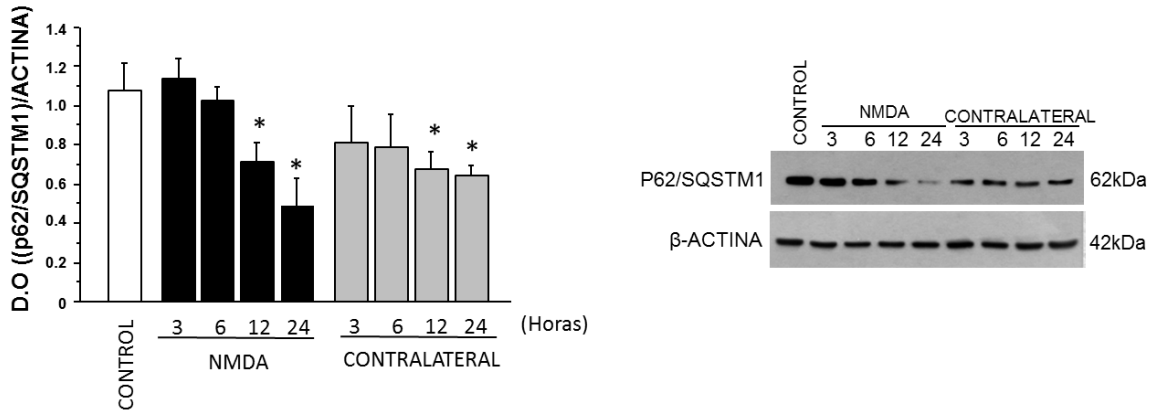


Figura 18.- Curso temporal del marcador de degradación de autofagia p62 post administración de NMDA. Los niveles de proteínas p62/SQSTM1 fueron detectados por Western blot y corregidos por β -actina a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la inyección de NMDA, en el estriado del hemisferio inyectado y del hemisferio contralateral. Los datos corresponden a la media \pm ES. Se muestra un blot representativo del análisis cuantitativo. CONTROL n=4, NMDA 3 hr n=5, NMDA 6hr n=4, NMDA 12hr n=3, NMDA 24 hr n=3. ANOVA post-hoc de Fisher's $*p < 0.05$ vs CONTROL.

6. Efecto del BHB sobre el proceso autofágico

En base a los datos obtenidos del curso temporal de los cambios en los marcadores de autofagia, se resolvió investigar los efectos del BHB sobre la autofagia a las 3 y 6 horas posteriores a la administración de NMDA. El BHB no tuvo efecto alguno sobre los niveles de BECN1 ni a las 3 ni a las 6 h después de la administración de NMDA. Por el contrario, el incremento en LC3-II observado a las 3 y a las 6 horas después de administración de NMDA respecto al control ($p < 0.0001$) (Figura 19B y Figura 20B), fue atenuado por el tratamiento con BHB a las 3 horas ($*p < 0.0231$) y de manera más marcada a las 6 horas ($*p < 0.0112$) post NMDA. Por su parte, los niveles de p62/SQSTM1 no cambiaron con respecto al control ni a las 3 ni a las 6 h y el tratamiento con BHB no los modificó (Figura 19C y Figura 20C). Estos resultados sugieren que el BHB es capaz de prevenir la acumulación de autofagosomas inducida por la inyección de NMDA. La ausencia de

disminución de p62/SQSTM1 acompañada del aumento de LC3-II sugiere un bloqueo del flujo autofágico a las 3 y 6 h post-NMDA. Sin embargo, el BHB no indujo una disminución en el contenido de esta proteína, por lo que no se pudo confirmar que el BHB estimule el flujo autofágico en este modelo.

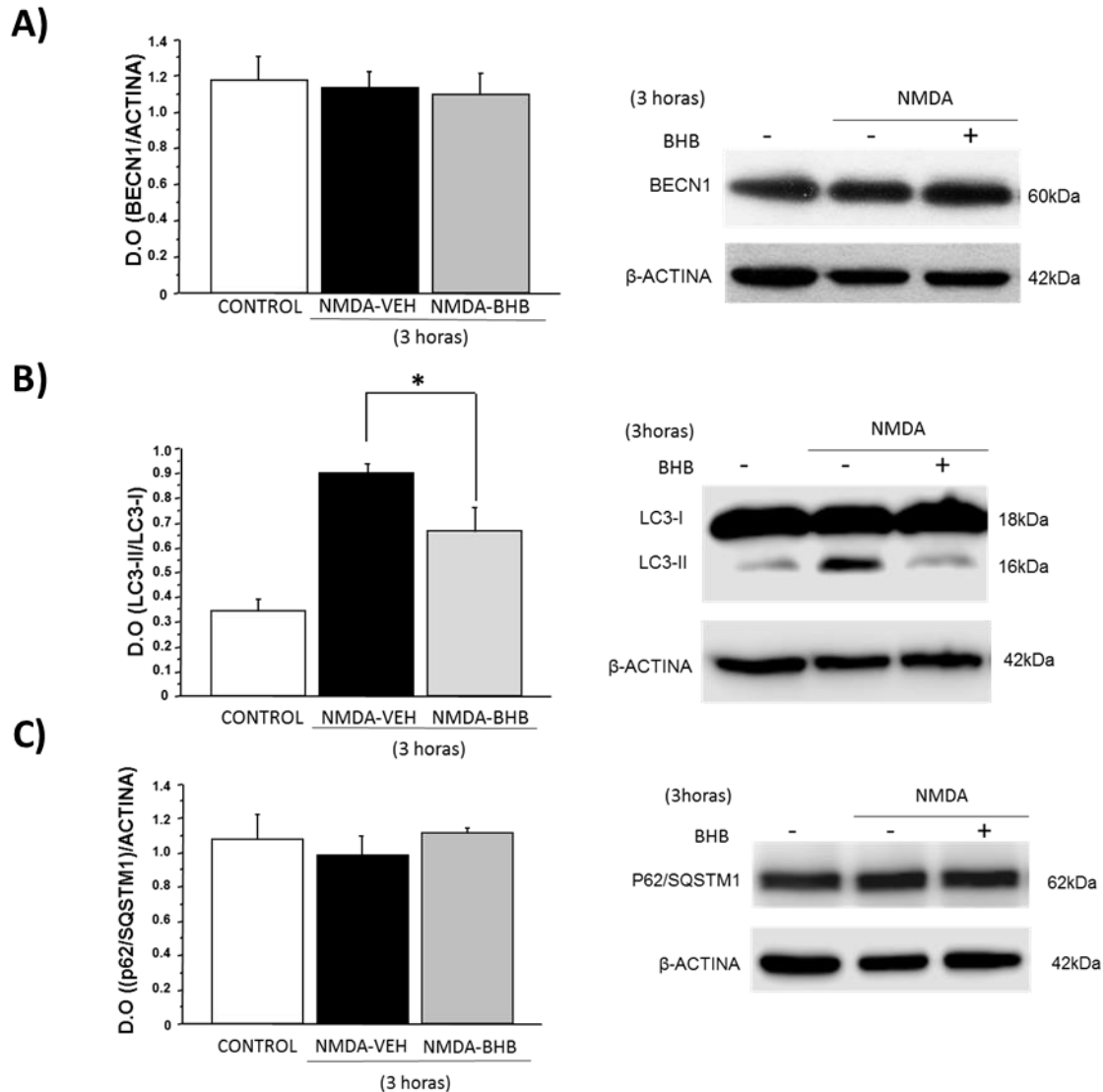


Figura 19.- Efecto del BHB sobre los marcadores de autofagia 3hr post NMDA. Los niveles de proteínas de BECN1, LC3-II, y p62/SQSTM1 fueron detectados por Western blot a las 3 hr después de la inyección de NMDA en el estriado de animales tratados o no con BHB. **A)** Expresión de BECN1 corregido por β -Actina, **B)** Expresión de LC3-II corregido por LC3-I, **C)** Expresión de p62/SQSTM1 corregido por β -Actina. Los datos corresponden a la media \pm ES. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo. CONTROL n=4, NMDA-VEH n=5, NMDA-BHB n=5. ANOVA post-hoc de Fisher's; * $p < 0.05$ vs. NMDA-VEH.

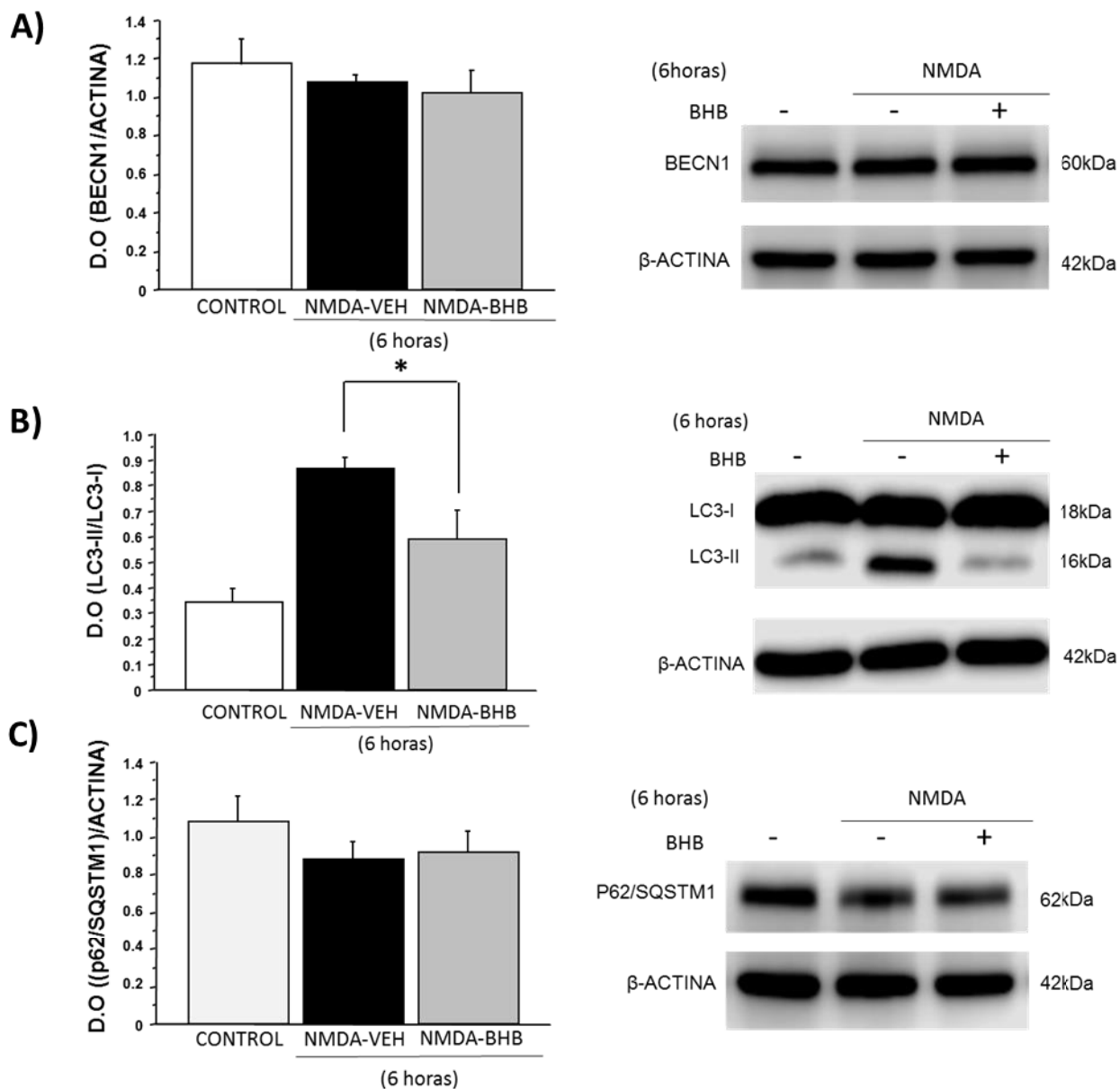


Figura 20.- Efecto del BHB sobre los marcadores de autofagia 6hr post NMDA. Los niveles de proteínas de BECN1, LC3-II, y p62/SQSTM1 fueron detectados por Western blot a las 6 hr después de la inyección de NMDA en el estriado de animales tratados o no con BHB. **A)** Expresión de BECN1 corregido por β -Actina, **B)** Expresión de LC3-II corregido por LC3-I, **C)** Expresión de p62/SQSTM1 corregido por β -Actina. Los datos corresponden a la media \pm ES. Se muestra así un blot representativo de cada análisis cuantitativo. CONTROL n=4, NMDA-VEH n=5, NMDA-BHB n=5. ANOVA post-hoc de Fisher's; * $p < 0.05$ vs. NMDA-VEH

7. Inducción de la autofagia por la t-MCAO y efecto del BHB

El contenido de las proteínas de autofagia fue analizado en el área de la penumbra (corteza parietal caudal) 3 h después de la isquemia cerebral en animales tratados y no tratados con BHB. En cuanto a la transformación de LC3-I en LC3-II, los resultados indican que ésta aumenta significativamente a las 3 h después de la isquemia, lo que coincide con una disminución en el contenido de p62/SQSTM1, sugiriendo un flujo autofágico activo a este tiempo (Figura 21). Los animales tratados con BHB mostraron un aumento menor en el contenido de LC3-II y una disminución ligeramente mayor de p62/SQSTM1 en relación a los animales no tratados sugiriendo que el BHB facilita el flujo autofágico. Sin embargo, estos datos no presentan significancia estadística.

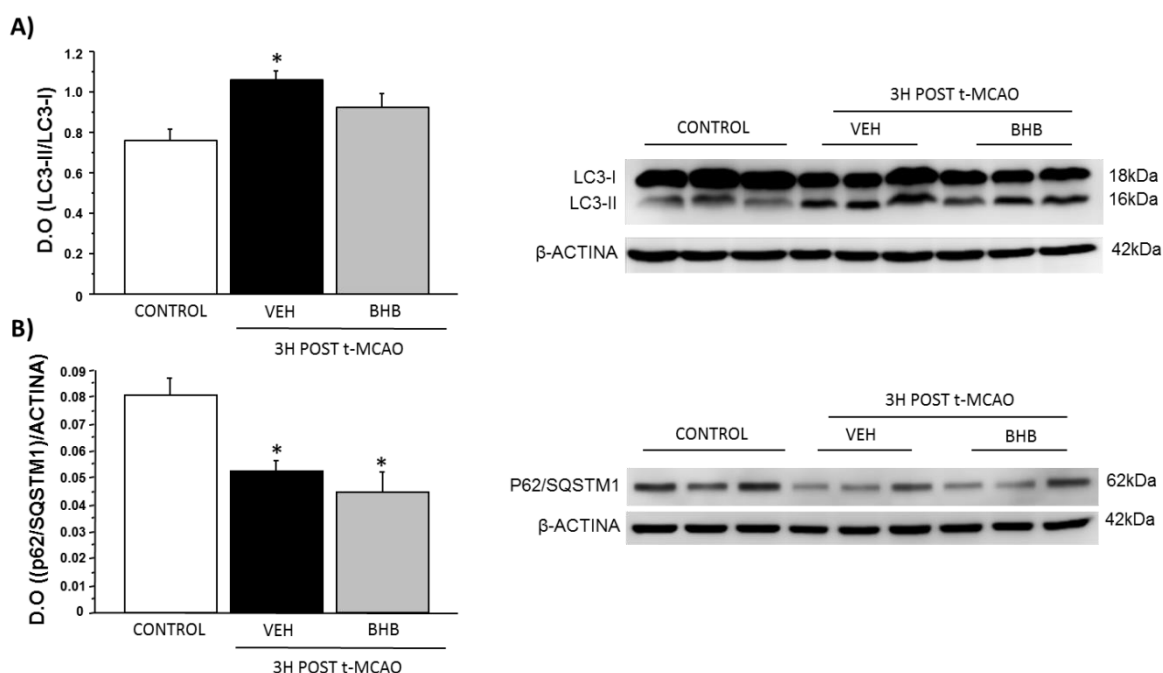


Figura 21.- Efecto del BHB sobre los marcadores de autofagia 3hr post t-MCAO. Los niveles de proteínas de LC3-II, y p62/SQSTM1 fueron detectados por Western blot a las 3 hr después de la t-MCAO en la corteza parietal caudal de animales tratados o no con BHB. **A)** Expresión de LC3-II corregido por LC3-I, **B)** Expresión de p62/SQSTM1 corregido por β -Actina. Los datos corresponden a la media \pm ES. Se muestra así un blot representativo de

cada análisis cuantitativo. CONTROL n=4, t-MCAO-VEH n=3, t-MCAO-BHB n=3. ANOVA post-hoc de Fisher's; * $p < 0.05$ vs. CONTROL

V. Discusión

El cuerpo cetónico BHB, es una molécula energética que puede ser utilizada por las células cerebrales en condiciones en las que el aporte de glucosa se encuentra comprometido, tales como la isquemia cerebral (Takahashi *et al.*, 2014; Amilpas *et al.*, 2015). La administración exógena de BHB o la inducción de su síntesis a través de una dieta cetogénica, ha demostrado tener efectos protectores en contra de la isquemia cerebral focal (Suzuki *et al.*, 2002; Puchowicz, *et al.*, 2008). En este estudio hemos demostrado que la administración de BHB después de iniciado el periodo de reperfusión, disminuye el volumen de lesión, el número de células en degeneración y el déficit motor inducido por t-MCAO, además, de incrementar el porcentaje de sobrevivencia de los animales expuestos a esta cirugía (Figura 11-15). Estos datos apoyan el potencial de esta molécula como agente terapéutico para daño isquémico, que actualmente es la segunda casusa de muerte y la tercera en causa de discapacidad a nivel mundial.

El mecanismo subyacente a este efecto protector aún no está del todo claro. La capacidad BHB de producir dos moléculas de acetil-CoA mediante un proceso denominado cetólisis, las cuales pueden incorporarse al ciclo de Krebs y restaurar los niveles energéticos, fue uno de los principales mecanismos de acción propuestos en el efecto protector del cetónico. Suzuki y colaboradores, en un modelo de isquemia global inducida por la ligación de la arteria carótida común bilateral (BLCL), observaron una disminución significativa en los niveles cerebrales de ATP tres horas después de la BCCL, la cual se previno con la administración de BHB (Suzuki *et al.*, 2001), corroborando el efecto metabólico del cuerpo cetónico en estas condiciones patológicas. Por otra parte, varias líneas de investigación han demostrado la capacidad del BHB de mejorar la función mitocondrial, incrementar el cociente NAD/NADH (Maalouf *et al.*, 2007), tener función de atrapador de ROS (Haces *et al.*, 2008), inhibir la activación del inflamósoma NLRP3 (Youm *et al.*, 2015), inducir cambios epigenéticos relacionados con la defensa antioxidante (Shimazu *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2016) y la facilitar del flujo

autofágico (Camberos *et al.*, 2016), sugiriendo que BHB podría tener otras acciones además de servir como sustrato energético.

La autofagia es un proceso catabólico encargado de la degradación y el reciclaje de componentes citoplasmáticos como proteínas u organelos dañados para mantener la homeostasis celular. Durante la isquemia cerebral la autofagia es inducida como una respuesta de sobrevivencia, sin embargo, se ha sugerido que en estas condiciones el proceso autofágico ocurre de manera aberrante no pudiendo llevarse a cabo eficientemente la fase de degradación (Liu *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2014), desencadenando un fallo en el flujo autofágico. El flujo autofágico es referido a el proceso de formación de autofagosomas seguido de la fusión autofagosoma-lisosoma y la degradación del contenido autofagosomal; un bloqueo del flujo autofágico en etapas tardías resultaría en la acumulación excesiva de autofagosomas, mientras que si las alteraciones fueran en etapas tempranas la formación de autofagosomas podría no concluirse o bien no iniciarse conduciendo en ambos casos a la acumulación de organelos y proteínas dañadas lo cual podría dar lugar a la muerte celular (Sarkar *et al.*, 2014).

Nuestros resultados sugieren que el daño excitotóxico induce un bloqueo en el flujo autofágico a las 3 y 6 horas post NMDA (Figura 17B y Figura 18). Estos datos concuerdan con lo reportado por Sadasiban y colaboradores en el 2010, quien en cultivos de células granulares expuestos a 200 μ M de NMDA por 6, 12 y 24 horas, observó por ensayos de Western blot, un aumento significativo de los niveles de proteína de BECN1 y LC3-II desde las 3 horas después de la exposición a NMDA, mismos que se mantuvieron hasta las 24 horas. Al utilizar un inhibidor de proteasas lisosomales “E64d” (necesarias para la etapa de degradación de la autofagia) no observaron un efecto acumulativo en los niveles de LC3-II, sugiriendo un fallo en la actividad lisosomal y por ende en la fase de degradación de la autofagia. Por su parte Kulbe y colaboradores en el 2014 en cultivos de neuronas hipocampales expuestos a 100 μ M de glutamato también observaron que el proceso autofágico se encontraba bloqueado en la fase de degradación, al utilizar tatCN2, un inhibidor de proteasas y no observar efectos acumulativos en p62/SQSTM1.

Los resultados de este estudio demostraron que la administración del BHB, revierte el aumento en los niveles de la proteína LC3-II, inducido por el bloqueo autofágico desencadenado por la administración de NMDA (Figura 19 B y Figura 20B). Sin embargo, no se pudo demostrar un aumento de la degradación de p62/SQSTM1 en los animales tratados con BHB, sugiriendo que el efecto del BHB sobre la autofagia podría ser en la formación de autofagosomas y no en la degradación de su contenido.

Una vía por la cual el BHB podría disminuir la inducción de la autofagia es la disminución de los estímulos de estrés que la anteceden. Sabemos que el proceso autofágico es desencadenado por una serie de estímulos como el estrés energético, estrés del retículo endoplásmico, el estrés oxidativo y el daño mitocondrial (Kroemer *et al*, 2010). La estimulación de la autofagia subsecuente al estrés energético depende de la cinasa AMPK, la cual es activada por la disminución en los niveles de ATP y es capaz de fosforilar a mTOR, la cual se disocia del complejo ULK-1 y se activa el complejo BECN1/PtdIns3KIII promoviendo la iniciación de la autofagia (Rabinowitz y White, 2010; Menzies *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la administración de BHB mantiene los niveles de ATP durante una falla energética (Suzuki *et al.*, 2001; Amilpas *et al.*, 2015) por lo que podría disminuir la actividad de AMPK y con ello la inducción de la autofagia.

Por su parte, el estrés oxidativo induce autofagia a través de múltiples vías. Entre ellas la activación de la proteasa ATG4 y de la cinasa JNK1 involucradas en la maduración proteolítica de la proteína LC3 y la disociación del complejo BECN1/Bcl2 respectivamente, pasos esenciales para la iniciación autofágica (Kroemer *et al*, 2010). Amilpas y colaboradores en el 2015 demostraron la capacidad del BHB de disminuir el estrés oxidativo, lo cual podría regular negativamente la inducción autofágica. Es decir, al restaurar el estado energético y aliviar el estrés oxidativo, el BHB induciría menos formación de autofagosomas de manera indirecta, lo cual podría permitir la correcta degradación de los autofagosomas formados, facilitando el flujo autofágico a tiempos posteriores.

Cabe destacar que para corroborar estos resultados se necesitan hacer otra serie de experimentos: 1) Analizar el efecto del BHB sobre los marcadores de

autofagia a las 12 y 24 horas después de la inyección de NMDA para ver si a este tiempo puede observarse un efecto mayor del BHB, 2) Administrar CQ en los animales tratados o no con BHB para inhibir la degradación lisosomal y corroborar si el flujo autofágico está bloqueado (no mayor acumulación p62/SQSTM1) después de la administración de NMDA. En los animales tratados con BHB se esperaría ver mayor acumulación de p62/SQSTM1 si es que ésta molécula estimula el flujo autofágico, 3) Analizar el efecto del BHB sobre los marcadores de autofagia en la corteza cerebral (región que también se daña por la administración de NMDA, pero de una manera menos severa) y en el tejido contralateral ya que como se muestra en las figuras 17 y 18 también se induce autofagia, por lo que el BHB podría estimular el flujo autofágico en estas zonas.

Finalmente se demostró que la autofagia es inducida tempranamente, tres horas después de la t-MCAO, ya que se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína LC3-II y una disminución significativa en los niveles de p62/SQSTM1 sugiriendo un flujo autofágico activo (Figura 21). Esta observación es contraria a lo observado por Liu y colaboradores en el 2010, quien al utilizar CQ no observaron acumulación de los niveles de LC3-II en animales expuestos a isquemia global durante 20 minutos, sugiriendo el bloqueo del flujo autofágico. Sin embargo, en este trabajo los análisis se realizaron 24 horas después del periodo isquémico lo cual podría explicar la discrepancia con nuestros resultados. Por esta razón, sería importante explorar tiempos tardíos después de la t-MCAO. Por otro lado, al tratar con BHB, el aumento en los niveles de LC3-II inducidos por la t-MCAO fue menor y no fue significativamente diferente al grupo control, asimismo la disminución de p62/SQSTM1 fue ligeramente mayor en el grupo t-MCAO-BHB en relación al grupo t-MCAO-VEH sugiriendo la estimulación del flujo autofágico, aunque la diferencia no fue significativa. Es necesario confirmar estos resultados aumentando el tamaño de la muestra, ya que hasta el momento sólo se incluyeron en el análisis de 3 a 4 animales por grupo.

VI. Conclusiones

En conclusión, los datos sugieren que el BHB previene la acumulación de autofagosomas en los dos modelos in vivo de año agudo, aunque son necesarios más experimentos para corroborar si esta molécula evita la acumulación de autofagosomas por la estimulación del flujo autofágico como ya fue reportado in vitro. Así mismo se corroboró el efecto protector del BHB en contra del daño inducido por la t-MCAO y la administración de NMDA apoyando su papel como agente terapéutico para la isquemia cerebral.

Bibliografía

- Adhami, F. *et al.*, (2006), *Cerebral Ischemia-Hypoxia Induces Intravascular Coagulation and Autophagy*, *The American Journal of Pathology* 169:256-283.
- Amilpas, A. *et al.*, (2015), *Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 35: 851-860.
- Bélanger, M. *et al.*, (2011), *Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation*, *Cell Metabolism* 14: 724-738.
- Buckley, K. *et al.*, (2014), *Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke*, *Exp Transl Stroke Med* 21:1-9
- Blázquez, C. *et al.*, (1999), *The AMP-Activated Protein Kinase Is Involved in the Regulation of Ketone Body Production by Astrocytes*, *J. Neurochem.* 73: 1674–1682.
- Brailowsky, S. *et al.*, (1986), *γ -Aminobutyric Acid-Induced Potentiation of Cortical Hemiplegia*, *Brain Research* 362: 322-330.
- Bramlett, H. y Dietrich, D., (2004). *Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 24:133–150.

- Bretón, R. y Rodríguez, G., (2012), Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke, *Acute Ischemic Stroke* :29-58.
- Camacho, A. y Massieu L., (2006), Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death, *Arch Med Res* 37: 11-18.
- Camberos, L. et al., (2016), The Ketone Body, b-Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons, *Neurochem Res.* 41:600-609.
- Carloni, S. et al., (2008), Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury, *Neurobiology of Disease* 32: 329–339.
- Chomova, M. y Zitnanova, I., (2016), Look into brain energy crisis and membrane pathophysiology in ischemia and reperfusion, *The International Journal on the Biology of Stress*, 19:1-8.
- Dong, X. et al., (2009), Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Acta Pharmacologica Sinica* 30: 379–387.
- Doyle, K. et al., (2008), Mechanisms of ischemic brain damage, *Neuropharmacology* 55:310-318.
- Estrada, S. et al., (2008), Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease, *Arch Med Res* 34: 265-276.
- Feigin, V. et al., (2014), Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet* 383: 245–254.
- Gao, B. et al., (2013), The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning, *Acta Pharmacologica Sinica* 34: 657–666.
- Gao, L. et al., (2012), Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats, *PLoS One* 7: 1-13.
- Gatica, D. et al., (2016), Molecular Mechanisms of Autophagy in the cardiovascular system, *Circulation research* 116:456-467.

- Ginet, V. et al., (2009), Enhancement of Autophagic Flux after Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia and Its Region-Specific Relationship to Apoptotic Mechanisms, *The American Journal of Pathology* 175: 1962-1974.
- Haces, M. et al., (2008), Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions, *Experimental Neurology* 211: 85–96.
- Haces, M. y Massieu, L., (2005), Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia, *ArchNeurocién (Mex)* 10: 83-91.
- Jian, L. et al., (2016), The Noncompetitive AMPAR Antagonist Perampanel Abrogates Brain Endothelial Cell Permeability in Response to Ischemia: Involvement of Claudin-5, *Cell Mol Neurobiol* 36:745-53.
- Jiang, T. et al., (2015), Ischemic Preconditioning Provides Neuroprotection by Induction of AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Autophagy in a Rat Model of Ischemic Stroke, *Mol Neurobiol* 51:220-229.
- Jiang, X. et al., (2008), Activated Src Kinases Interact with the N-methyl-D-aspartate Receptor after Neonatal Brain Ischemia, *Ann Neurol* 63:632–641.
- Koike, M. et al., (2008), Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury, *The American Journal of Pathology* 172: 454-469.
- Kulbe, J. et al., (2014), Excitotoxic glutamate insults block autophagic flux in hippocampal neurons, *Brain research* 1542: 12-19.
- Kroemer, G. et al., (2010), Autophagy and the integrated stress response, *Mol cell* 40: 280-293.
- Ichimura, Y. et al., (2013), Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy, *Molecular Cell* 51:618–631.
- Lee, J. et al., (2000), Brain tissue responses to ischemia, *The Journal of Clinical Investigation* 106: 723-731.
- Li, Q. et al., (2014), Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 444: 182-188.
- Liu, C. et al., (2010), Autophagy and protein aggregation after brain ischemia, *Journal of Neurochemistry* 115: 68-78.

- Longa, E. *et al.*, (1989), Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats., Stroke 20: 84-91.
- López, L. *et al.*, (2012), Necrosis Neuronal Programada, Rev Med Uv Vol. Especial: 18-22.
- Maalouf, M. *et al.*, (2007), Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation, Neuroscience 145: 256–264.
- Masahito, K. y Midori. A., (2015), Inflammatory Responses in Brain Ischemia, Current Medicinal Chemistry 22:1258-1277.
- Massieu, L. *et al.*, (2003), Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition, Neuroscience 120: 365–378
- Margaille, I. *et al.*, (2005), Antioxidant strategies in the treatment of stroke, Free Radical Biology & Medicine 39: 429-443.
- Mejía, J. *et al.*, (2006), D-b-Hydroxybutyrate Prevents Glutamate-Mediated Lipoperoxidation and Neuronal Damage Elicited during Glycolysis Inhibition In Vivo, Neurochem Res 31:1399–1408.
- Melo T, *et al.*, (2006), Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet, Neurochem. Int. 48:498–507.
- Menzies, F. *et al.*, (2015), Compromised autophagy and neurodegenerative diseases, NEUROSCIENCE 16:345–357.
- Nelson, D. y Cox, M., (2007), Lehninger: Principios de Bioquímica. 5^{ed}. Ed OMEGA, ppg 1296.
- Paxinos, G. Y Watson, C., (1998), The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4^{ed}. EISEVIER, ppg 136.
- Papadaskis, M. *et al.*, (2013), Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy, Nature Medicine 19: 351-357.
- Paramo, J. *et al.*, (1985), Plasminogen activator inhibitor in the blood of patients with coronary artery disease, BR. Med. J. 291: 573-574.
- Peng, L. *et al.*, (2006), ADAR2-Dependent RNA Editing of AMPA Receptor Subunit GluR2 Determines Vulnerability of Neurons in Forebrain Ischemia, J Neuron 49:719–733.

- Ponpuak, M. et al., (2015), Secretory autophagy, Current Opinion in Cell Biology 35:106–116.
- Puchowicz, M. et al., (2008), Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia, Journal of the International Society OF Cerebral Blood Flow and Metabolism 28: 1907-1916.
- Purves, D., (2007), *Neuroscience*, 3^{ed}. Ed. Médica Panamericana, ppg 918.
- Rabinowitz, J. y White, E., (2010), Autophagy and Metabolism, SCIENCE 330: 1344-1348.
- Rami, A. et al., (2008), Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death, Neurobiology of Disease 29:132–141.
- Relton, J. et al., (1996). Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat, Experimental Neurology 138: 206-213.
- Sadasivan, S. et al., (2010), Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is accompanied by autophagy induction and late onset autophagic cell death phenotype, BMC Neuroscience 11:21.
- Sattler, R. y Tymianski, M., (2001), Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death, Molecular Neurobiology 24: 107–129.
- Sarkar C, et al., (2014) Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. Autophagy 10:2208–2222.
- Sheng, R. et al., (2012), Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning, Autophagy 8: 310–325.
- Shimazu, T. et al., (2013), Suppression of Oxidative Stress by β -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor, SCIENCE 339: 211-214.
- Siegel, G. et al., (2005), Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 7^{ed}, Ed ELSEVIER, ppg 991.
- Strong, J. et al., (2000), Factors Influencing the Frequency of Fluorescence Transients as Markers of Peri-Infarct Depolarizations in Focal Cerebral Ischemia, Stroke 31:214-222.

- Suzuki, M. et al., (2001), Effect of β -Hydroxybutyrate, a Cerebral Function Improving Agent, on Cerebral Hypoxia, Anoxia and Ischemia in Mice and Rats, Jpn. J. Pharmacol. 87: 143–150.
- Suzuki, M. et al., (2002), β -Hydroxybutyrate, a Cerebral Function Improving Agent, Protects Rat Brain Against Ischemic Damage Caused by Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia, Jpn. J. Pharmacol. 89: 36–43.
- Takahashi, S. et al., (2014), Roles and Regulation of Ketogenesis in Cultured Astroglia and Neurons Under Hypoxia and Hypoglycemia. ASN Neuro. 6: 1-14.
- Traystman, R., (2003), Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia, ILAR J 44: 85-95.
- Wang, Q. et al., (2007), The inflammatory response in stroke, J. Neuroimmunol 184: 53-68.
- Wang, Z. et al., (2013), Protective Effect of Autophagy Inhibition on Ischemia-reperfusion-induced Injury of N2a Cells, J Huazhong Univ Sci Technol 33: 810-816.
- Wei, Y. et al., (2008), JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy, Mol Cell 30: 678–688.
- Wen, Y. et al., (2008), Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways, Autophagy 4:762-769.
- Xie, Z. et al., (2016), Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation, Molecular Cell 62: 194-206.
- Yin, J. et al., (2015), Sirtuin 3 mediates neuroprotection of ketones against ischemic stroke, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 35: 1783-1789.
- Youm, Y. et al., (2015), The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease, Nature medicine 2:263-269.
- Yu, G. et al., (2015), BQ-869, a novel NMDA receptor antagonist, protects against excitotoxicity and attenuates cerebral ischemic injury in stroke, Int J Clin Exp Pathol 8:1213-1225.
- Zhang, D. et al., (2016), AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 3888, Autophagy 0: 1-13.

- Zhang, X. *et al.*, (2013), *Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance*, *Autophagy* 9: 1321–1333.
- Zhang, X. *et al.*, (2014), *Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury*, *Autophagy* 10:1–13.
- Zheng, C. *et al.*, (2012), *NAD+ administration decreases ischemic brain damage partially by blocking autophagy in a mouse model of brain ischemia*, *Neuroscience Letters* 512: 67– 71.

Referencias en línea

- OCDE, 2014, *Estadísticas de la OCDE sobre la salud 2014 México en comparación* [Fecha de consulta 28-06-15] disponible en línea: www.oecd.org/els/health.../Briefing-Note-MEXICO-2014-in-Spanish.pdf