



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

EFFECTO DEL β -HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA AUTOFAGIA INDUCIDA
POR LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA EN NEURONAS CORTICALES DE RATA
EN CULTIVO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

L.N. Lucy Anita Camberos Luna

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Instituto de Fisiología Celular División de Neurociencias

Ciudad Universitaria, CDMX. Septiembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EFFECTO DEL β -HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA EN NEURONAS CORTICALES DE RATA EN CULTIVO



Instituto de
Fisiología
Celular



Presenta

Lucy Anita Camberos Luna
Licenciada en nutrición

DEDICATORIAS

A mi familia, definitivamente.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Agradezco al Programa de Doctorado en ciencias Biomédicas, al CONACyT (proyecto CB-239607) y a PAPIIT (Proyectos IN204213, IN205416) por el financiamiento al proyecto y apoyar mi desarrollo en el doctorado.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo (Instituto de fisiología celular, división de neurociencias), quien fungió como mi tutora durante mi doctorado.

A la bióloga Teresa Montiel Montes, técnico académico, por su asesoría y apoyo otorgado para la realización de mi proyecto.

A los doctores Adolfo García Sainz (Instituto de Fisiología Celular), Salvador Uribe (Instituto de Fisiología Celular) y Daniel Ortega Cuellar (Instituto Nacional de Pediatría), por ser también un apoyo cuando lo necesité, tanto asesoría académica como apoyo de infraestructura y material de laboratorio.

A la M. en C. Ana María Escalante y al Ing. Francisco Pérez Eugenio del área de cómputo del instituto de fisiología celular de la división de neurociencias, por su apoyo técnico.

A Sara Méndez (Instituto de Fisiología Celular) y Azucena Pichardo (Instituto de Investigaciones Biomédicas), gracias por su apoyo académico y administrativo. Por su disposición, su trato amable, su trabajo indispensable y por siempre tener una sonrisa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa de doctorado en ciencias biomédicas, al CONACyT (CB-239607) y a PAPIIT (IN204213) por apoyar mi proyecto y mi desarrollo en el doctorado.

Agradezco el haber podido ser alumna de la UNAM. Todas las cosas que he vivido alrededor de ello han sido las mejores (y más difíciles) experiencias de mi vida.

Agradezco infinitamente a la Dra. Lourdes Massieu por darme la oportunidad de integrarme a su equipo en el laboratorio AL-302. Ella me abrió la oportunidad de poder explotar y disfrutar mi trayectoria por el doctorado y gracias a eso he aprendido más de lo que hubiera imaginado, y me ha abierto la mente para darme cuenta de todo lo que falta por aprender. Le agradezco sus enseñanzas académicas, así como el ejemplo de valores y humanidad. Por su confianza, apoyo y empatía en los momentos difíciles (desde asuntos académicos, familiares o hasta cuando me terminó el novio). Tener una líder así ha sido inigualable. Ella ha sido mi ejemplo de trabajo, al lado de la bióloga Teresa Montiel Montes.

A Teresa Montiel Montes le agradezco su infinita disposición para ayudarme, tanto en aspectos académicos como en los personales. Ha sido mi amiga y me regaló experiencias que seguramente no voy a olvidar nunca. Gracias por todos los detalles que cuidaste para hacer funcionar el laboratorio de la manera más feliz, desde el jabón para manos hasta cada pastel de cumpleaños y el café de cada mañana. Gracias por escucharme cuando lo necesité, por las pláticas tan amenas, me sacaste muchas sonrisas.

Gracias a ambas por su esfuerzo admirable.

A Cecilia Escalona, por su trabajo indispensable y valioso que hacía el laboratorio más agradable. Por las pláticas y la compañía.

(Y entre paréntesis, una disculpa por el desastre causado y las canas verdes).

A las ratitas que sirvieron como mi modelo experimental. Sin ellas no hubiera logrado tener un posgrado en ciencias biomédicas.

Es vital agradecer a mis amigos, las personas que forman la familia que me acogió en la Ciudad de México y que me acompañaron en cada paso y tropiezo. Por su apoyo incondicional, por escucharme siempre, aunque fueran cosas anodinas, por acompañarme en los momentos de carcajadas, conciertos, fiestas, películas, ocio, libros, trabajo, música, comida, desveladas, enojos y desenojos, por tolerarme y darme mi espacio cuando mi humor era medio ácido o negro. Mis amigos son un caso único y además un ejemplo de que la dedicación, inteligencia, alegría, honestidad y diversión, son cosas que se pueden llevar muy bien. Gracias a mis amigos por ayudarme a crecer. Gracias porque han sido para mí el ejemplo de amistad más claro.

Tengo la fortuna de poder hacer una larga lista de amigos valiosos a quienes quiero agradecerles el haberme acompañado en mi doctorado, y empieza de la siguiente manera:

- Estefanía Ochoa Ruiz, Sonia Vargas Chávez y José Corella Vázquez, mis amigos del inicio del doctorado en el INP, indispensables para mí. Por su compañerismo y amistad. Por todo lo vivido en el primer laboratorio al que llegué, ustedes eran una gran motivación para ir a trabajar. También a Carmen Torres Esquivel y Cristian Gerónimo Olvera, quienes también son una motivación para mí, por cuya amistad también me siento muy agradecida. Prácticamente necesito un capítulo para esto, y como no se puede sólo pondré palabras clave: “¿Creen que se nos considere como personas serias?”, “Chayo lives”, “Seal of approval”, “B&B”, “vino tinto en tazas”, “alitas Tyson” “¿Cuánto cuestan los pandotas?”, “Kitty perdido en otra dimensión desconocida”, “¿Qué pasa, man?”, “La Kitty-trampa”, “¿De dónde lo sacaron?” “Lucifer del diablo” “Kitty de la creación”, “desconchaba-Kitty”, entre otras. Gracias por todo.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio AL-302 (y vecinos), Susana Flores, Marco Flores, Selene García de la Cadena, Gabriela Langurén, Alberto Julio Amilpas, Nadia Rivero, Carolina Cid, Berenice Bernal, Rafael Lazo, Mara Prior, Juan Carlos Gómora García, Julio Abarca, Leo García, Atza Salazar.
- A Rodrigo Díaz Ruiz. Gracias por la paciencia, los momentos agradables y complicados, por confiar en mí, por tus enseñanzas, por prepararme para mi candidatura, eso fue para mí algo verdaderamente valioso.
- Mis amigas y compañeras de casa que lidiaron con mi estrés y me acompañaron a reír también. Por los ratos de yoga, quehacer, chisme, risas o lágrimas. Por ser una compañía tan valiosa: Janikua Nelson, Karla Soto, y Nadia Navarrete.
- Mis amigos y primos de Guadalajara (y más allá): Sus porras fueron alimento para mi alma, Cecilia Luna Luna, Diana Luna, Claudia y Elizabeth Sánchez, Carolina Luna, Gabriela Proa, Angélica Vargas, Andrea Vázquez, Araceli Rocha, Alejandra Altamirano, David Castillo, Gabriela Morales, Haranti Castellón, Verónica González, Mary Santana. Cada llamada, mensaje, o visita, fue vital.
- A mis amigas de Apoyo Metabólico Nutricio, Ana Guerrero, Zully Hernández, Ma. Dolores Arias, Mariana Samayoa, y Gabriela Canahuate, quienes contribuyeron con su amistad y apoyo a mi proceso de titulación.
- A Allyn Andonegui, agradezco por haberla encontrado, no sabría explicar el efecto que tuvo en mi vida. Gracias.
- A amigos que fueron apoyo en diferentes momentos importantes y cruciales de mi vida, me siento afortunada y realmente agradecida por tenderme la mano: Jaime Gutiérrez, Rígel Juárez (Word tacha tu nombre), Alejandra Macías.
- A la familia Luna González, que me recibieron como otro miembro más al dejar Guadalajara, y hasta ahora.
- A los alumnos a los que he podido enseñarles algo, permitiendo que yo aprenda también.

A mis cosas favoritas que le dieron los detalles pequeños pero vitales a todos estos días de doctorado que hicieron que pudiera sobrevivir a los buenos y no tan buenos ratos: la música y a las películas, es necesario, no puedo hacer nada sin música, no puedo vivir sin bailar y no hay nada como una buena película para descansar el cerebro. También al chocolate, la mantequilla de cacahuete, el café americano y al té chai. Al rhodesia, al pata negra y a la cineteca. A 9gag y al periódico El deforma. A mi cuarto con luz tenue en el que me siento en el mejor lugar para leer a gusto.

A Irene Luna Márquez. Nada como sus abrazos, sus porras, sus pláticas, su compañía, su sonrisa. Me partió el alma que se fuera pero la tengo en un lugar único en mi corazón y mi memoria, y sé que ella estaría contenta conmigo en este momento tan importante para mí.

Por último, mi familia núcleo. Formé mi definición de amor gracias a ellos.

A mis papás, Ramón Camberos y Carmen Luna. A mis hermanos, Gabriela, Mariana y Daniel Camberos Luna. A mis cuñados, Macarena Rojo, Alfredo Martínez, y Cornelio García. A mis sobrinos Natalia, Paola, Daniel, y Santiago. Gracias por ser mi chispa. Gracias por siempre apoyarme en cada decisión, buena o mala, por creer en mis planes, por no dejarme caer nunca, por hacerme sentir segura. Por siempre estar al pendiente de mí, por dejarme compartir mis alegrías con ustedes. Por escucharme cuando estaba rendida, cuando necesitaba explotar. Por amarme como soy, tal cual. No tengo más que palabras para escribir aquí y de alguna manera hacerles saber lo agradecida que estoy con ustedes, mi familia. Espero que con mis actos pueda hacerles ver cuánto los amo y que también pueda devolverles de alguna manera todo lo que han hecho por mí.

Porque son pieza clave y fundamental en cada capítulo de mi vida. Pertenezco al lugar donde ustedes estén, ustedes son mi hogar y mi vida.

Y ya, pues. Pongámonos serios.

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS.....	8
Introducción.....	10
I.- Cuerpos cetónicos.....	10
II.- Muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa.....	12
• Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno:.....	14
• Estrés del retículo endoplásmico y respuesta a proteínas no plegadas:.....	14
• Activación de la calpaína:.....	14
• Activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa 1:.....	15
III.- Efecto protector de los cuerpos cetónicos sobre enfermedades neurodegenerativas y daño agudo.....	17
IV.- Autofagia como mecanismo de rescate ante el estrés energético en las neuronas.....	19
• IV.I Descripción de la autofagia.....	19
• IV.II Evidencia de la inducción de la autofagia durante la ausencia y reintroducción de glucosa.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	243
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
METODOLOGÍA.....	25
RESULTADOS.....	28
El β-hidroxibutirato preserva la viabilidad en neuronas sometidas a la ausencia y reintroducción de glucosa.....	28
El D-BHB disminuye los niveles de diferentes indicadores de autofagia en neuronas corticales sometidas a la ausencia y reintroducción de glucosa.....	30
El D-BHB restablece la activación basal del complejo mTORC1 a las 12 horas de reintroducción de glucosa.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS	45
ANEXO 1 – Artículo publicado	51

RESUMEN

La glucosa es el principal sustrato energético utilizado por el cerebro, sin embargo, durante la cetogénesis inducida por el ayuno o la hipoglucemia prolongada, los cuerpos cetónicos (CC), acetoacetato (AcAc) y β -hidroxibutirato (BHB) pueden servir como sustratos alternos a la glucosa. Los CC aumentan la viabilidad neuronal en diferentes modelos de daño, pero los mecanismos por los cuales ejercen su efecto protector todavía no están del todo dilucidados. En este estudio se investigó si el efecto protector del isómero D del BHB (D-BHB) sobre la muerte inducida por la ausencia (AG) y reintroducción de glucosa (RG), está relacionado con la autofagia. La autofagia es un proceso de degradación lisosomal que se activa bajo estrés energético en el que se degradan proteínas y organelos dañados, suministrando energía para mantener la viabilidad. Dicho proceso es regulado negativamente por el complejo mTORC1 durante condiciones normales; sin embargo, durante el estrés energético, éste es fosforilado e inhibido por la cinasa activada por AMP (AMPK) en el residuo de serina 792, estimulando así la activación de la autofagia.

Los resultados muestran que el proceso de autofagia se activa en las neuronas corticales cultivadas en condiciones de AG, como lo indica el aumento en los niveles de la forma lipídica y activa de la proteína LC3-II (microtubule associated protein light chain 3), la cual es necesaria para la formación de autofagosomas, y por el aumento en el número de autofagosomas. En una etapa temprana de RG ocurre la degradación del contenido autolisosomal, ya que los niveles de la proteína p62/SQSTM1 disminuyen. Esta proteína se encarga de capturar proteínas ubiquitinadas y transportarlas al autofagosoma donde serán degradadas junto con p62/SQSTM1 después de la fusión con el lisosoma. En cultivos expuestos a AG y RG en presencia de D-BHB, los niveles de LC3-II y p62/SQSTM1 decaen rápidamente y permanecen cercanos al nivel control durante toda la fase de RG, sugiriendo que el D-BHB estimula el flujo autofágico, previniendo así la acumulación de autofagosomas y mejorando la viabilidad neuronal.

Por el contrario, el isómero L del BHB, que es metabólicamente inactivo, no modificó los niveles de LC3-II ni de p62/SQSTM1 ni durante la AG o la RG. Evidencia experimental indica que la activación de la autofagia durante la AG y las etapas tardías de la RG correlaciona con un aumento en la fosforilación de la proteína RAPTOR (la cual fosforila e inhibe a mTORC1), sugiriendo que la inhibición de mTORC1 participa en la activación de la autofagia. En presencia de D-BHB, la fosforilación tardía de RAPTOR no tiene lugar sugiriendo que la homeostasis celular se restablece y no se estimulan las respuestas de alarma en contra del estrés energético, como es la inhibición mTORC1 y la consecuente activación de la autofagia.

ABSTRACT

Glucose is the major energy substrate in brain, however, during ketogenesis induced by starvation or prolonged hypoglycemia, the ketone bodies (KB), acetoacetate and β -hydroxybutyrate (BHB) can substitute glucose. KB improve neuronal survival in diverse injury models, but the mechanisms by which KB prevent neuronal damage are still not well understood. In the present study we have investigated whether protection by the D isomer of BHB (D-BHB) against neuronal death induced by glucose deprivation (GD), is related to autophagy. Autophagy is a lysosomal-dependent degradation process activated during nutritional stress, which leads to the digestion of damaged proteins and organelles providing energy for cell survival. It is negatively regulated by mTORC1 during normal conditions, however, during energy stress, mTORC1 is phosphorylated and inhibited by AMP-activated kinase (AMPK) at Ser 792 residue, thus, stimulating autophagy activation.

Results show that autophagy is activated in cortical cultured neurons during GD, as indicated by the increase in the levels of the lipidated form of the microtubule associated protein light chain 3 (LC3-II), a protein involved in the formation of autophagosomes, and the augmented number of autophagic vesicles. At early phases of glucose reintroduction (GR), the levels of p62/SQSTM1 declined suggesting that the degradation of the autophagolysosomal content takes place at this time. p62/SQSTM1 recruits and transports ubiquitinated proteins to the autophagosome for their degradation, and it is itself degraded after the autophagosome-lysosome fusion. In cultures exposed to GD and GR in the presence of D-BHB, the levels of LC3-II and p62/SQSTM1 rapidly declined and remained close to basal levels during GR, suggesting that the KB stimulates the autophagic flux preventing autophagosome accumulation and improving neuronal survival. In contrast, the metabolically inactive L isomer of BHB did not alter neither LC3-II nor p62/SQSTM1 content, either during GD nor during GR, although it partially improved neuronal viability. Experiments indicate that autophagy activation during GD and the late stages of GR correlates with RAPTOR phosphorylation (which inhibits mTORC1) suggesting that mTORC1 inhibition is involved in autophagy activation. In presence of D-BHB, RAPTOR phosphorylation at late stages of GR does not take place suggesting that cellular homeostasis has been reestablished and the responses against energy stress such as inhibition of mTORC1 and autophagy activation are not stimulated.

ABREVIATURAS

3-MA: 3-metiladenina
 α -KG: Alfa-cetoglutarato
AcAc: Acetoacetato
Acetil-CoA: Acetil coenzima A
AG: Ausencia de glucosa
AA: Aminoácidos
AMPK: Cinasa activada por AMP
Asp: Aspartato
ATP: Adenosín trifosfato
BECN1: Beclina 1
BHB: β -Hidroxibutirato
BHB-DH: β -Hidroxibutirato deshidrogenasa
Cat: Catalasa
CC: Cuerpos cetónicos
CQ: Cloroquina
D-BHB: Isómero D del β -Hidroxibutirato
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EAAT: Transportadores de aminoácidos excitadores
ER: Estrés de retículo endoplásmico
FIP200: Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa
GABA: Ácido γ -amino butírico
GD: Glucose deprivation
Glu: Glutamato
HDACS: Desacetilasas de histonas
HMG-CoA-L: Hidroximetil glutaril-CoA liasa
HMG-CoA-S: Hidroximetil glutaril-CoA sintetasa
Htt: Huntingtina
Httm: Huntingtina mutada
KB: Ketone bodies (cuerpos cetónicos)
L-BHB: Isómero L del β -Hidroxibutirato
LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LC3-II: Forma lipidada de LC3
LDH: Lactato deshidrogenasa
MCT: Transportadores de monocarboxilatos
mLST8: mammalian lethal with Sec13 protein 8
mTOR: Mammalian target of rapamycin
mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NMDA: N-metil-D-aspartato
NOX: NADPH oxidasa
PARP 1: Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa 1

PBS: Phosphate buffered salt
PE: Fosfatidiletanolamina
PLA₂: Fosfolipasa A₂
p-RAPTOR: RAPTOR fosforilada
PRAS40: Proline-rich AKT substrate 40 kDa
PtdIns3K/Vps34: Class III phosphatidylinositol 3-kinase / mammalian vacuolar protein sorting 34
RAPTOR: regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
RG: Reintroducción de glucosa
rNMDA: Receptores de N-metil-D-aspartato
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SERCA: ATPasa de calcio del retículo endoplásmico/sarcoplásmico
TBS: Tris buffered salt
ULK1: UNC-51-like kinase complex 1
UPR: Unfolded protein response (Respuesta a proteínas no plegadas)
VPS15: Vacuolar protein sorting 15
XO: Xantina oxidasa

EFFECTO DEL β -HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA PRIVACION DE GLUCOSA EN NEURONAS CORTICALES DE RATA EN CULTIVO

Introducción

I.- Cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos (CC), acetoacetato (AcAc), β -hidroxibutirato (BHB) y acetona (figura 1A), son el producto de la degradación de los ácidos grasos y se forman en condiciones específicas, como el ayuno prolongado, durante el periodo de lactancia en los neonatos, al consumir una dieta alta en grasas y proteína (80-90%) y baja en hidratos de carbono (10%) (dieta cetogénica); así como también durante episodios de hipoglucemia o en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 descontrolada, entre otras (Robinson, 1980). Durante un periodo de estrés energético, el AcAc y el BHB pueden utilizarse como sustratos alternativos, aportando 4.2 y 4.7 Kcal/g, respectivamente (Morris, 2005; Desrochers, 1995); La acetona es producto de la descarboxilación espontánea del AcAc, es volátil y se elimina por vía respiratoria, por lo que no puede integrarse al metabolismo. Los CC pueden aportar más del 60% del gasto energético de las neuronas, dependiendo de la concentración alcanzada en plasma (Hashim & VanItallie, 2014).

La tabla 1 muestra el porcentaje de aporte de energía al cerebro por los cuerpos cetónicos dependiendo de la concentración alcanzada durante diferentes periodos de ayuno.

Duración del ayuno	Concentración de CC alcanzada (mM)	% de aporte de energía al cerebro
12-24 horas	0.3-0.5	3-5
2-3 días	1.5	18
8 días	5	60
≥ 20 días	7	≥ 60

Tabla 1. Proporción de energía aportada por los CC al cerebro durante periodos de ayuno en función de su concentración en plasma. (Modificada de Hashim & VanItallie, 2014).

En condiciones fisiológicas y con niveles normales de glucosa en plasma (70-100 mg/dl), la concentración de los CC en sangre es menor a 0.2 mM, y la relación BHB:AcAc es 1:1. En un periodo de inducción de cetogénesis bajo los estímulos anteriormente mencionados, los niveles aumentan (>0.2 mM, hipercetonemia); si rebasan los 7 mM puede ocurrir cetoacidosis, condición común en pacientes diabéticos descontrolados cuyos niveles de cetonas pueden alcanzar los 25 mM, y en la que la relación BHB:AcAc es 10:1 (Robinson, 1980; Laffel, 1999).

La síntesis de cuerpos cetónicos (cetogénesis) ocurre en las mitocondrias del hígado como consecuencia de la β -oxidación de ácidos grasos a una tasa proporcional a ésta (McGarry y Foster, 1980; Cotter et al., 2013); el acetil-CoA liberado se utiliza para formar compuestos que, al oxidarse, puedan dar lugar a acetil-CoA nuevamente, disponible para la producción de energía (figura 1B). La cetogénesis se da en una serie de reacciones a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por medio de la enzima tiolasa, quien al liberar una molécula de coenzima A, da lugar a acetoacetil-CoA; posteriormente, la hidroximetil glutaril-CoA sintetasa (HMG-CoA-S) integra un grupo acetilo proveniente de una tercera molécula de acetil-CoA para formar hidroximetil glutaril-CoA. La enzima hidroximetil glutaril-CoA liasa (HMG-CoA-L) dará lugar al AcAc, el cual al reducirse por la β -hidroxibutirato deshidrogenasa (BHB-DH) se convertirá en β -hidroxibutirato. Éste último paso es reversible y depende del equilibrio redox determinado por la proporción de NAD^+/NADH .

Estos cuerpos cetónicos se liberan al torrente sanguíneo y son captados en el sistema nervioso por los transportadores de monocarboxilatos (MCT), localizados en las células gliales (MCT1) y las neuronas (MCT2). Éstos son oxidados en la mitocondria (cetólisis) produciendo acetil-CoA de nueva cuenta (figura 1C), suplementando al ciclo de Krebs y promoviendo la síntesis de ATP (Sokoloff, 1973; Cotter et al., 2013). La cetólisis comienza con la oxidación del BHB por la misma BHB-DH para convertirlo a AcAc, que al reaccionar con una molécula de coenzima A derivada del succinil-CoA del ciclo de Krebs, se convertirá a acetoacetil CoA. Finalmente, la enzima tiolasa agregará una molécula de coenzima A para poder liberar dos moléculas de Acetil Co-A que se integrarán al ciclo de Krebs.

Este mecanismo de obtención de energía a partir de sustratos alternos a la glucosa en casos de estrés energético es muy importante, sobre todo en tejidos tan vulnerables a la falta de glucosa como el cerebro.

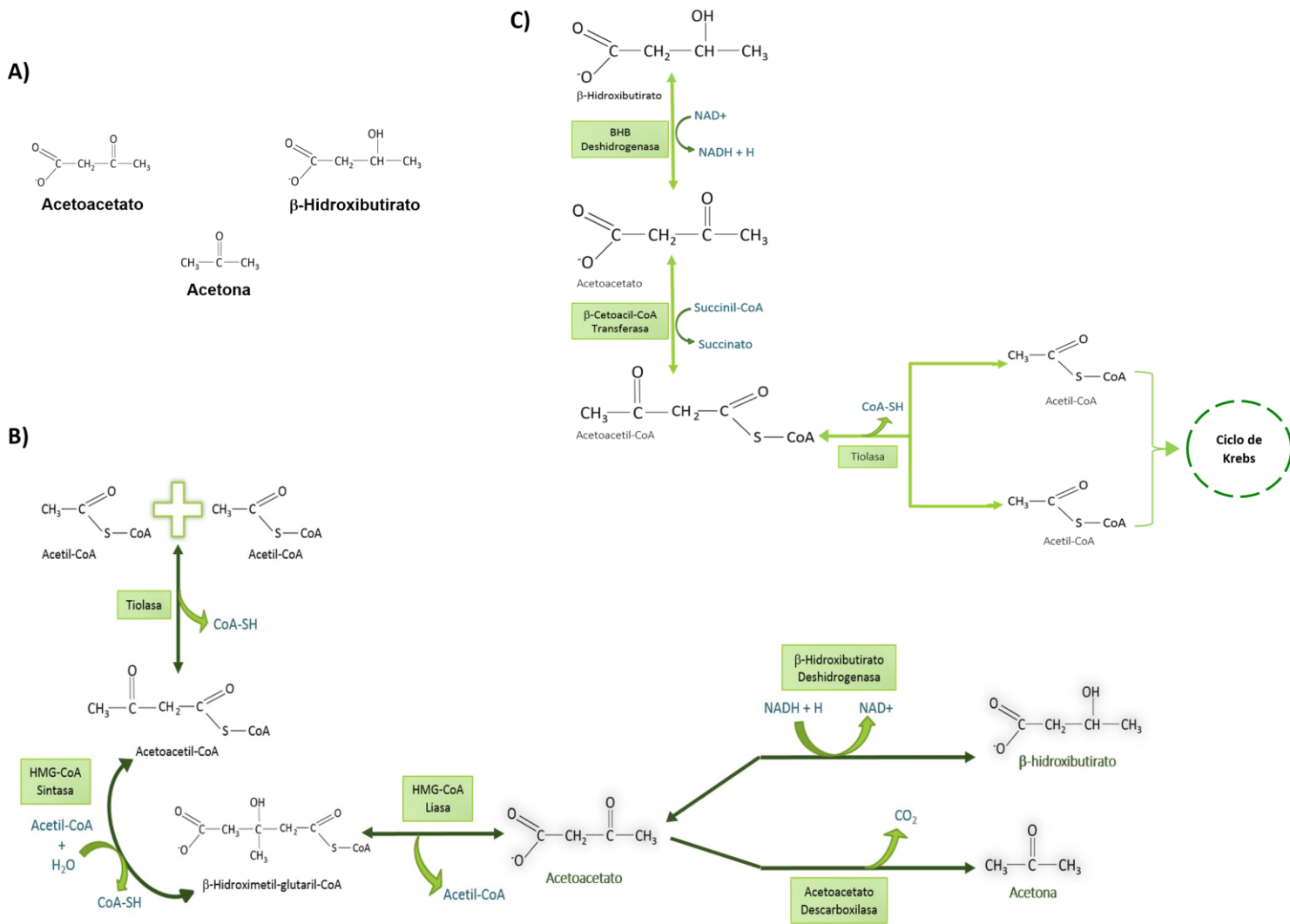


Figura 1. Cuerpos cetónicos y su metabolismo. **A)** Estructura de los cuerpos cetónicos. **B)** Cetogénesis. **C)** Cetólisis.

II.- Muerte neuronal inducida por ausencia de glucosa

La glucosa es el principal sustrato energético en los humanos, y el cerebro, a pesar de constituir solamente el 2% del peso corporal, consume cerca del 25% de la glucosa total disponible en la sangre (Mergenthaler et al., 2013). Lo anterior implica que el cerebro es un órgano altamente dependiente de glucosa y, por lo tanto, vulnerable ante un desequilibrio en la glucemia (Swanson & Suh, 2010). Los episodios repetitivos de hipoglucemia moderada (60-40mg/dl) pueden impactar negativamente en la memoria y atención tanto en individuos sanos como pacientes diabéticos tipo I, quienes presentan mayor riesgo de hipoglucemia que los pacientes con diabetes tipo 2 debido al tratamiento estricto con esquemas de insulina (Rovira, 2002; Langurén, et. al., 2013).

En estudios *in vitro* de ausencia de glucosa (AG) e *in vivo* de hipoglucemia severa (<40 mg/dl) y prolongada, se ha observado muerte neuronal (Suh et al., 2005; Suh et al., 2007; Páramo et al., 2010; García de la Cadena et al., 2014; Julio-Amilpas et al., 2015). La falla energética en las neuronas secundaria a la privación de glucosa desata diferentes mecanismos que conducen a la muerte (figura 2). Primeramente, la baja disponibilidad de glucosa reduce la producción de piruvato y posteriormente acetil-CoA para suplementar al ciclo de Krebs, por lo tanto, como mecanismo compensatorio, la glutamina se transforma en glutamato, quien donará su grupo amino al oxaloacetato (por medio de la aspartato aminotransferasa), produciendo así α -cetoglutarato y aspartato, funcionando el primero como sustrato anaplerótico y el segundo como neurotransmisor excitador (Sutherland, et al., 2008). Este proceso se conoce como ciclo de Krebs truncado en el que, a partir de la síntesis de α -cetoglutarato de la glutamina, se da lugar al resto de los intermediarios del ciclo de Krebs hasta la síntesis de oxaloacetato, continuando con el ciclo en compensación de la baja concentración de acetil CoA y la insuficiente síntesis de citrato e isocitrato. Por otro lado, el glutamato también puede ser transformado a α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa durante la privación de glucosa, contribuyendo así al mantenimiento del ciclo de Krebs (Sutherland, et al., 2008).

Simultáneamente, la falla energética impide el funcionamiento de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, induciendo despolarización de las neuronas debido al aumento de Na^+ intracelular. Dicha despolarización conduce a la liberación de aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato, particularmente de aspartato debido al aumento en su concentración durante el ciclo de Krebs truncado (Sandberg, et al., 1986). Debido a que el gradiente de sodio se disipa, los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) funcionan de manera inversa (tanto en la glía como en las neuronas), liberando glutamato al espacio sináptico, en lugar de recapturarlo para su almacenamiento, por lo que permanece más tiempo en el espacio sináptico ocasionando un proceso excitotóxico (Sandberg, et al., 1986; Camacho & Massieu, 2006; Vandenberg & Ryan, 2013). La excesiva liberación de glutamato sobreactiva los receptores a NMDA (N-metil-D-aspartato), a los receptores a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y a los de ácido kaínico. Los receptores NMDA son altamente permeables a calcio causando un influjo de este catión a la célula. La misma falla energética inhibe el funcionamiento de la bomba ATPasa de calcio del retículo endoplásmico/sarcoplásmico (SERCA), por lo que se libera calcio reticular, contribuyendo al aumento en su concentración en el citoplasma (Hernández-Fonseca, et al., 2005).

Los eventos subsecuentes desatan varios procesos que conducen a la apoptosis, entre ellos destacan los siguientes:

- Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno:

Estudios *in vivo* mostraron que las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) se producen principalmente durante la fase de reintroducción de glucosa (RG); es decir, cuando la glucosa se encuentra disponible nuevamente luego de un periodo de hipoglucemia o isquemia cerebral. Sin embargo, durante la fase de ausencia de glucosa (AG) el aumento de calcio intracelular también desata la producción de ROS por la activación de reacciones enzimáticas. Se forma principalmente superóxido producido por enzimas dependientes calcio, como la xantina oxidasa (XO), la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y la NADPH oxidasa (NOX) (Suh, et al., 2007; Páramo et al., 2010).

- Estrés del retículo endoplásmico y respuesta a proteínas no plegadas:

Dado que el plegamiento de proteínas es un proceso que requiere altas cantidades de energía, la falta de glucosa induciría la acumulación de proteínas no plegadas debido a la falta de glucosa necesaria para modificaciones postraduccionales (glucosilación), o a la misma falla energética, ya que el plegamiento proteico es un proceso celular energéticamente costoso. Dicha acumulación de proteínas no plegadas induce una respuesta ante la alteración en la homeostasis celular ocasionada por los agregados proteicos, denominada respuesta a proteínas no plegadas, o UPR, por sus siglas en inglés (unfolded protein response) (Malhotra, et al., 2007).

Se ha identificado la activación de elementos de la vía de las proteínas no plegadas durante la AG en neuronas cultivadas de hipocampo y la activación subsecuente de las caspasas-7 y -12, lo cual contribuye a la muerte neuronal (García de la Cadena et al. 2014). La participación de la vía mitocondrial de la apoptosis en el daño hipoglucémico también se ha sugerido, dada la liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa-3 durante la hipoglucemia inducida *in vivo* (Ferrand Drake et al. 2003).

- Activación de la calpaína:

La entrada de calcio y la producción de ROS estimulada por la privación de glucosa también induce la activación de la calpaína, que es una proteasa dependiente de calcio implicada en la muerte neuronal excitotóxica. Los inhibidores de NOX, XO y PLA₂, o inhibidores de la liberación de calcio del retículo endoplásmico disminuyen la producción de ROS y la actividad de la calpaína durante la AG, contribuyendo a la sobrevivencia neuronal en células hipocampales (Páramo et al., 2013).

- Activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa 1:

Los eventos promovidos por el proceso excitotóxico eventualmente llegan a dañar al DNA, por lo que los mecanismos de reparación se activan; uno de esos mecanismos es llevado a cabo por la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa 1 (PARP-1, por sus siglas en inglés). Dicha enzima utiliza las ADP-ribosas del NAD⁺, por lo tanto, durante la AG, la excesiva activación de la PARP-1 consume el NAD⁺ disponible para su funcionamiento, contribuyendo a la falla energética y desatando la apoptosis. En ratas sometidas a hipoglucemia inducida por insulina, los inhibidores de la PARP-1 reducen significativamente el daño y la muerte neuronal en distintas regiones del cerebro (Suh et al. 2003).

En la figura 2 se esquematizan los eventos que se desatan durante la falla energética y que conducen al daño excitotóxico en neuronas.

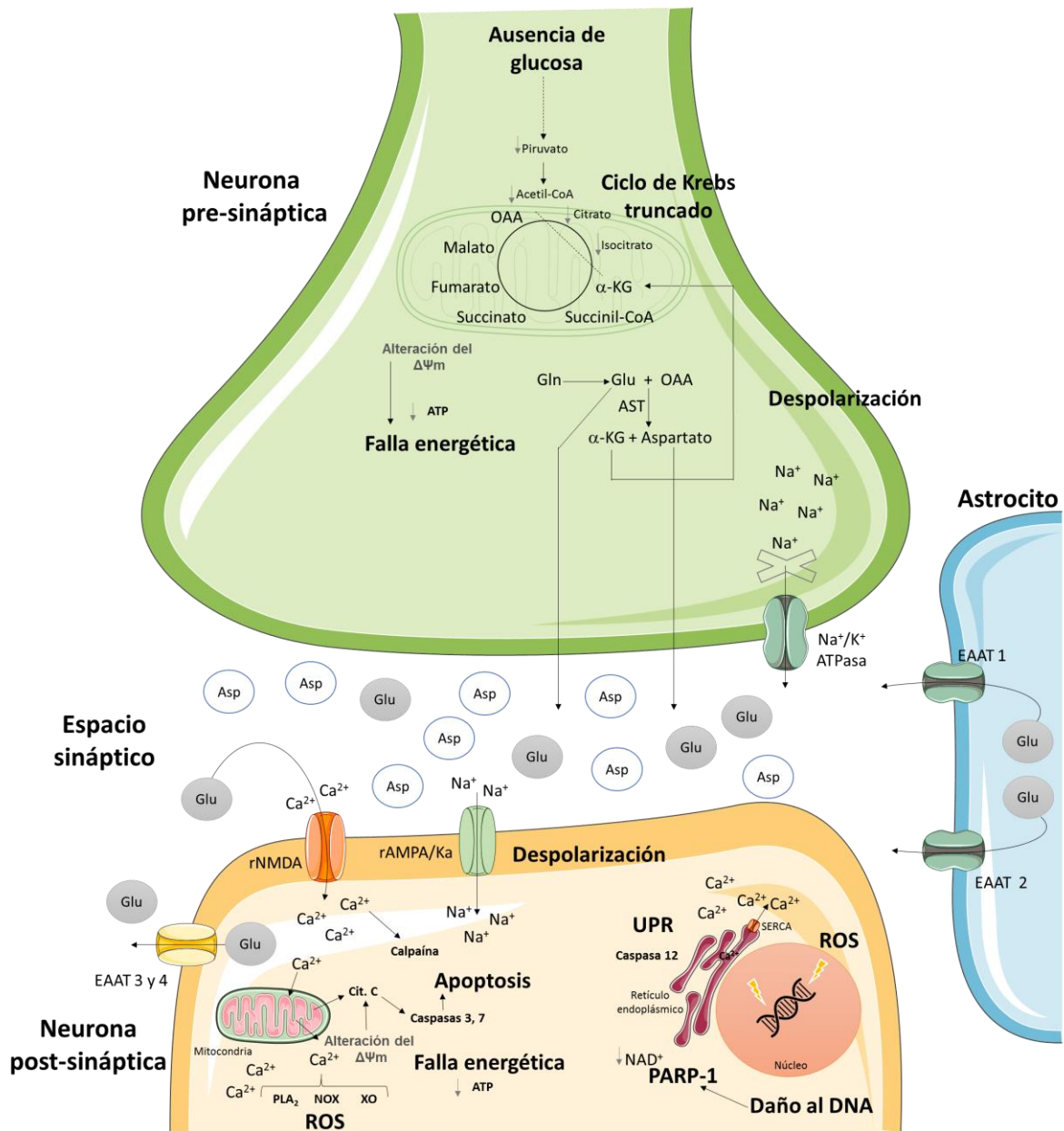


Figura 2. Mecanismos de muerte neuronal por ausencia de glucosa. La falla energética induce la transaminación compensatoria del Glu para producir α -KG y contribuir a la generación de energía, lo cual ocasiona que aumente simultáneamente la concentración de Asp. La falta de ATP impide la función de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, por lo que el Na^+ intracelular también aumenta, estimulando la despolarización de la célula y posterior liberación de AA excitadores, Glu y Asp. Por otro lado, el aumento de Na^+ intracelular estimula la función reversa de los EAAT, que liberaran Glu en lugar de recaptarlo. El exceso de AA excitadores en el espacio sináptico sobreactiva a los rNMDA, quienes permiten la entrada de Ca^{2+} a la célula; la SERCA también contribuye al aumento de Ca^{2+} intracelular al detenerse su actividad dada la falta de ATP; secundario a ello, la activación de enzimas como PLA₂, NOX, XO, estimulan la producción de ROS y el daño al DNA; la PARP-1 se activa para reparar el daño al DNA, sin embargo depleta el NAD^+ intracelular, empeorando la falla energética. La calpaína se activa por calcio y contribuye a la activación de las caspasas-7 y -12. Lo anterior conduce a la apoptosis mediada por la liberación de citocromo C de la mitocondria y la activación de las caspasas-3 y -7. La línea punteada en el ciclo de Krebs indica que está truncado y no hay síntesis de citrato e isocitrato por la falta de acetil-CoA. Gln= Glutamina. Glu= Glutamato. Asp= Aspartato. α -KG= α -Cetoglutarato. AA= Aminoácidos. EAAT= Transportadores de aminoácidos excitadores. rNMDA= Receptores a NMDA. SERCA= bomba ATPasa de calcio del retículo endoplásmico/sarcoplásmico. PLA₂= Fosfolipasa A2. NOX= NADPH oxidasa. XO= Xantina oxidasa. ROS= Especies reactivas de oxígeno. Cit. C= Citocromo C. PARP-1= Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa 1. rAMPA/rKa= Receptores a AMPA y receptores a ácido kaínico.

III.- Efecto protector de los cuerpos cetónicos sobre enfermedades neurodegenerativas y daño agudo

Alrededor del año 1910 se comenzaron a describir los efectos del ayuno sobre la salud, reportando que éste mejoraba la calidad de vida e incluso podía eliminar manifestaciones de enfermedad, entre ellas los ataques epilépticos (Wheless, 2008), cuya fisiopatología se asociaba a desbalances en el equilibrio ácido-base del organismo, inclinándose hacia la alcalinización sistémica (Barborka, 1928). Es por eso que se propuso que la dieta alta en grasas y baja en carbohidratos simularía los efectos del ayuno y además induciría la producción de moléculas que acidificaran el ambiente celular (cuerpos cetónicos), revirtiendo así los ataques convulsivos (Barborka, 1928; Wheless, 2004). A principios de 1920 comenzó a utilizarse la dieta cetogénica en la clínica Mayo, en relación 4:1 grasas:hidratos de carbono y proteínas, dirigida a pacientes pediátricos con epilepsia refractaria, disminuyendo considerablemente el número de episodios convulsivos, incluso eliminándolos por completo en algunos pacientes (Barborka, 1928; Freeman, 1999). A partir de entonces se amplió la aplicación de la terapia con dieta cetogénica hacia diversos trastornos neurodegenerativos. Se ha reportado que reducen la degeneración en modelos de enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington (Kashiwaya et al. 2000; Tieu et al. 2003; Ruskin et al. 2011). Por otro lado, los CC protegen a las neuronas ante un evento de daño agudo, como la hipoglucemia inducida por insulina o la isquemia cerebral, al administrarse exógenamente en etapas tempranas (hasta 24 horas) posteriores al daño (Julio-Amilpas, et al., 2015; Suzuki, et al., 2002).

Los monocarboxilatos tales como los CC, pueden mantener la transmisión sináptica durante la ausencia de glucosa o inhibición de la glucólisis con iodoacetato (Izumi, et al., 1997). El pre-tratamiento con dieta cetogénica en ratas a las que se les indujo hipoglucemia con insulina previene la muerte de neuronas corticales e hipocampales en ratas inmaduras, efecto asociado a una elevación en la concentración plasmática de BHB aproximadamente de 1.7 mM (Yamada, et al., 2005).

Resultados anteriores de nuestro laboratorio demuestran que el AcAc puede prevenir eficientemente la muerte neuronal en el hipocampo de ratas y en cultivo primario de hipocampo, secundaria a un evento excitotóxico inducido por la administración del inhibidor de los transportadores de glutamato, PDC (L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxylato), o a la inhibición de la glucólisis con iodoacetato, ya sea administrado como pre-tratamiento o en una fase aguda (Massieu et al. 2003).

Hasta hace apenas unos años, a partir de diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, comenzaron a dilucidarse los mecanismos por los cuales los CC procedentes de la dieta cetogénica conferían un efecto neuroprotector, siendo su papel metabólico al que más se atribuía dicho efecto. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que tanto el isómero “D” del BHB (D-BHB) como el AcAc previenen la muerte neuronal secundaria a la hipoglucemia en un modelo *in vivo*, y a la AG y la inhibición de la glucólisis (con iodoacetato) *in vitro*, a través de un mecanismo mediado por la preservación de los niveles de ATP. También se descubrió que los CC, incluyendo al isómero “L” no metabolizable del BHB (L-BHB), tienen la capacidad de disminuir la producción y atrapar ROS (Massieu, et al., 2003; Haces, et al., 2008; Julio-Amilpas et al. 2015).

Los CC preservan la función mitocondrial, proporcionando NADH y succinato para los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) respectivamente, como se vio en modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Parkinson y Huntington. En estos estudios se reportó que el D-BHB evita el daño tisular secundario a la inhibición de la cadena respiratoria con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y ácido 3-nitropropiónico (3-NP), respectivamente (Tieu, et al., 2003; Lim, et al., 2011). El BHB también preserva el estado redox mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial, como se reportó en células SH-SY5Y de neuroblastoma, luego de la inhibición del complejo II mitocondrial con 3-NP (Imamura, et al. 2006).

Posteriormente, se descubrió que los CC, especialmente el BHB, poseían otras propiedades más allá de su función metabólica. Una de ellas es su papel en la regulación epigenética. De hecho, el BHB se ha encontrado como una marca en la cromatina, modificación epigenética conocida como β -Hidroxibutirilación (Xie, et al., 2016).

En un estudio en el que se usó un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington, los ratones R6/2, cuyas características son atrofia estriatal, agregación de huntingtina mutada (Httm) y desacetilación de la histona H4, así como en células PC12 con expresión de Httm^{Q103} (mutada agregada a 103 residuos de glutamina), se observó que el tratamiento tanto con D-BHB como L-BHB (4 mM) preserva la acetilación en dicha histona; el efecto se asocia a que el BHB mantiene la actividad de las acetilasas de histonas (Lim, et al., 2011). En concentraciones de 1-2 mM en plasma (inducidos por dieta cetogénica, o en modelos de restricción calórica o ayuno), el D-BHB puede inhibir directamente a las desacetilasas de histonas (HDACS); el D-BHB preserva la acetilación de residuos de lisina de la histona H3, lo cual se asocia con la estimulación de la expresión de genes encargados de la defensa antioxidante, como el factor de transcripción NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like

2), que promueve la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa (Newman y Verdín, 2014; Shimazu, 2013; Xie, 2015).

En otros aspectos, existen estudios que asocian al BHB con la modulación de procesos inflamatorios, reduciendo la actividad del inflammasoma NLRP3, sistema asociado a la enfermedad de Alzheimer (Youm, 2015). También, la oxidación de CC promueve la activación de los canales de potasio dependientes de ATP, lo cual impide la salida de K⁺ de la célula, induciendo así hiperpolarización y menor excitabilidad, proceso asociado a la disminución de los ataques convulsivos (Yellen, 2008; Lutas & Yellen, 2013). En relación a la inhibición de la hiperexcitabilidad, los CC pueden inhibir al transportador vesicular de glutamato en las neuronas, impidiendo su almacenamiento y liberación al espacio sináptico (Juge, et al., 2010).

El campo de investigación acerca del efecto protector de los cuerpos cetónicos y sus mecanismos es cada vez más amplio, incluso se han comenzado a aplicar distintos enfoques terapéuticos para inducir la cetogénesis y aprovechar sus efectos de manera más práctica y llevadera para el paciente, en contraste con la dieta cetogénica, como el uso de triglicéridos de cadena media, los cuales, al no necesitar transporte a través de los quilomicrones desde el intestino hasta el hígado, ni requieren carnitina para introducirse a la mitocondria, son rápidamente oxidables, por lo tanto inducen una rápida síntesis de acetil CoA que se convierte en cuerpos cetónicos (Page, et al. 2009).

IV.- Autofagia como mecanismo de rescate ante el estrés energético en las neuronas

- **IV.I Descripción de la autofagia**

En casos de estrés energético, la célula cuenta con mecanismos encargados de mantener la viabilidad, y uno de ellos es la macroautofagia (también llamada simplemente autofagia). Esta consiste en el reciclaje de organelos dañados o proteínas de larga vida por medio de su degradación vía lisosomal, tanto en condiciones basales para mantener la homeostasis celular, o bien, en situaciones de estrés energético para el suministro de sustratos que restauren los niveles de ATP (figura 3) (Laplante et al. 2013; Rubinsztein et al. 2012; Kroemer et al. 2010; Tanida et al. 2011).

La autofagia consta de varias fases orquestadas por una gran cantidad de proteínas específicas, lo cual hace que ésta tenga diversos puntos críticos de control. De manera inicial implica la formación de un fagóforo, que es una estructura que se forma a partir de la

membrana de algunos organelos, como el retículo endoplásmico, las mitocondrias, o incluso el núcleo, que al elongarse se convertirá en una vesícula de doble membrana (autofagosoma) que deberá fusionarse con los lisosomas (autolisosoma) para dar lugar a la degradación de su contenido (Levine et al. 2005; Yang & Klionsky, 2010; Baek et al. 2012; Kim, 2014; Kishi-Itakura, et al., 2014).

Luego de un estímulo de estrés celular como la falta de nutrimentos, se desatan señales que iniciarán la autofagia. Una de esas señales es el aumento en el índice AMP/ATP debido a la falta de sustratos que promuevan la fosforilación oxidativa del AMP luego de la cadena de transporte de electrones; en dichas circunstancias se activa la cinasa activada por AMP (AMPK) que tiene diversos blancos de fosforilación que regulan la autofagia, positiva o negativamente (Sarkar, 2013).

El complejo ULK1 (UNC-51-like kinase complex 1), integrado por la cinasa ULK1, ATG13, FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) y ATG101, participa como regulador positivo de la autofagia (Kishi-Itakura, et al., 2014). Durante el estrés energético, la AMPK puede fosforilar directamente a ULK1 en los residuos de serina 317 y 777 (Kim, et al., 2011), promoviendo la estabilidad del complejo y con ello el reclutamiento de proteínas necesarias para la formación del fagóforo, como lo es el complejo PtdIns3K/Vps34 (class III phosphatidylinositol 3-kinase / mammalian vacuolar protein sorting 34) formado por VPS34, BECN-1 (Beclina 1), ATG14 y VPS15 (Wirawan, et al., 2012; Rubinsztein, et al., 2012; Sarkar, 2013; Kishi-Itakura, et al., 2014).

Por otro lado, el complejo mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) mantiene inhibida a la autofagia bajo condiciones basales. Dicho complejo está compuesto por las proteínas mTOR (mammalian target of rapamycin), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) y RAPTOR (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin). mTORC1 funciona como cinasa de treoninas y serinas y responde a estímulos energéticos (en presencia de nutrimentos, sobretodo aminoácidos), promoviendo la traducción y el crecimiento celular (Gwinn et al., 2008; Sengupta & Sabatini, 2010). El complejo mTORC1 fosforila a ULK1 en el residuo de serina 757, induciendo su disociación e inactivación y regula negativamente a la autofagia (Jung et al., 2010). Sin embargo, en las condiciones de estrés energético AMPK puede fosforilar a RAPTOR en el residuo de serina 792, inhibiendo al complejo mTORC1 e impidiendo que fosforile a ULK1, estimulando así el inicio de la autofagia (Gwinn, et al., 2008; Shimobayashi et al., 2014).

Una vez iniciada la señalización que promueve la autofagia, comienza a formarse el fagóforo, éste es una estructura de aislamiento la cual puede nacer a partir de la membrana de algunos órganos como el retículo endoplásmico o las mitocondrias, y se va elongando a la vez de que va encerrando contenido citoplasmático destinado a degradarse; cuando se cierra completamente queda como una estructura de doble membrana (Hamasaki, et al., 2013; Shibutani & Yoshimori, 2014).

Para la formación y elongación del fagóforo, son necesarias las reacciones de conjugación de tipo ubiquitinación (Sarkar, 2013; Kishi-Itakura, et al., 2014). Primero se hace un enlace covalente entre las proteínas ATG5 y ATG12, mediado por las proteínas ATG7 (tipo E1) y ATG10 (tipo E2). Una vez conjugados, ATG5 y ATG12 se asocian a ATG16 (tipo E3), formando así el complejo ATG5-ATG12-ATG16, quien es el encargado de la elongación del fagóforo (Sarkar, 2013).

Por otro lado, la proteína LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) se asocia al fagóforo para promover su cierre (Sarkar, 2013). LC3 es una proteína citosólica asociada a microtúbulos que se corta constitutivamente por Atg4B en un residuo de glicina en el extremo carboxilo terminal; esta forma cortada se denomina LC3-I y es todavía inactiva (Tanida, 2011). Para que pueda ser completamente funcional requiere lipidarse con fosfatidiletanolamina en el fagóforo durante el proceso de elongación, y a esta forma lipidada se le denomina LC3-II. El proceso anterior también se realiza a través de reacciones de tipo ubiquitinación, en las que ATG7 (tipo E1) traspassa a LC3-I hacia ATG3 (tipo E2), para que ésta pueda ser lipidada, con ayuda del complejo ATG5-ATG12-ATG16 (tipo E3). La proteína WIPI2 (49 kDa WD-40 repeat containing protein that Interacts with PtdIns) interactúa con ATG16 y con ULK1 para cooperar al proceso de lipidación de LC3-I y para su ubicación en el fagóforo, lo cual promoverá el cierre de éste (Polson, et al., 2010; Sarkar, 2013; Kim et al. 2014; Russell, et al., 2014). Las moléculas de LC3-II que queden ubicadas dentro del autofagosoma serán degradadas junto con todas las estructuras citoplasmáticas engullidas, y junto con la membrana interna de la estructura. Dado que LC3-II se va formando conforme se estimula la autofagia, el aumento en los niveles de LC3-II funciona como un excelente indicador de la formación de autofagosomas (Sarkar, 2013; Kim et al. 2014).

Para que el autofagosoma madure debe fusionarse con los lisosomas (formando así autolisosomas) para dar lugar a la fase de degradación. Los lisosomas se fusionan con la membrana externa del autofagosoma (Hamasaki, et al., 2013). Entre otras proteínas,

dineína y LC3-II, participan mediando el transporte vesicular asociado a microtúbulos dirigiendo los autofagosomas hacia los lisosomas (Pankiv et al., 2010).

En la membrana externa quedan unidas las proteínas restantes de LC3-II que pueden ser cortadas y recicladas para utilizarse posteriormente. En la membrana interna también hay moléculas de LC3-II; a ellas se une la proteína p62/SQSTM1, que es una proteína encargada de dirigir a proteínas ubiquitinadas destinadas a degradarse por autofagia y, dado que queda dentro del autolisosoma junto con dichas proteínas, también se degrada con todo el cargo (Komatsu & Ichimura, 2010); por lo tanto, experimentalmente, p62/SQSTM1 funciona como un indicador del flujo autofágico (Komatsu & Ichimura, 2010; Katsuragi, et al., 2015). Las hidrolasas lisosomales como las catepsinas B y D, lipasas y enzimas lisosomales son las encargadas de degradar el contenido reclutado (Bjorkoy et al., 2009; Tanida, 2011; Dodson et al., 2013).

La recuperación del índice ATP/AMP, secundaria al suministro de sustratos, y la presencia de aminoácidos liberados posteriormente a la etapa de degradación, vuelve a activar a mTORC1 y se detiene la autofagia (Rubinsztein, 2012; Li et al. 2013; Sarkar, 2013; Russell et al. 2014).

- **IV.II Evidencia de la inducción de la autofagia durante la ausencia y reintroducción de glucosa**

A pesar de que la autofagia se describió en principio como un proceso citoprotector, la evidencia de la intercomunicación entre ésta y otros procesos de muerte celular como la apoptosis va en aumento (Yousefi, et al. 2006; Maiuri et al. 2007; Shi et al. 2012; Delgado, et al., 2014).

Hasta hace pocos años el papel de la autofagia durante la hipoglucemia/AG o la isquemia cerebral era controversial. Se había asociado su activación con la muerte neuronal, a la que se le denominó muerte autofágica (Jang et al., 2013; Maiuri, et al., 2007; Liu, et al., 2010). En modelos de isquemia/hipoxia cerebral, se observó que la inhibición de la autofagia previene la muerte neuronal (Levine, et al. 2005; Koike et al. 2008; Kang et al. 2011; Shi, et al. 2012) sugiriendo su contribución al daño cerebral.

Por el contrario, se reportó que la administración de inhibidores de la autofagia (bafilomicina y 3-MA) durante la fase de RG, luego de un periodo de AG, induce la activación de proteínas proapoptóticas (Jang et al. 2013), sugiriendo un papel protector de la autofagia.

En estudios de privación de oxígeno y glucosa (OGD, oxygen-glucose deprivation, por sus siglas en inglés) en células PC12 sometidas a un protocolo de preconditionamiento

isquémico *in vitro*, se observó que la autofagia funciona como un mecanismo que contribuye a mantener la viabilidad celular en dichas condiciones, ya que tanto la formación de autofagosomas como su degradación aumentan luego del evento de OGD, y esto se asoció con menor número de células apoptóticas (Park et al. 2009).

En modelos de enfermedad de Huntington, la autofagia previene la neurodegeneración ya que constituye un mecanismo de degradación de proteínas agregadas como la huntingtina mutada (Bjorkoy et al. 2005; Nixon, 2013), y en concordancia con esto, se ha observado que los ratones con una mutación nula en el gen *Atg5* desarrollan neurodegeneración, al igual que la mutación del gen de *Atg7* (Hara, et al., 2006; Komatsu, et al., 2006).

Experimentos recientes de nuestro grupo muestran que la autofagia se activa de manera temprana después de retirar la glucosa del medio de cultivo en neuronas de corteza cerebral de rata; sin embargo, el proceso ocurre de manera aberrante dando lugar a una autofagia no funcional que contribuye a la muerte. Los resultados sugieren que la asociación de la autofagia con la muerte neuronal está relacionada a su mal funcionamiento, que involucra la disfunción lisosomal y liberación de catepsinas (Gerónimo-Olvera et al., 2017).

Existen estudios que plantean que la integridad de los lisosomas, tanto en la fase de iniciación como en la fase de degradación, es esencial para que el proceso de autofagia se dé adecuadamente (Li et al., 2013). Por lo tanto, se requiere que el proceso autofágico funcione óptimamente en todas sus fases para que pueda tener efecto citoprotector (Liu, et al., 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La autofagia se activa en respuesta a la privación de nutrientes a través de la inhibición de la vía de mTORC1, pero puede ocurrir de manera aberrante y contribuir a la muerte celular. Los CC se oxidan en las neuronas como sustratos alternativos a la glucosa, suministran energía y reducen la muerte neuronal en condiciones de hipoglucemia *in vivo* y de AG *in vitro*. Por lo tanto, en este estudio nos propusimos investigar si el efecto protector del D-BHB está relacionado con la inducción de una respuesta autofágica funcional dependiente de mTORC1.

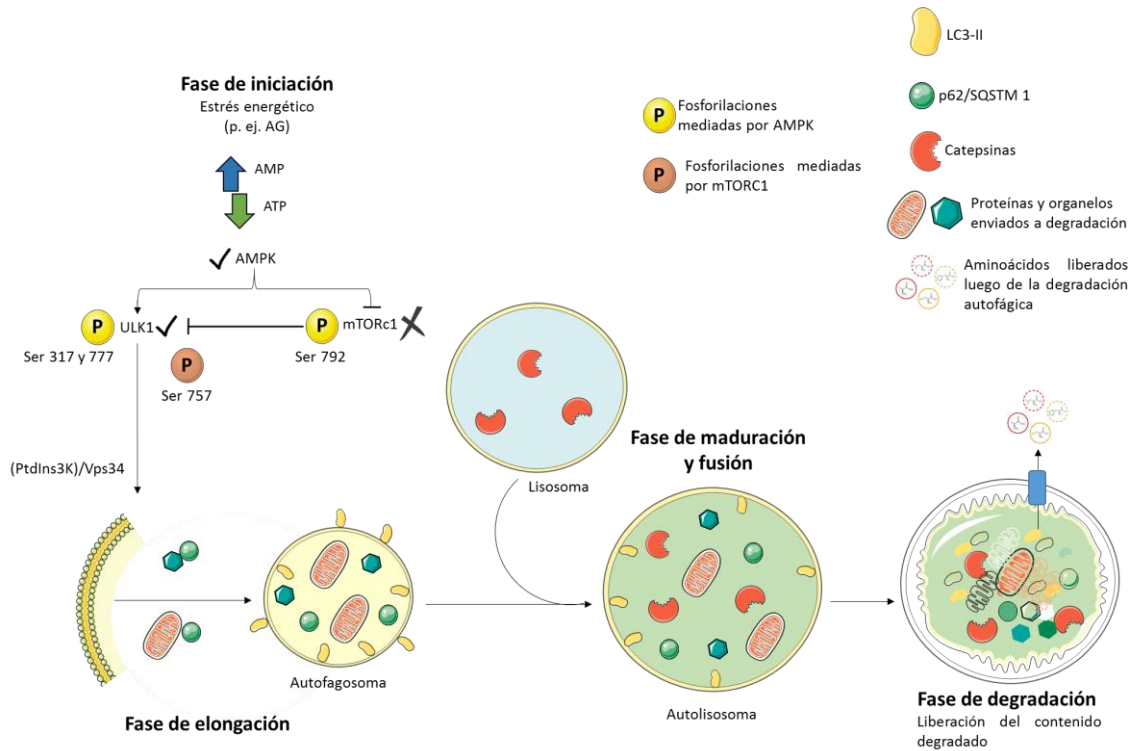


Figura 3. Proceso autofágico. Durante condiciones normales, el complejo mTORC1 regula negativamente a la autofagia por medio de la fosforilación inhibitoria del complejo ULK1 en el residuo de serina 757. Sin embargo, durante el estrés energético inducido por la AG se activa la AMPK al aumentar los niveles de AMP. ULK1 se activa secundario a su fosforilación por AMPK en los residuos de serina 317 y 777, ya que se permite su estabilidad gracias a la inactivación del complejo mTORC1, quien es inhibido gracias a la fosforilación del residuo de serina 792 mediada por AMPK. La activación de ULK1 estimula el reclutamiento de proteínas necesarias para la formación del fagóforo, que, al elongarse y madurar, se convertirá en un autofagosoma maduro, con ayuda de LC3-II. p62/SQSTM1 conduce hacia el autofagosoma al contenido citoplasmático que se va a degradar. Tanto las moléculas de LC3-II que quedan dentro del autofagosoma, como p62/SQSTM1, se degradan durante la última fase, luego de la fusión con los lisosomas.

HIPÓTESIS

El D-BHB favorecerá la viabilidad neuronal durante la AG y RG a través de la inducción de la autofagia funcional dependiente de la vía de mTORC1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto del D-BHB sobre la formación y degradación de autofagosomas durante la AG y la RG.
2. Evaluar si la inducción de la autofagia durante la AG y RG es dependiente de la vía de mTORC1.
3. Determinar si el efecto neuroprotector del D-BHB está relacionado con la activación de la vía de mTOR.

METODOLOGÍA

Cultivo celular: Se extrajeron cortezas de embriones de ratas de 17 días de gestación, posteriormente se sometieron a un proceso de disgregación mecánica y a otro proceso de disgregación con tripsina al 0.5%. Se sembraron en condiciones adherentes con poli-L-lisina en cajas de 35 mm o cajas de 12 pozos, según lo requerían los experimentos, a una densidad de 2.5×10^6 o 10×10^6 células por caja, respectivamente (2.2×10^5 células/cm² en todos los casos). Se utilizó medio neurobasal suplementado con 0.5 mM de glutamina, 1% de B27 con antioxidantes (acetato de DL- α -Tocoferol, DL- α -Tocoferol, catalasa, superóxido dismutasa) + 1% de B27 sin antioxidantes y 2% de gentamicina. A los 4 días *in vitro* (DIV) se adicionó medio fresco suplementado con citosina-D-arabinosa (0.8 μ M) para reducir el crecimiento de glía. Los experimentos se realizaron a los 8 DIV.

Tratamiento durante la AG: Transcurridos 8 DIV se sometió a las células a un tratamiento con un medio de cultivo sin glucosa (DMEM, Dubelcco's Modified Eagle's Medium sin glucosa) durante 1 y 2 horas seguidos de 3, 6 y 20 horas de RG adicionando el medio Neurobasal previamente retirado. Inmediatamente después se extrajeron las células y se obtuvieron homogenados para posteriormente realizar los inmunoblots para las proteínas de autofagia. En el caso de la identificación de la fosforilación de RAPTOR se extrajeron las células a las 3, 12 y 20 h después de la RG. Ambos protocolos se realizaron en presencia o ausencia de D-BHB, a una concentración final de 10 mM durante el periodo de AG y 5 mM durante la RG. Este protocolo de administración de D-BHB derivó de experimentos previos que indicaron que éste es óptimo para prevenir la muerte de las neuronas. Los

cultivos también fueron tratados con 10 mM de 3-metiladenina (3-MA inhibidor de la fosfatidilinositol 3-cinasa de clase III) y 20 μ M de cloroquina (CQ, inhibidor de la degradación autolisosomal por alcalinización del medio intralisosomal), para inhibir la formación de autofagosomas y la etapa de la degradación de la autofagia, respectivamente. También se utilizó 150 mM de trehalosa, un disacárido que induce la autofagia impidiendo la captación de glucosa por medio de la inhibición de los transportadores GLUT (Mardones, et al., 2016; Chen, et al, 2016).

Evaluación de viabilidad por MTT: Luego del periodo de AG (2 h) y RG (22 h) en presencia o ausencia de D-BHB, se realizó un ensayo colorimétrico basado en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual se convierte en sal de formazán. El método consiste en incubar a las células por 50 minutos con 30 μ l de MTT por cada 500 μ l de medio de cultivo, después se aspira el medio para luego solubilizar el MTT con isopropanol y leer su absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Evaluación de viabilidad por LDH (lactato deshidrogenasa): Se realizó el ensayo luego de 2 h de AG y 17 h de RG en presencia o ausencia de D-BHB. La determinación se realiza monitoreando la disminución de la absorbancia a 340 nm que resulta de la conversión del NADH a NAD⁺ utilizado por la enzima lactato deshidrogenasa que se libera al medio de cultivo cuando hay daño a la membrana y muerte celular, al transformar el piruvato a lactato. El ensayo se prepara agregando piruvato (20 mM) y NADH (9.4 mM) a una alícuota de medio, se deja incubar por cinco minutos y después se lee la absorbancia inicial; se deja incubar otros cinco minutos y se vuelve a leer la absorbancia. Se reporta la diferencia de las dos lecturas de absorbancia para identificar la cantidad de NADH utilizado por la enzima lactato deshidrogenasa para reducir al piruvato y convertirlo a lactato. Una mayor diferencia entre la absorbancia inicial y la final significa una mayor utilización del NADH, indicando que hubo mayor liberación de lactato deshidrogenasa al medio, y por lo tanto, mayor cantidad de células dañadas.

Evaluación de la viabilidad con fluorescencia: Para corroborar la viabilidad se utilizaron marcadores fluorescentes para las células vivas y muertas, calceína-AM y homodímero de etidio, respectivamente. La calceína-AM es un marcador que es captado y procesado por esterasas inespecíficas dentro de las células vivas, emitiendo una coloración verde. En

cambio el homodímero de etidio es un compuesto impermeable que solo logra entrar a las células cuando la membrana está comprometida, se une al DNA y emite una coloración roja. Dichos marcadores se añadieron al medio de cultivo (calceína 2 μM y homodímero de etidio 1 μM) después de 22 h de RG durante 30 min, posteriormente se enjuagaron con medio Lockey y se tomaron imágenes usando microscopía confocal (FV 1000; Olympus) con láser Ar 488 nm (para la calceína) y Ar 596 nm (para el etidio).

Observación de la formación de autofagosomas mediante microscopía confocal: Se evaluó la presencia de los autofagosomas en neuronas cultivadas en ausencia de glucosa con o sin D-BHB utilizando el marcador fluorescente Cyto-ID en células vivas a diferentes tiempos de AG siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se pre-incubaron 20 min con Cyto-ID antes de ser expuestas a 30, 60 y 90 minutos de AG con o sin D-BHB en la cámara de perfusión. Se utilizó Hoechst para identificar los núcleos. Se cuantificó la cantidad de partículas positivas a Cyto-ID utilizando el sistema de análisis Fiji del software ImageJ, tomando en cuenta partículas positivas con un tamaño promedio de 0.52 μm^2 .

Inmunocitoquímica: Luego de 2 h de AG y 2 h de AG + 3 h de RG, las células se enjuagaron con PBS 0.1M, se fijaron con metanol durante 20 minutos y luego se bloquearon con PBS/albumina al 5% con suero de caballo al 5% y tritón X-100 al 0.1% durante una hora. Se incubaron los anticuerpos primarios (LC3 o p62/SQSTM1) en concentración 1:500 (para ambos anticuerpos) durante toda la noche a 4°C; Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos (FITC anti-conejo en una dilución 1:500 para LC3 y p62/SQSTM1). Los núcleos se identificaron con Hoechst. Se observó presencia de puncta positivos a LC3 como indicador de la formación de autofagosomas y positivos a de p62/SQSTM1 como indicador de la fase de degradación de la autofagia

Western blot: Luego de los tratamientos de AG/RG, en presencia o no del D-BHB, en el cultivo de neuronas corticales, se prepararon extractos proteicos de las células cultivadas en cajas de 35 mm, previamente enjuagadas con 1 ml de PBS, utilizando 100 μl de buffer de lisis celular a base de cloruro de sodio (150 mM), dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 %, tritón 1 %, y deoxicolato de sodio 0.5 %, todo disuelto en buffer de tris-HCl 50 mM. Se añadió complete en concentración 2:1 en el buffer, que consiste en una preparación comercial de inhibidores de proteasas y fosfatasa (cOmplete®, Roche). Posteriormente, el lisado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante

y se desechó el pellet. La concentración de proteínas en el sobrenadante se cuantificó por medio del método de Lowry. Las proteínas fueron desnaturalizadas con buffer de Laemmli 4x + mercaptoetanol mientras se hervían durante 3 minutos. Las proteínas en los extractos celulares se separaron mediante electroforesis, en geles de acrilamida / bis-acrilamida al 18 % (para LC3-II) y al 10 % (para BECN1, p62/SQSTM1, y pRAPTOR); posteriormente se realizó una electrotransferencia a una membrana de PVDF previamente activada con metanol, después se bloquearon con leche descremada en polvo, diluida al 5 % en buffer TBS-Tween. Posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios durante toda la noche en una solución de leche + TBS-Tween igual a la que se utilizó para bloquear las membranas. Los anticuerpos primarios se incubaron a una concentración 1:1000, para LC3-II, BECN1, pRAPTOR, 1:500 para p62/SQSTM1, y 1:3000 para actina (como control de carga). Se utilizó anticuerpo secundario anti-conejo a una concentración igual de 1:7000 para la reacción con los anticuerpos primarios para LC3-II, BECN1, p62/SQSTM1, y pRAPTOR, así como anticuerpo secundario anti-ratón en concentración 1:7000 incubado durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción del inmunoblot se detectó con sustrato de quimioluminiscencia acoplado a peroxidasa de rábano.

Análisis estadístico: Los datos se expresan como la media \pm error estándar y fueron analizados con ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de comparación múltiple de Fisher.

RESULTADOS

El β -hidroxibutirato preserva la viabilidad de neuronas sometidas a la ausencia y reintroducción de glucosa.

Experimentos previos del laboratorio han mostrado que concentraciones de 5 y 10 mM de D-BHB reducen eficientemente la muerte neuronal en cultivos expuestos a condiciones de deficiencia de energía inducida por privación de glucosa (Julio-Amilpas, et al. 2015). En experimentos piloto se establecieron las condiciones de incubación de D-BHB tanto durante la AG como la RG que redujeran eficientemente la muerte de las neuronas corticales. Con base en los resultados que se muestran en la figura 1 se escogió una concentración de D-BHB de 10 mM durante la AG y de 5 mM durante la RG para prevenir la muerte neuronal.

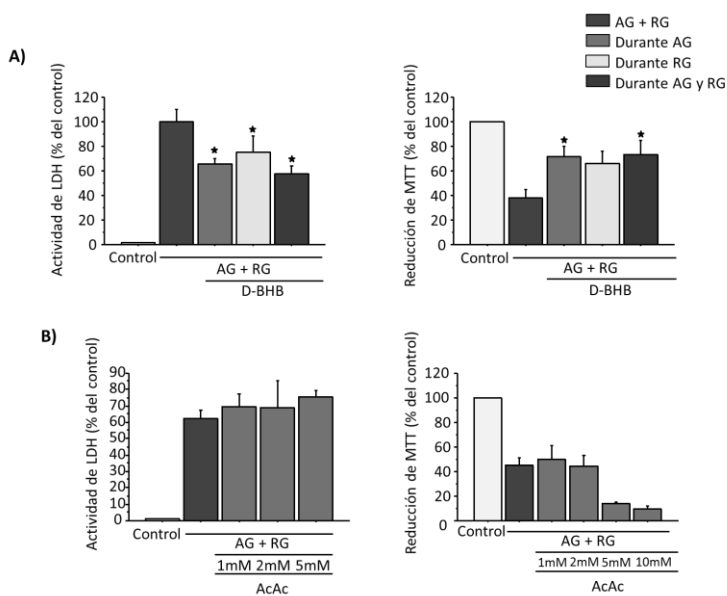


Figura 1. El D-BHB preserva la viabilidad neuronal durante la AG/RG, no así el AcAc.

A) Las células fueron incubadas con 10 mM de D-BHB ya sea solo durante la AG o la RG, o 10 mM durante la AG + 5 mM durante la RG. Las barras representan porcentaje de actividad de LDH en el medio (izquierda) y porcentaje de reducción de MTT en la mitocondria de las células vivas (derecha) luego de 2 h de AG + 17 y 22 h de RG, respectivamente.

B) Curva dosis-respuesta del efecto del AcAc para MTT y LDH. Las células se incubaron con 1, 2, 5 y 10 mM de AcAc durante la AG y se repitió la dosis durante la fase de RG. Las barras representan porcentaje de actividad de LDH en el medio (izquierda) y porcentaje de reducción de MTT en la mitocondria de las células vivas (derecha) luego de 2 h de AG + 17 y 22 h de RG, respectivamente.

Los datos representan la media \pm error estándar y fueron analizados con ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Fisher. *P < 0.05 relativo a AG (n = 3-4).

Con el objetivo de estudiar si el BHB era el único CC que tenía un efecto protector en las neuronas expuestas a AG/RG, se realizó una curva dosis-respuesta del efecto del AcAc sobre la viabilidad de los cultivos usando los ensayos de MTT y LDH. No se observó ningún efecto reductor de la muerte a ninguna de las concentraciones probadas (figura 1B). Con base en estos resultados se continuó investigando únicamente el efecto del D-BHB.

Para corroborar el efecto protector del D-BHB en contra de la muerte inducida por la AG/RG, se realizaron ensayos con marcadores de células vivas y muertas (calceína-AM y homodímero de etidio, respectivamente). Como se observa en la figura 2, la AG induce muerte neuronal, detectada por el aumento de las células positivas a homodímero de etidio (rojo) y la reducción de las células positivas a calceína-AM (verde). La adición de D-BHB revierte este efecto.

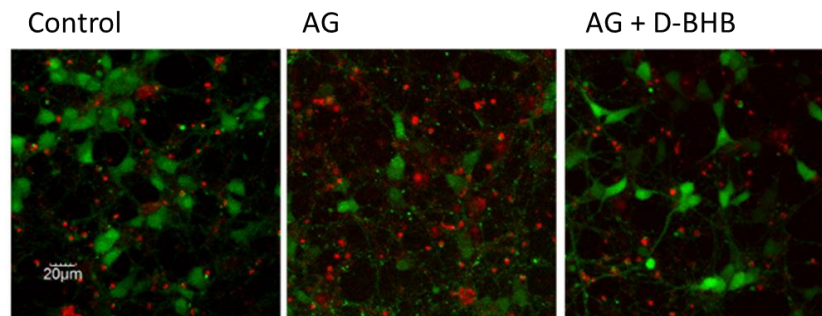


Figura 2. El D-BHB protege contra la muerte neuronal inducida por AG en cultivos de neuronas corticales. Imágenes representativas de células teñidas con calceína (verde) y homodímero de etidio (rojo) para monitorear células vivas y muertas, respectivamente.

El D-BHB disminuye los niveles de diferentes indicadores de autofagia en neuronas corticales sometidas a la ausencia y reintroducción de glucosa

Una vez corroborado el efecto protector del D-BHB durante la AG/RG, se cuantificaron por medio de western blot los niveles de proteínas importantes para el desarrollo de la autofagia en dichas condiciones, con el objetivo posterior de asociar ambos sucesos.

Para realizar los ensayos de western blot de los indicadores de autofagia, las células fueron expuestas a 1 y 2 h de AG y a 3, 6, y 20 h de RG, y se trataron con o sin 10 mM de D-BHB únicamente durante la AG, o 10 mM durante la AG + 5mM durante el periodo de RG, dosis que resultaron más efectivas en la sobrevivencia durante la AG/RG.

Inicialmente se consideró importante el estudio de los niveles de BECN1, ya que es una proteína importante para el inicio de la formación de autofagosomas.

Los niveles de BECN1 en neuronas cultivadas en AG durante 2 horas no cambiaron, mientras que disminuyeron después de 3 h de RG. Cuando el D-BHB se incubaba durante la AG y la RG, los niveles de BECN1 disminuyen, en particular en el periodo de RG (figura 3A). Esto implica que, posiblemente, el D-BHB regule negativamente la producción de BECN1, o que aumente su degradación.

El aumento en los niveles de LC3-II es considerado como un indicador de la formación de autofagosomas. Los resultados muestran que la ausencia de glucosa indujo un aumento en la lipidación de LC3. Los niveles de LC3-II aumentan a las 2 h de AG; sin embargo, estos disminuyen cuando se reintroduce glucosa por un periodo de 3 h. Cuando se agrega D-BHB durante el periodo de AG se observó una disminución en los niveles de LC3-II desde las 2 h de AG y regresaron a los niveles control en el periodo de RG (figura 3B). Se utilizó trehalosa como control positivo de la inducción de autofagia (Mardones, et al., 2016).

Lo anterior sugiere que el D-BHB induce una menor producción de autofagosomas durante la AG, así como una recuperación de la autofagia basal más rápida al momento de la RG.

Para evaluar la fase de degradación de la autofagia se cuantificaron los niveles de p62/SQSTM1, ya que esta proteína se queda secuestrada junto con todo el cargo debido a que se transporta hacia el autofagosoma con proteínas ubiquitinadas destinadas a degradarse.

De acuerdo a los resultados no hubo cambio en la cantidad de dicha proteína durante la fase de AG, pero ésta disminuye después de 3 h de RG. En presencia de D-BHB, los niveles de p62/SQSTM1 son menores al control tanto en la fase de AG como en la de RG (figura

3C), sugiriendo que el cuerpo cetónico promueve la degradación autofágica desde etapas tempranas de AG y durante la RG.

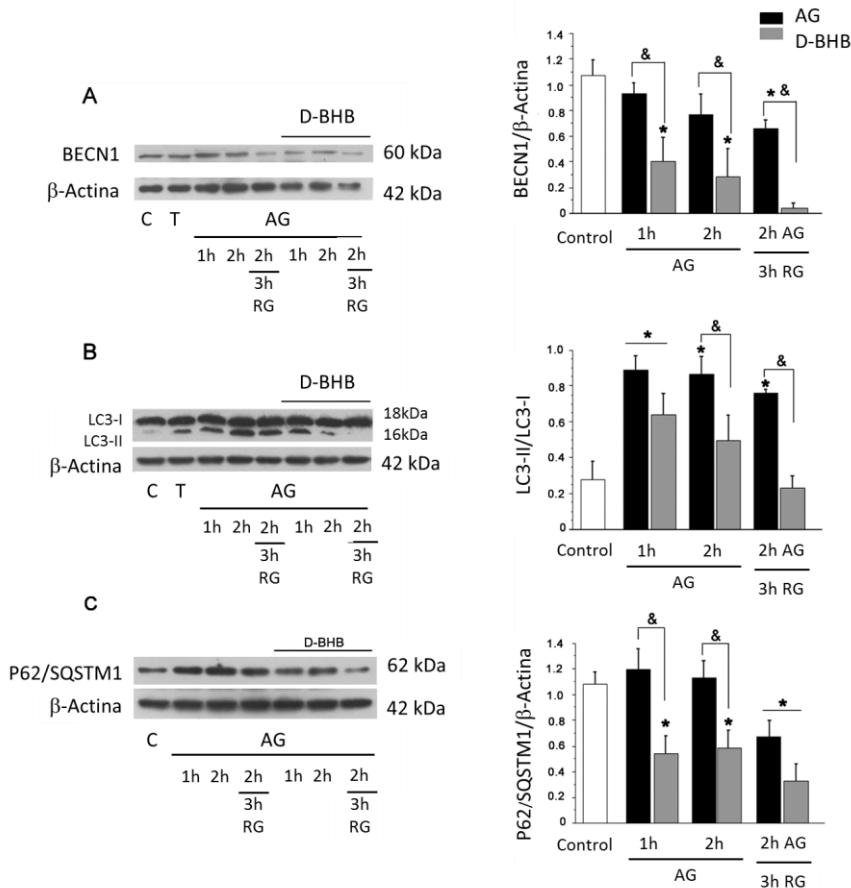


Figura 3. Disminución de los diferentes indicadores de autofagia en presencia de D-BHB durante la AG y la RG. A) BECN 1, B) LC3-II, C) p62/SQSTM1. Los datos representan la media \pm error estándar (n=3-6). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher *p <0.05 vs. control y & p <0.05 vs D-BHB. T, Trehalosa.

Dado que los resultados de los western blot sugieren que el D-BHB disminuye la acumulación de autofagosomas, y esto podría deberse a una mayor degradación de los autofagosomas formados, se realizó una inmunocitoquímica para observar la agregación de LC3 y corroborar lo anterior.

Dado que LC3 es una proteína citosólica que en condiciones normales está asociada a microtúbulos, al momento de la estimulación de la formación de autofagosomas, LC3 se activa (cortándose y lipidándose) y se dirige hacia los autofagosomas, por lo que en la inmunocitoquímica se puede observar en la célula un patrón punteado distribuido por el citosol.

La figura 4 muestra una disminución en la inmunoreactividad de LC3 (puncta) en presencia de D-BHB luego de la AG y durante la fase de RG. Esto significa que, probablemente el cuerpo cetónico disminuye la formación de autofagosomas.

Se usó cloroquina como control positivo para detener la degradación autolisosomal y observar claramente los agregados (puncta) de LC3, ya que la cloroquina es un fármaco que detiene el proceso de degradación impidiendo la acidificación de los lisosomas.

También fue posible el observar como la agregación de p62/SQSTM1 fue menor en presencia del D-BHB durante toda la etapa de RG (3, 6 y 20 horas), como se muestra en la figura 5.

Otra manera de corroborar los hechos anteriores es observando la formación de autofagosomas, lo cual es posible utilizando un marcador de autofagosomas, como los es el Cyto-ID, que es un colorante fluorescente que identifica estructuras como autofagosomas inmaduros, autofagosomas, y autolisosomas. Con lo anterior, se pudo identificar y cuantificar la formación de los autofagosomas durante la AG en presencia o ausencia de D-BHB (figura 6A), y se observó que en presencia de D-BHB se formó un número menor de autofagosomas después de 1 h de AG y una tendencia a formar un menor número de autofagosomas hasta las 1.5 h de AG, aunque no resultó significativa (figura 6B). Lo anterior corrobora los resultados obtenidos con los western blot y la inmunocitoquímica.

Hasta el momento, los resultados sugieren que durante la AG hay formación de autofagosomas y que en presencia del D-BHB esta formación es menor, e incluso hace que la cantidad de éstos disminuya más rápidamente, sugiriendo que probablemente el cuerpo cetónico estimule la degradación autofágica.

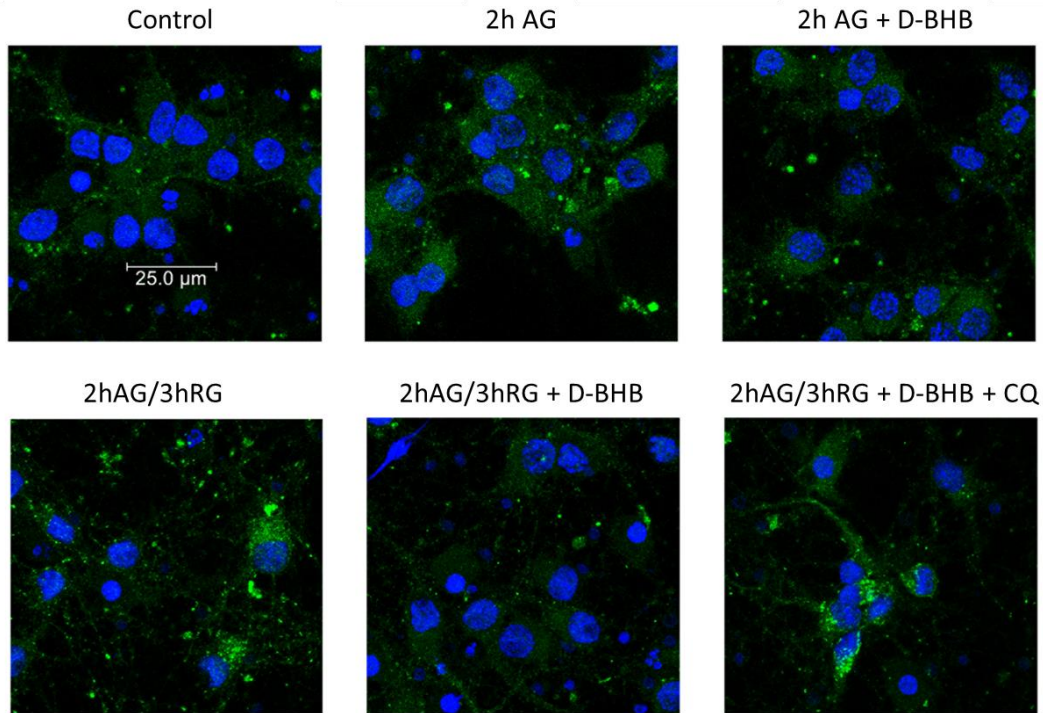


Figura 4. El D-BHB disminuye la agregación de LC3 durante la AG/RG.

Inmunocitoquímica de LC3 (verde) y tinción hoechst para núcleos (azul). Los cultivos fueron expuestos únicamente a 2 h de AG ó a 2 h AG + 3 h RG en presencia ó ausencia de D-BHB. También fueron expuestos a 2 h de AG + 3 h de RG + D-BHB + cloroquina (CQ). En presencia de D-BHB se observan menos punta positivos a LC3 tanto durante la AG como la RG. La CQ revierte el efecto del D-BHB observándose agregados de LC3.

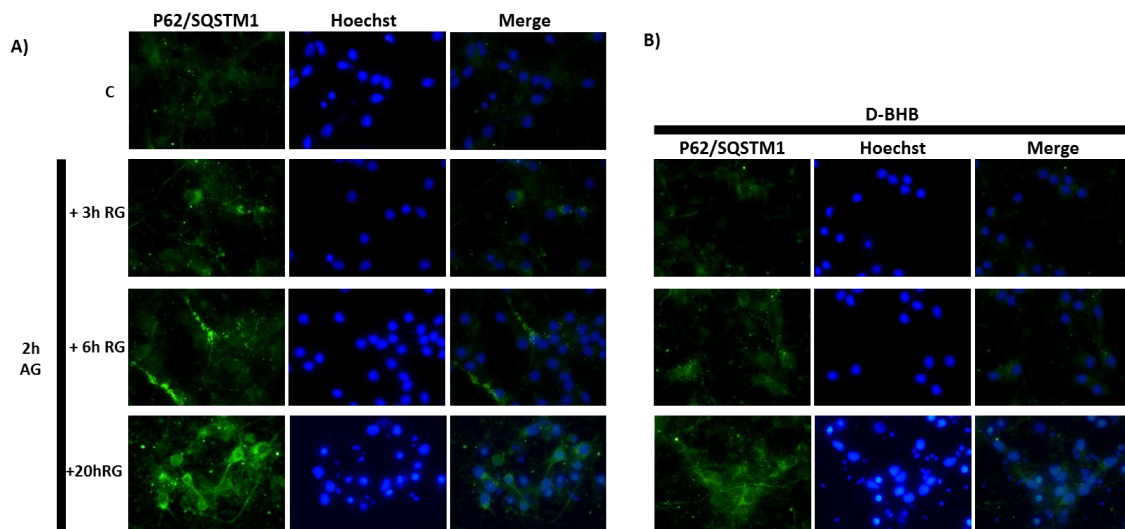


Figura 5. El D-BHB disminuye la agregación de p62/SQSTM1 durante la AG/RG. Inmunocitoquímica para p62/SQSTM1 (verde) y cotinción nuclear con hoechst (azul) después de 3, 6 y 20 h de RG posteriores a 2 h de AG. (20X).

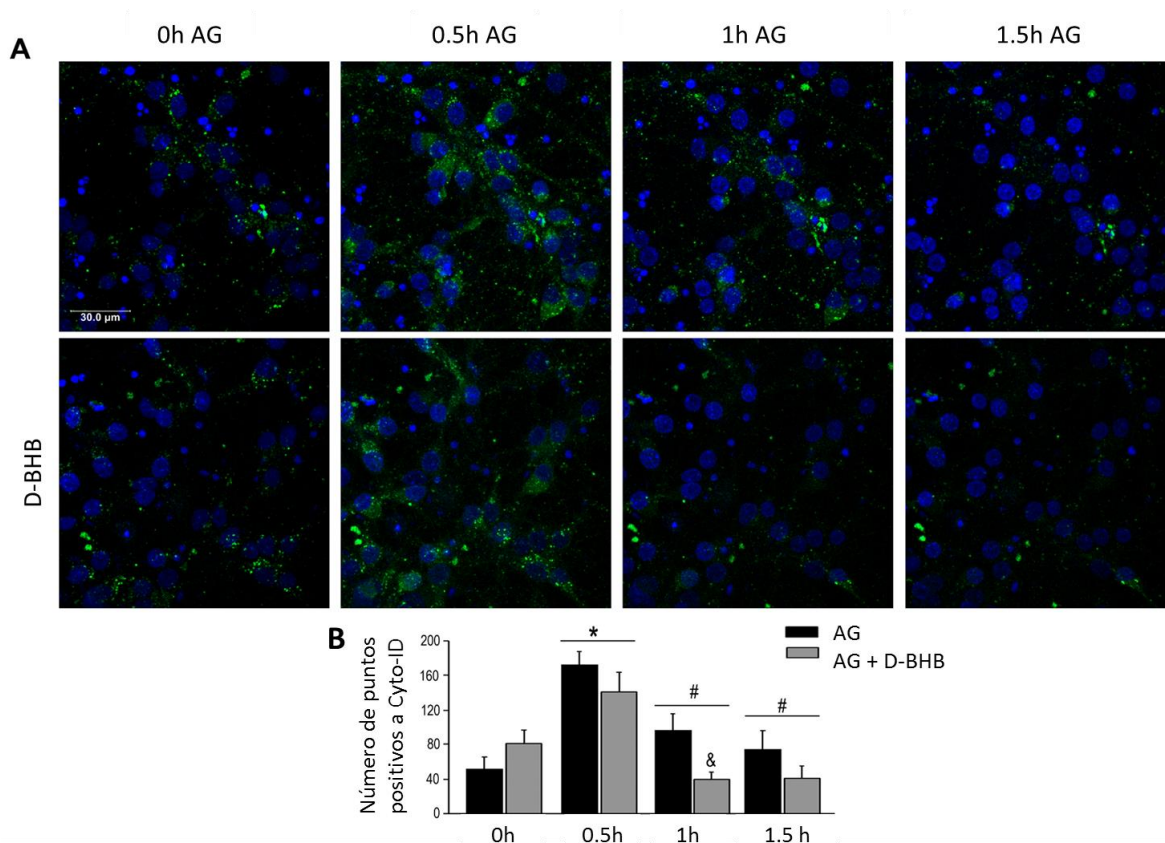


Figura 6. El D-BHB induce una rápida disminución del número de autofagosomas durante la AG. A) Cultivos corticales expuestos a AG en presencia o ausencia de D-BHB. Imágenes representativas muestran la formación de los autolisosomas usando el kit Cyto-ID (verde) y coteñidas con Hoechst (azul) durante 0.5-1.5 h de AG. B) Cuantificación de partículas positivas a Cyto-ID.

Posteriormente se investigó si la disminución en los niveles de LC3-II y de p62/SQSTM1 por el D-BHB puede deberse a la estimulación del flujo autofágico. Para esto, se utilizó cloroquina (CQ), un inhibidor de la degradación autofágica debido a que impide la acidificación de los lisosomas. Como se puede observar en la figura 7, en presencia de CQ los niveles de p62/SQSTM1 y LC3-II se recuperaron en la fase temprana de RG (3 h). El efecto del D-BHB fue completamente revertido por la CQ, sugiriendo que, efectivamente, el flujo autofágico está activo durante la RG y es estimulado por el D-BHB. A tiempos largos de RG (6 y 20 horas) se observó el mismo efecto.

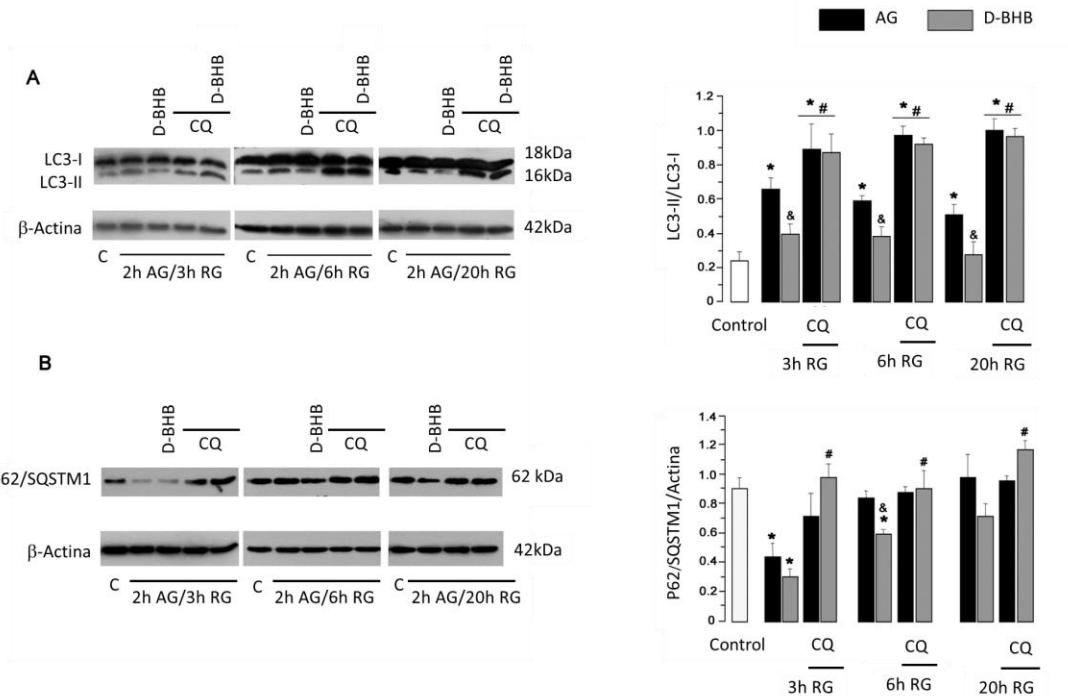


Figura 7. El D-BHB estimula la fase de degradación de la autofagia. Efecto de la CQ sobre los niveles de LC3-II y p62/SQSTM1 en cultivos expuestos a 2 h de AG y 3, 6 y 20 h de RG en presencia o ausencia de D-BHB. Western blots representativos de la cuantificación del índice LC3-II/LC3-I (A) y niveles de p62/SQSTM1/Actina (B). Las barras representan la media \pm error estándar (n=3-6). Datos analizados con ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. *p<0.05 vs. control, & p<0.05 vs AG sin D-BHB, # p<0.05 vs. células expuestas a AG/RG sin CQ.

Para determinar el papel de la autofagia sobre la supervivencia después de la AG/RG, se utilizó un inhibidor del complejo PtdIns3K/Vps34, (3-MA). La inhibición de la autofagia previene la muerte neuronal inducida por la AG (figura 8A y 8B). Además, el 3-MA disminuyó los niveles de LC3-II (figura 7C), sugiriendo que la autofagia contribuye al proceso de muerte neuronal desatado después de la AG/RG.

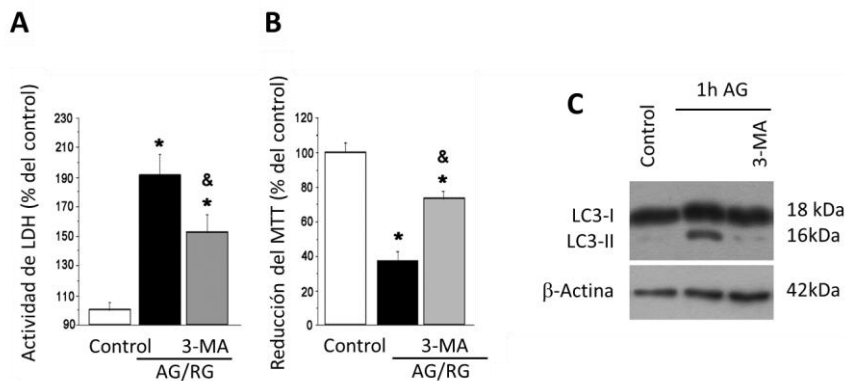


Figura 8. La inhibición de la autofagia con 3-MA protege contra la muerte neuronal inducida por AG. Cultivos expuestos a 2 h de AG en presencia de 3-MA y 22 h de RG. La viabilidad se evaluó cuantificando la liberación de LDH (**A**) y la reducción de MTT (**B**). Las barras representan la media \pm error estándar (n=6). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. * $p < 0.005$ vs control y $\&p < 0.05$ vs AG. Un western blot representativo del efecto inhibitor del 3-MA sobre la transformación de LC3-I a LC3-II se muestra en (**C**).

Por otro lado, se determinó si el papel del D-BHB sobre la viabilidad neuronal está asociado principalmente a su acción metabólica más que a otros mecanismos (por ejemplo: mecanismos antioxidantes). Para ello, utilizamos el isómero no fisiológico del BHB, el isómero L-BHB, ya que éste no contribuye a la generación de ATP pero sí es capaz de disminuir la producción de ROS ejerciendo un efecto protector contra la muerte, aunque de menor magnitud que el del D-BHB (Julio-Amilpas, et al. 2015). Los resultados (figura 9) muestran que los niveles de BECN1 y LC3-II no se alteraron por la presencia de L-BHB durante la fase de AG o durante la RG temprana; sin embargo, los niveles de p62/SQSTM1 mostraron una tendencia a disminuir durante ambas fases, aunque no fue significativa.

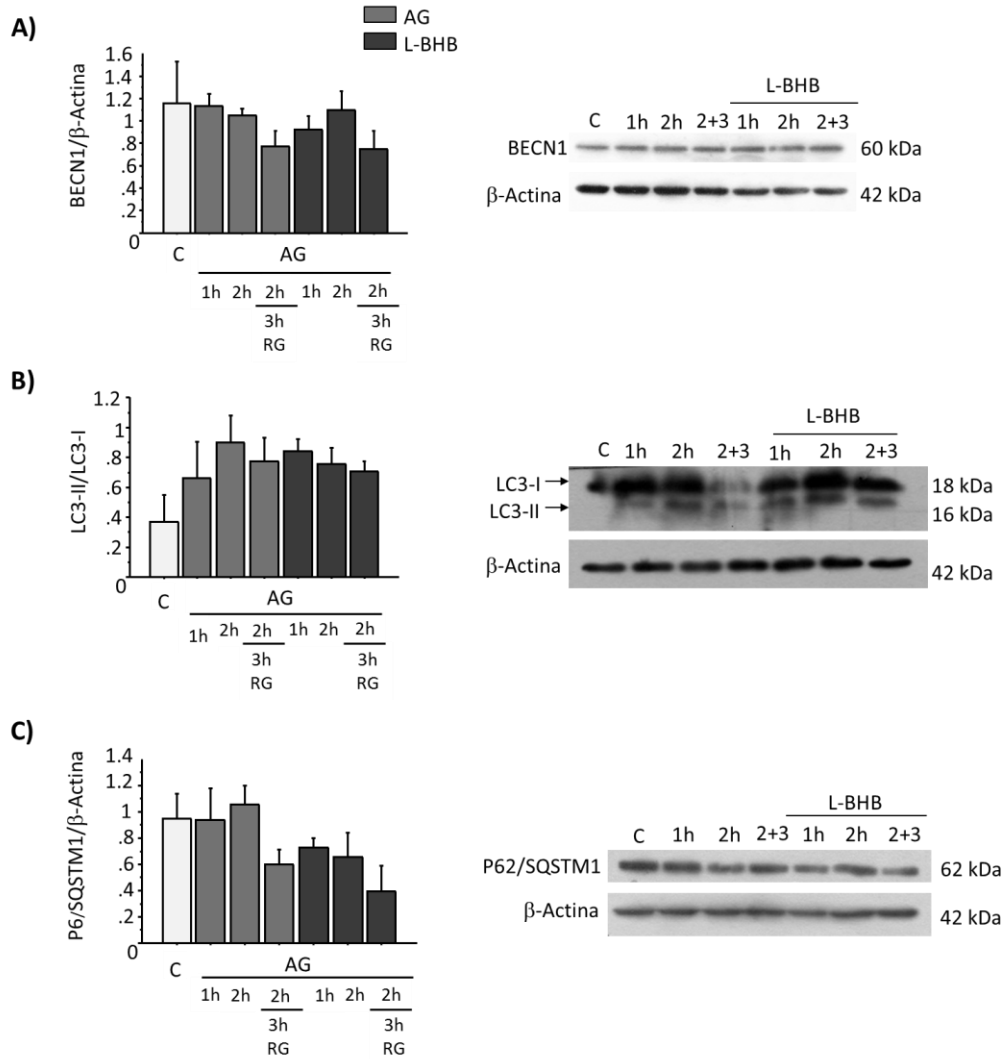


Figura 9. El L-BHB no tiene efecto sobre la autofagia durante la AG y la RG temprana. Western blots representativos y gráficas con la cuantificación respectiva de la densidad óptica de cada indicador de autofagia, BECN1/actina **(A)**, índice LC3-II/LC3-I **(B)** y p62/SQSTM1/Actina **(C)** (n=4).

Los resultados anteriores en su conjunto sugieren que, durante la AG, la célula se vale de mecanismos de respuesta al estrés energético para mantener su viabilidad y uno de ellos es la autofagia; sin embargo, la degradación autofágica no ocurre eficazmente a menos de que el D-BHB esté presente.

El D-BHB restablece la activación basal del complejo mTORC1 a las 12 horas de reintroducción de glucosa.

La proteína cinasa activada por AMP (AMPK) es un sensor energético que responde ante el estrés por disminución en el índice ATP/AMP. Al ser activada, estimula la inducción de la autofagia de manera indirecta, mediante la fosforilación inhibitoria de la proteína RAPTOR (en la serina 792), que forma parte del complejo mTORC1, y de manera directa fosforilando a ULK1 en los residuos de serina 317 y 777. Dado que el D-BHB funciona como un sustrato energético y que restaura los niveles de ATP durante la AG (Julio-Amilpas, 2015), es probable que AMPK se encuentre inactiva en presencia del D-BHB y no fosforile a RAPTOR. En esta condición la autofagia se encontraría inhibida, ya que la señal de estrés disminuye y la síntesis de proteínas u otros procesos dependientes de energía podrían reactivarse.

Debido a lo anterior, evaluamos el estado de activación de la proteína RAPTOR por medio de western blot con un anticuerpo específico para la forma fosforilada en el residuo de serina 792, la cual es fosforilada directamente por AMPK, inhibiéndola.

Resultados preliminares (figura 10) muestran que los niveles de p-RAPTOR aumentan durante las 2 h de AG, coincidiendo con los resultados anteriores que muestran que en ese periodo la autofagia está activa; dicho efecto no es modificado en presencia del D-BHB. A tiempos cortos de RG (3 h), los niveles de fosforilación de RAPTOR disminuyen, sugiriendo que el complejo mTORC1 podría estar activo nuevamente y por lo tanto inhibiendo a la autofagia. Las células incubadas con D-BHB a estos tiempos presentan el mismo efecto.

Nuestros resultados descritos anteriormente muestran que a las 6 h de RG, el D-BHB estimula el flujo autofágico en comparación con las células que no fueron incubadas en presencia del cuerpo cetónico. Sin embargo, los resultados de la cuantificación de los niveles de RAPTOR fosforilado fueron muy variables a este tiempo de RG (datos no mostrados), por lo que se monitorearon los niveles de p-RAPTOR a un tiempo más largo de RG (12 h). Resultados de nuestro grupo muestran que a las 12 h de RG las células se encuentran en un estadio determinante para la sobrevivencia, en el que aproximadamente el 50% de las células han comenzado a desarrollar apoptosis y el otro 50% se mantienen viables y presentan una gran cantidad de autofagosomas (Gerónimo-Olvera, et al., 2017). Es por eso que evaluamos si mTORC1 podría participar en la inducción de la autofagia desatada en estas etapas tardías de la RG (12 h) manteniendo la viabilidad celular. Los resultados muestran que a las 12 h de RG, la fosforilación de RAPTOR vuelve a aumentar significativamente a un nivel similar al que alcanzó durante la AG, mientras que aquellas

células incubadas en presencia del D-BHB mantienen la fosforilación de RAPTOR a niveles basales (figura 9). Estos resultados sugieren que la inhibición de mTORC1 a las 12 h posiblemente participa en la inducción de la autofagia tardía en las células incubadas sin D-BHB. Por el contrario en las células incubadas con D-BHB, la actividad de mTORC1 se reestablece y la autofagia no se activa tardíamente. A tiempos más largos de RG (20 h), p-RAPTOR vuelve a disminuir y el D-BHB sigue manteniendo los niveles basales de fosforilación. Los niveles bajos de p-RAPTOR a este tiempo coinciden con niveles menores de lipidación de LC3-II (figura 7), sugiriendo que la autofagia ha alcanzado niveles cercanos a los basales tanto en las células incubadas en ausencia como en presencia del D-BHB. Son necesarios mas experimentos para sustentar el papel de la vía de mTORC1 en la inducción de la autofagia en este modelo. Entre ellos la determinación por western blot de los niveles de fosforilación de proteínas blanco de mTORC1, como la proteína p70^{S6K} (ribosomal protein S6 kinase-1), o el factor 4EBP1 (translation initiation factor 4E-binding protein-1), en los residuos Thr389/ Thr421/ Ser424 y Thr37/ Thr46, respectivamente (Sarkar, 2013; Bockaert & Marin, 2015); la inhibición de la AMPK con el compuesto C, para corroborar que la fosforilación de RAPTOR es dependiente de AMPK.

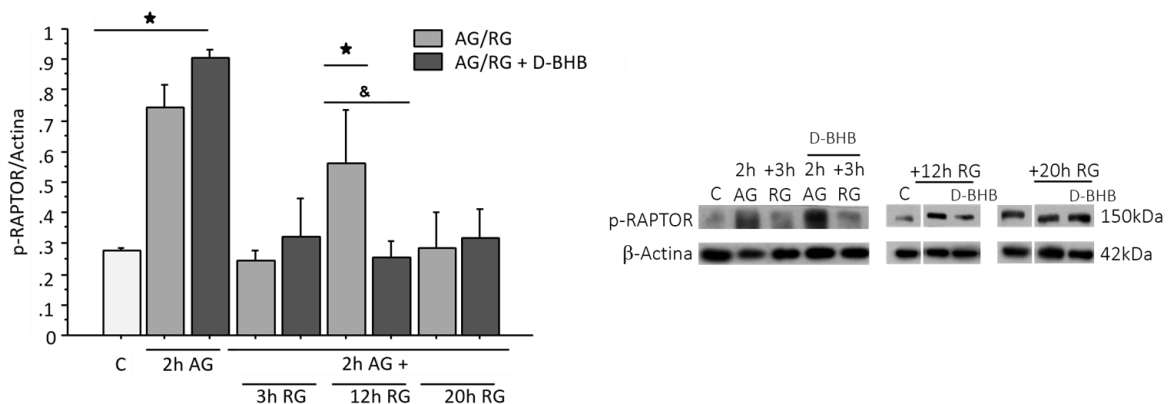


Figura 10. El D-BHB previene la fosforilación de RAPTOR (Ser 792) por la cinasa activada por AMP (AMPK) a las 12 horas de RG. Western blot representativo y gráfica con la cuantificación de los niveles de p-RAPTOR/Actina durante la etapa de AG y durante 3, 12 y 20 horas de RG en presencia o ausencia del D-BHB. (n= 3-5).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia del D-BHB (no así de AcAc) promueve la viabilidad de las neuronas expuestas a la AG y RG independientemente del momento en el que éste sea administrado, ya sea únicamente durante la AG ó la RG o durante ambas fases. Por otra parte, en presencia del D-BHB hay menor transformación de LC3-I a LC3-II y niveles menores de BECN1 y de p62/SQSTM1 tanto durante el periodo de AG como de RG. El efecto más importante se observó durante el periodo de RG, sugiriendo que los autofagosomas formados durante el periodo de AG son degradados rápidamente gracias a la estimulación del flujo autofágico en presencia del D-BHB, observado mediante la disminución de los niveles del indicador de la fase de degradación, p62/SQSTM1. Lo anterior se pudo comprobar con el uso de CQ, ya que se observó un aumento de los niveles de p62/SQSTM1 y LC3-II durante la RG y el efecto del D-BHB sobre los niveles de estas proteínas fue revertido. Por otra parte, a través de inmunocitoquímica y marcaje de autofagosomas con Cyto-ID, se comprobó que en presencia del D-BHB el número de autofagosomas disminuye. Hasta ahora, los resultados sugieren que la ausencia de glucosa promueve la acumulación de autofagosomas, posiblemente debido a una disminución en el flujo autofágico. El D-BHB estimula el flujo autofágico promoviendo la degradación autolisosomal, desahogando la acumulación de proteínas y organelos dañados, resultantes de la falla energética al no haber ATP suficiente para el plegamiento correcto de las proteínas, o glucosa suficiente para la modificación post-traducciona (glucosilación). De esta manera contribuye a mantener la viabilidad neuronal. En este sentido, sería interesante investigar si el D-BHB tiene un papel en el mantenimiento de la integridad lisosomal y que éste sea el mecanismo por el cual permite que el flujo autofágico funcione correctamente. Estudios del laboratorio sugieren que durante la AG, se pierde la integridad lisosomal debido a la activación de la calpaína (Gerónimo-Olvera, et al., 2017). Esta es una proteasa dependiente de calcio que es capaz de cortar proteínas de la membrana lisosomal e inducir la liberación de hidrolasas lisosomales al citosol contribuyendo así a la muerte celular (Yamashima et al. 1996). Además, tanto la fusión como la degradación autofágica se alteran al perderse la integridad de los lisosomas. Experimentos previos del laboratorio indican que la privación de glucosa aumenta la concentración citosólica de calcio activando a la calpaína (Páramo et al. 2010, 2013). Es posible que en presencia de D-BHB, la homeostasis del calcio intracelular se restablezca más rápidamente gracias a su contribución al metabolismo energético, inhibiendo la actividad de la calpaína y por tanto preservando la integridad lisosomal.

Además de la estimulación del flujo autofágico, el D-BHB podría estar inhibiendo la activación de la autofagia a nivel de la fase de iniciación. La enzima AMPK es una cinasa que se activa durante el estrés energético y promueve la autofagia por medio de la fosforilación del complejo ULK1 quien inicia las señales para la formación de autofagosomas (Kim, et al., 2011). Es probable que el D-BHB mejore el estado energético durante la AG y eso evite la activación de AMPK y por lo tanto la estimulación de la formación de autofagosomas por ULK1. Probablemente, lo anterior podría cooperar al mantenimiento de la viabilidad neuronal al conservar una homeostasis de la autofagia.

Nuestros datos sugieren que el efecto del D-BHB sobre la autofagia está más asociado a su papel metabólico, ya que el L-BHB no parece afectar significativamente los niveles de las proteínas asociadas a la inducción de la autofagia y maduración de autofagosomas (BECN1 y LC3-II, respectivamente). Previamente hemos reportado que el L-BHB ejerce un efecto protector, aunque más modesto que el del D-BHB, en contra de la muerte neuronal inducida por la AG/RG (Julio-Amilpas, et al., 2015). Sin embargo, de acuerdo a los resultados del presente estudio el efecto protector del L-BHB no podría explicarse por un aumento del flujo autofágico. Su efecto podría estar asociado a otros mecanismos, tales como la disminución del estrés oxidante, ya que se ha reportado que abate la producción de ROS producidas por la inhibición de la glucólisis o la AG/RG (Haces, et al., 2008; Julio-Amilpas, et al., 2015). Por otro lado, el L-BHB también tiene efectos epigenéticos, como se describió en un modelo *in vivo* de la Enfermedad de Huntington, en el que se demostró que preserva los niveles de acetilación de la histona H4, la cual se encuentra desacetilada en este modelo (Lim, et al., 2011).

Hasta ahora, los datos obtenidos sobre la fosforilación de RAPTOR muestran que durante la AG, RAPTOR está más fosforilada (disociada del complejo mTORC1 y consecuentemente inhibiéndolo). Esta observación sugiere que la inhibición de la vía de mTORC1 puede inducir la autofagia durante la fase de AG. Este resultado es esperado, dado que durante la AG disminuyen los niveles de ATP (Julio-Amilpas et al. 2015) y es congruente que la AMPK esté activa fosforilando a RAPTOR, dando lugar a un mecanismo de defensa ante el estrés energético, como la autofagia. Por otra parte observamos que en la fase de RG la fosforilación de RAPTOR regresa a los niveles basales probablemente porque el estrés energético es menor al haber glucosa nuevamente y AMPK podría disminuir su actividad. Esto sucede independientemente de la presencia del D-BHB, sugiriendo que el cuerpo cetónico no tiene efectos significativos sobre la fosforilación de RAPTOR al menos durante la AG y las primeras horas de la RG. En contraste, después de

12 h de RG, la fosforilación de RAPTOR aumenta nuevamente y la presencia de D-BHB la mantiene a niveles control. Experimentos previos del laboratorio indican que a las 12 h de RG muchas de las células están en proceso de muerte, pero aquellas que sobreviven mantienen la autofagia activa, posiblemente como una respuesta homeostática (Gerónimo-Olvera, et al., 2017). De aquí que es posible que la inactivación de mTORC1 en estas etapas tardías participe en la activación de la autofagia en las células que sobreviven. En presencia de D-BHB, un mayor número de células sobrevive y mantiene la autofagia a niveles basales sugiriendo que se encuentran en un estado energético más favorable, por lo que posiblemente la actividad de mTORC1 se encuentre a niveles del control. Es necesario realizar más experimentos para explorar si la inhibición de mTORC1 por la AMPK contribuye al mantenimiento de la autofagia durante las etapas tardías de la RG y si la actividad de mTORC1 recupera sus niveles basales en presencia de D-BHB.

Por otra parte, se ha reportado que bajo condiciones de privación de nutrientes (suero o aminoácidos) la cinasa ULK1 puede inhibir la señalización de mTORC1 a través de la fosforilación de RAPTOR en los residuos de serina 855 y 859 (Dunlop, et al., 2011). De aquí que sería interesante explorar si en las condiciones de AG/RG la activación de la autofagia podría estar mediada por ULK1 y conocer si en presencia del D-BHB la disminuye.

CONCLUSIÓN

El D-BHB es capaz de mantener la viabilidad de las neuronas corticales durante la AG y la RG por medio de la estimulación del flujo autofágico. La autofagia se activa inicialmente como una respuesta ante la privación de glucosa, posiblemente por un mecanismo dependiente de la inhibición de mTORC1, el cual no se altera por la presencia del D-BHB. Por otra parte, el D-BHB promueve que las células mantengan un estado energético más competente durante la fase de RG, lo cual evitaría la actividad de la AMPK y por tanto la inhibición de mTORC1, permitiendo que las neuronas recuperen la homeostasis manteniendo la autofagia a sus niveles basales (figura 11).

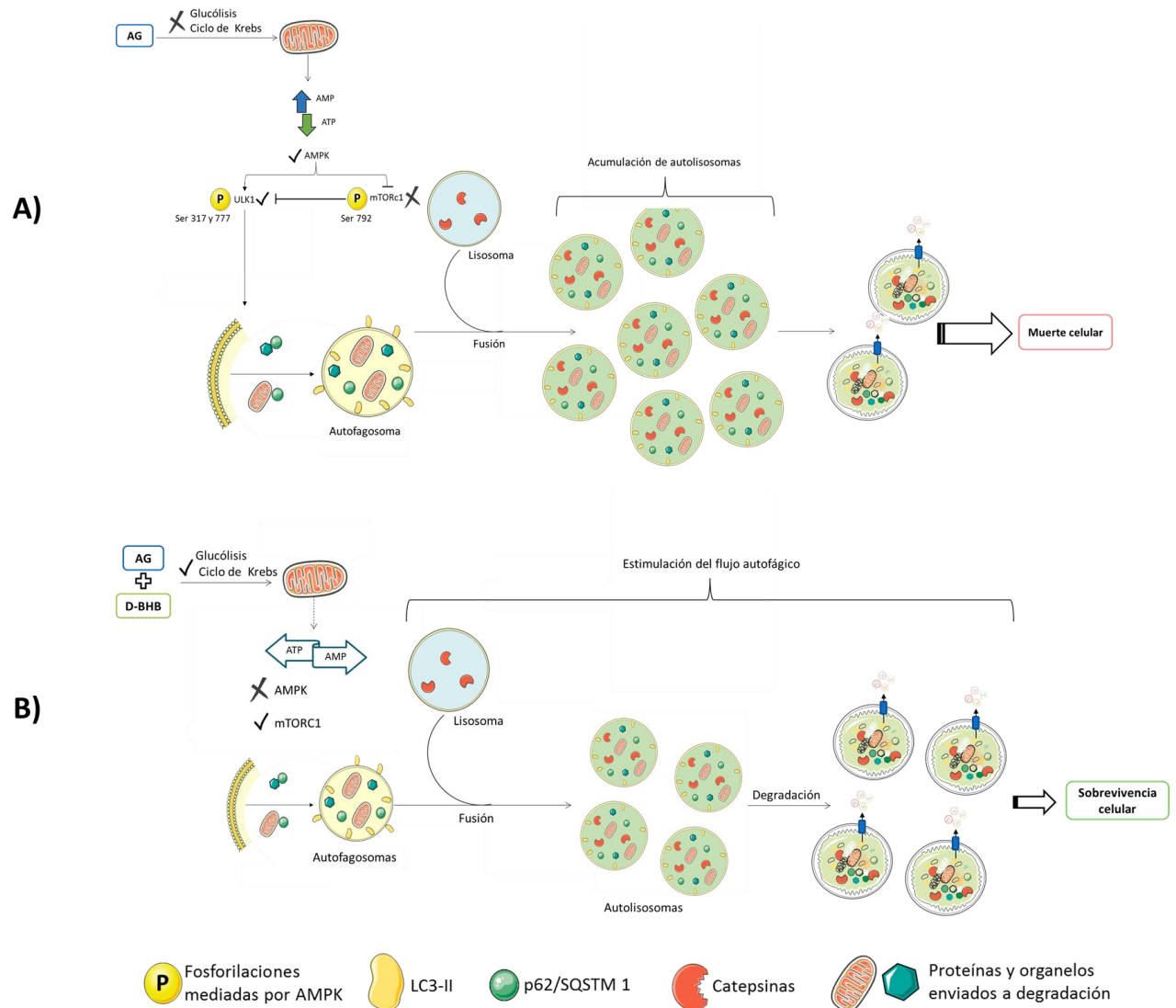


Figura 11. Conclusión. A) La AG/RG induce la muerte neuronal, lo cual se asocia a un impedimento del flujo normal del proceso de autophagia, en el que la producción de autofagosomas ó autolisosomas rebasa la fase de degradación, lo cual puede ser debido a un mal funcionamiento de dicha fase. Lo anterior puede ser mediado por la activación de la proteína AMPK, secundaria al aumento del índice AMP/ATP; AMPK inhibe al complejo mTORC1 mediante la fosforilación de la proteína Raptor en la serina 792, lo cual permite que se active el complejo ULK1 y se estimule la síntesis de autofagosomas. Cuando la AG ocurre en presencia del D-BHB (**B**), el estado energético de las neuronas se ve menos afectado, sobre todo cuando inicia la fase de RG, por lo tanto no sería necesaria la activación de la proteína AMPK, permitiendo así que el complejo mTORC1 se mantenga activo, y que el flujo autofágico conserve su actividad basal. Los recuadros punteados indican procesos hipotéticos.

PERSPECTIVAS

- Confirmar el papel de la vía de mTORC1 sobre la autofagia inducida por la AG utilizando un inhibidor de la AMPK (compuesto C) durante las fases de AG y a etapas tardías de la RG (12 h), en las que se observó una elevación importante de la fosforilación de RAPTOR por AMPK.
- Investigar el estado de activación de mTORC1 en las distintas fases de la AG y la RG a través de la fosforilación de alguno de sus sustratos (p70^{S6K}).
- Cuantificar los niveles de AMP/ADP/ATP durante los tiempos más largos de RG (6, 12 y 20 horas) después de 2 h de AG, en presencia o ausencia del D-BHB.
- Investigar el papel de ULK1 sobre la fosforilación de RAPTOR y la inducción de la autofagia durante la AG y la RG.

REFERENCIAS

- 1.- Baek, K.H., Park, J., Shin, I. (2012) Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* ,41,3245–3263.
- 2.- Barborka, C.J. (1928) Ketogenic diet treatment of epilepsy in adults. *JAMA*, 1928; 91(2):73-78.
- 3.- Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.*; 452:181-97.
- 4.- Bockaert, J., Marin, P. (2015). mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol Rev* 95: 1157–1187.
- 5.- Camacho, A., Massieu, L. (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of medical research* 37, 11-18.
- 6.- Chen, Azad, Gibson (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 16, 1040–1052.
- 7.- Chen, X., Li, M., Li, L., Xu, S., Huang, D., Ju, M., Huang, J., et al. (2016) Trehalose, sucrose, and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway. *Scientific reports* 6, Article number: 28423.
- 8.- Cotter, D.G., Ercal, B., d'Avignon, D.A., Dietzen, D.J. & Crawford, P.A. (2013) Impact of peripheral ketolytic deficiency on hepatic ketogenesis and gluconeogenesis during the transition to birth. *J. Biol. Chem.* 288, 19739–19749.
- 9.- Delgado, M.E., Dyck, L., Laussmann, M.A., Rehm, M. (2014). Modulation of apoptosis sensitivity through the interplay with autophagic and proteasomal degradation pathways. *Cell Death and Disease*. 5, e1011.
- 10.- Desrochers, S., Quiuze, K., Dugas, H., Dubreuil, P., Bomont, C., David, F., et al. (1995) R,S-1,3-butanediol acetoacetate esters, potential alternates to lipid emulsions for total parenteral nutrition. *Nutritional Biochemistry* 6: 111-118, 1995.
- 11.- Dodson, Darley-Usmar, Zhang (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: Traffic control by redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 63: 207–221.
- 12.- Dunlop, E.A., Hunt, D.K., Acosta-Jaquez, H.A., Fingar, D.C., Tee, A.R. (2011) ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite RAPTOR phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy*; 7(7): 737-47.
- 13.- Ferrand-Drake, M., Zhu, C., Gidö, G., Hansen, A., Karlsson, J., Bahr, B., Zamzami, N., Kroemer, G., Chan, P.H., Wieloch, T., Blomgren, K. (2003). Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem.* 85(6):1431-42.
- 14.- Freeman, J.M., Vining, E.P.G. (1999). Seizures decrease rapidly after fasting. Preliminary studies of the ketogenic diet. *Arch pediatr adolesc med.* 153:946-949.
- 15.- García de la Cadena, Hernández-Fonseca, Camacho-Arroyo, Massieu (2014). Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis*. 19(3):414-27.
- 16.- Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincón-Heredia, R., Castro-Obregón, S., Massieu-L. (2017) Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced

neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis.* 29:8(6):e2911.

17.- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of RAPTOR Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 30, 214–226.

18.- Haces, Hernández-Fonseca, Medina-Campos, Montiel, Pedraza-Chaverri, Massieu (2008). Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp. Neurol* 211, 85-96.

19.- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., Yoshimori, T. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 21;495 (7441):389-93.

20.- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441 (7095): 885-9.

21.- Hashim, S.A., VanItallie, T.B. (2014) Ketone body therapy: from the ketogenic diet to the oral administration of ketone ester. *J Lipid Res.* 55(9):1818-26.

22.- Hernández-Fonseca, K., Massieu, L., (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci Res.* 82, 196–205.

23.- Imamura, K., Takeshima, T., Kashiwaya, Y., Nakaso, K., Nakashima, K. (2006) D-b-Hydroxybutyrate protects dopaminergic SH-SY5Y cells in a rotenone model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2006 Nov 1; 84(6):1376-84.

24.- Izumi, Y., Benz, A.M., Katsuki, H. and Zorumsk C.F. (1997) Endogenous Monocarboxylates Sustain Hippocampal Synaptic Function and Morphological Integrity during Energy Deprivation. *The Journal of Neuroscience*, 17(24):9448–9457.

25.- Jang BG, Choi BY, Kim JH, Kim M-J, Sohn M, Suh SW. (2013) Impairment of autophagic flux promotes glucose reperfusion-induced Neuro2A cell death after glucose deprivation. *PlosOne*, 8 e76466.

26.- Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., et al. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*;68(1):99-112.

28- Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, E., Gerónimo-Olvera, C., Massieu, L. (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.

29.- Jung, C.H, Seung-Hyun, R., Jing, C., Otto, N.M., Do-Hyung Kim (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010 April 2; 584(7): 1287–1295.

30.- Kang, Zeh, Lotze, Tang (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 18, 571–580.

31.- Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K. and Veech, R.L. (2000) D-b-Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;97(10):5440-4.

32.- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal* (2015) 4672–4678.

33.- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. Guan, K.L. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13, 132-141.

- 34.- Kim, K.H., Lee, M.S. (2014) Autophagy: a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 322–337.
- 35.- Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., Mizushima, N. (2014). Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci.* vol. 127, p. 4984.
- 36.- Koike; M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh; K., Komatsu, M., Waguri, S. et al. (2008) Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic Ischemic Injury. *The American Journal of Pathology*, Vol. 172, No. 2.
- 37.- Komatsu, M., Ichimura, Y. (2010) Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS lett.* 2:584(7):1374-8.
- 38.- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I, et al., (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 15;441(7095):880-4.
- 39.- Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol Cell.* 22;40(2):280-93.
- 40.- Kroemer, G., Chan, P., Wieloch, T., Blomgren, K., (2003) Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem.* 85, 1431-1442.
- 41.-Langurén, G., Montiel, T., Julio-Amilpas, A., Massieu, L. (2013) Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int.*;63(4):331-43.
- 42.- Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes, Metabolism, Research and Reviews.* 15, 412–426.
- 43.- Laplante, M., Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science* 126, 1–7.
- 44.- Levine B., Yuan J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *Journal of Clinical Investigation.* 115:2679–2688.
- 45.- Li, M., Khambu, B., Zhang, H., Kang, J.H., et al. (2013). Suppression of Lysosome Function Induces Autophagy via a Feedback Down-regulation of MTOR Complex 1 (mTORC1) Activity. *The Journal of biological chemistry.* Vol. 288, NO. 50, pp. 35769–35780.
- 46.- Lim, S., Chesser, A.S., Grima, J.C., Rappold, P.M., Blum, D., Przedborski, S. et al. (2011) D-β-Hydroxybutyrate Is Protective in Mouse Models of Huntington's Disease. *PLoS ONE* 6(9): e24620.
- 47.- Liu, Gao, Barret, Hu (2010). Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 115, 68–78.
- 48.- Lutas, A., Yellen, G. (2013) The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy. *Trends Neurosci.* 36(1):32-40.
- 49.- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;8(9):741-52
- 50.- Malhotra JD, Kaufman R (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18:716–731.
- 51.- Mardones, P., Rubinsztein, D.C., Hetz, C. (2016) Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport. *Science signaling* (9) 416, fs2.

- 52.- Massieu, L., Haces, M.L., Montiel, T., Hernández-Fonseca, K. (2003) acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120 (2003) 365–378.
- 53.- McGarry, J.D., Foster, D.W. (1980) Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 49: 395-420.
- 54.- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel G, and Meisel A (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain Function. *Trends in Neurosciences*. 36, 10.
- 55.- Morris, A.A.M. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *J. Inherit. Metab.Dis.* 28 (2005) 109-121.
- 56.- Newman, J.C., Verdín, E. (2014). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 25, No. 1.
- 57.- Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*. Volume 19. No. 8. pp. 983-997.
- 58.- Page, K.A., Williamson, A., Yu, N., McNay, E., Dzura, J., McCrimmon, R.J., et al. (2009) Medium-Chain Fatty Acids Improve Cognitive Function in Intensively Treated Type 1 Diabetic Patients and Support In Vitro Synaptic Transmission During Acute Hypoglycemia. *Diabetes* 58:1237–1244.
- 59.- Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.A., Lamark, T., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* Vol. 188 No. 2 253–269.
- 60.- Páramo, B., Hernández-Fonseca, K., Estrada-Sánchez, A.M., Jiménez, N., Hernández-Cruz, A., Massieu, L. (2010). Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167 (2010) 1075-1069.
- 61.- Páramo, B., Montiel, T., Hernández-Espinosa, DR., Rivera-Martínez, M., Morán, J., Massieu, L. (2013). Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 45, 2596– 2604.
- 62.- Park, H.K., Chu, K., Jung, K.H., Lee, S.T., Bahn, J.J., Kim, M. et al. (2009). Autophagy is involved in the ischemic preconditioning. *Neuroscience Letters* 451, 16-19.
- 63.- Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., Tooze, S.A. (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation, *Autophagy*, 6:4, 506-522.
- 64.- Robinson, A.M., Williamson, D.H. (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 60(1):143-87.
- 65.- Rovira A. (2002). Fisiopatología de la hipoglucemia en la diabetes mellitus. *Endocrinología y Nutrición*. 49(5):140-4.
- 66.- Rubinsztein, D.C., Codogno, P., Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov*; 11(9):709-30.
- 67.- Russell, R. R., III, Cline, G. W., Guthrie, P. H., Goodwin, G. W., Shulman, G. I., and Taegtmeyer, H. (1997) *J. Clin. Investig.* 100, 2892–2899.
- 68.- Russell, R.C., Yuan, H.X., Guan, K.L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Research* 24:42-57.

- 69.- Ruskin, D.N., Ross, J.L., Kawamura Jr, M., Ruiz, T.L. et al (2011). A ketogenic diet delays weight loss and does not impair working memory or motor function in the R6/2 1J mouse model of Huntington's disease. *Physiology & Behavior* 103. 501–507
- 70.- Sandberg M; Nystrom B; Hamberger A. (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *In vivo* dialysis of the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*. 47: 178-184.
- 71.- Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1103–1130.
- 72.- Sengupta, S., Peterson, T.R., Sabatini, D.M. (2010) Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol Cell*. 2010 Oct 22; 40(2):310-22.
- 73.- Shi, R., Weng, J., Zhao, L., Li, X.M. et al. (2012) Excessive Autophagy Contributes to Neuron Death in Cerebral Ischemia. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18 (2012) 250–260.
- 74.- Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., et al. (2013) Suppression of oxidative stress by b-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211.
- 75.- Shimobayashi, M., Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(3):155-62.
- 76.- Shibutani, S.T., Yoshimori, T. (2014) A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Research*. 24:58–68.
- 77.- Sokoloff. (1973). Metabolism of Ketone Bodies by the Brain. *Annual Review of Medicine*. Vol. 24: 271-280.
- 78.- Suh, S.W., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., Liu, J., Swanson, R.A. (2003) Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by Poly (ADP Ribose) Polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 23:10681–10690
- 79.- Suh, Aoyama, Matsumori, Liu, Swanson (2005). Pyruvate Administered After Severe Hypoglycemia Reduces Neuronal Death and Cognitive Impairment. *Diabetes*, Vol. 54: 1452–1458.
- 80.- Suh, S.W., Gum, E.T., Hamby, A.M., Chan, P.H., Swanson, R.A. (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117:910–918.
- 81.- Sutherland, G.R., Tyson, L.R., Auer, R.N. (2008) Truncation of the Krebs cycle during hypoglycemic coma. *Medicinal chemistry*, 4, 379-385.
- 82.- Suzuki, M., Suzuki, M., Kitamura, Y., Mori, S., Sato, K., et al. (2002). 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.
- 83.- Swanson, Suh (2010). Hypoglycemic Neuronal Death. *Acute Neuronal Injury*. p211-228.
- 84.-Tanida, I. (2011). Autophagy basics. *Microbiol Immunol*; 55: 1–11.
- 85.- Tieu,K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D.C., Yan, S.D. et al. (2003) *J. Clin. Invest.* 112:892–901.
- 86.- Vandenberg, R.J., Ryan, R.M. (2013) Mechanisms of glutamate transport. *Physiological reviews*. Vol. 39. No. 4, 1621-1657.

- 87.- Wheless JW. (2004) History and origin of the ketogenic diet. In Stafstrom, C.E., Rho, J.M. (eds). *Epilepsy and the ketogenic diet*. Humana Press, Inc., Totowa, NJ, pp. 31–50.
- 88.- Wheless, J.W. (2008) History of the ketogenic diet. *Epilepsia*, 49 (Suppl. 8):3–5.
- 89.- Wirawan, E., Lippens, S., Berghe, T.V., Romagnoli, A., Fimia, G.M., Piacentini, M., Vandenabeele, P. (2012) Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy* 8:1, 6-17.
- 90.- Xie, G., Tian, W., Wei, T., Liu, F. (2015) The neuroprotective effects of β -hydroxybutyrate on A β -injected rat hippocampus in vivo and in A β -treated PC-12 cells in vitro. *Free Radical Research*, 49:2, 139-150.
- 91.- Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., et al. (2016) Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Mol Cell*. 62(2):194-206.
- 92.- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T. et al (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8:1124–1132
- 93.- Yamada, K.A., Rensing, N., Thio, L.L. (2005) Ketogenic diet reduces hypoglycemia-induced neuronal death in young rats. *Neurosci Lett*. 16; 385(3):210-4.
- 94.- Yamashima, T., Saido, T.C., Takita, M., Miyazawa, A., Yamano, J., Miyakawa, A., et al. (1996) Transient brain ischemia provokes Ca²⁺, PIP₂ and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *European journal of neuroscience*, vol 8, pp. 1932-1944.
- 95.- Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 2010, 22:124–131.
- 96.- Yellen, G. (2008) Ketone bodies, glycolysis, and K_{ATP} channels in the mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsia*; 49 (Suppl 8): 80–82.
- 97.- Youm, Y.H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., et al. (2015) The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med*; 21(3):263-9.

ANEXO 1 – Artículo publicado

Referencia: Camberos-Luna, L., Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincón-Heredia, R., Massieu, L. (2015) The Ketone Body, β -Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons. *Neurochem Res.*; 41(3):600-9.

The Ketone Body, β -Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons

Lucy Camberos-Luna¹ · Cristian Gerónimo-Olvera¹ · Teresa Montiel¹ · Ruth Rincon-Heredia¹ · Lourdes Massieu¹

Received: 30 March 2015 / Revised: 11 August 2015 / Accepted: 13 August 2015 / Published online: 25 August 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Glucose is the major energy substrate in brain, however, during ketogenesis induced by starvation or prolonged hypoglycemia, the ketone bodies (KB), acetoacetate and β -hydroxybutyrate (BHB) can substitute for glucose. KB improve neuronal survival in diverse injury models, but the mechanisms by which KB prevent neuronal damage are still not well understood. In the present study we have investigated whether protection by the D isomer of BHB (D-BHB) against neuronal death induced by glucose deprivation (GD), is related to autophagy. Autophagy is a lysosomal-dependent degradation process activated during nutritional stress, which leads to the digestion of damaged proteins and organelles providing energy for cell survival. Results show that autophagy is activated in cortical cultured neurons during GD, as indicated by the increase in the levels of the lipidated form of the microtubule associated protein light chain 3 (LC3-II), and the number of autophagic vesicles. At early phases of glucose reintroduction (GR), the levels of p62 declined suggesting that the degradation of the autophagolysosomal content takes place at this time. In cultures exposed to GD and GR in the presence of D-BHB, the levels of LC3-II and p62 rapidly declined and remained low during GR, suggesting that the

KB stimulates the autophagic flux preventing autophagosome accumulation and improving neuronal survival.

Keywords Autophagy · Cortical cultures · Hypoglycemia · Ketone bodies · Neuronal death

Abbreviations

GD	Glucose deprivation
GR	Glucose reperfusion
LC3	Microtubule associated protein light chain 3
LC3-II	Lipidated form of the microtubule associated protein light chain 3
BHB	β -Hydroxybutyrate
D-BHB	D isomer of β -hydroxybutyrate
3-MA	3-Methyl adenine
KB	Ketone bodies

Introduction

Correct brain functioning depends on the continuous supply of glucose from blood. Disruption of blood flow during an ischemic episode or a decrease in blood glucose concentration during severe hypoglycemia, leads to brain injury. Other energy sources such as the ketone bodies (KB) acetoacetate and β -hydroxybutyrate (BHB) can be used by brain as alternative substrates to glucose in certain conditions. KB are breakdown products of fatty acid metabolism in the liver, and normally during adulthood their concentration in blood is low (0.1 mM) [1]. However, during the suckling period, KB concentration in blood increases due to the high fat content in maternal milk, representing the major fuel for the immature brain [2, 3]. Nevertheless, the adult brain is capable to transport and

Special Issue: In Honor of Philip Beart.

Lucy Camberos-Luna and Cristian Gerónimo-Olvera have equally contributed to this work.

✉ Lourdes Massieu
lmassieu@ifc.unam.mx

¹ División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 70-253, CP 04510 Mexico, DF, Mexico

oxidize KB whenever their concentration rises due to ketogenesis, during starvation, prolonged hypoglycemia [4] or when KB are supplied by the ketogenic diet or an exogenous infusion [5, 6].

Protection of neuronal death by KB has been demonstrated in several pathological conditions associated with energy depletion, including hypoxia [7] ischemia [8–10] excitotoxicity [11, 12] and severe hypoglycemia [13, 14]. We have recently reported that the D-isomer of BHB (D-BHB) prevents the decline in ATP levels induced by glucose deprivation (GD), improves ATP recovery during glucose reperfusion (GR) and reduces neuronal death in cortical neurons, suggesting it can be used as an energy substrate [15]. In addition, a significant reduction in the number of degenerating neurons is observed in the cerebral cortex of severe hypoglycemic animals rescued with glucose and D-BHB [15]. The mechanism underlying the protective effect of KB is not completely understood, but it has been mainly attributed to the improvement of mitochondrial metabolism as KB incorporate to the tricarboxylic acid cycle [15–17].

To further investigate the actions of KB, in the present study we have explored whether autophagy is involved in the protective effect of D-BHB against GD-induced neuronal damage in cortical cultured neurons. Macroautophagy (here named as autophagy) is an intracellular catabolic process dependent on lysosome hydrolytic activity responsible for the recycling and digestion of damaged or altered proteins and organelles [18, 19]. Autophagy is a highly conserved process occurring in physiological conditions and stimulated under different types of stress including nutritional stress, as a mechanism to provide energy and sustain cell survival [20–22]. However, excessive autophagic digestion can lead to cell death [23, 24]. Autophagy is initiated by the formation of a multiprotein complex containing Beclin 1 and class III PI3K, which are essential for the formation of double membrane vesicles or autophagosomes. During autophagosome formation, the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-I), is conjugated with phosphatidylethanolamine to form LC3-II, which translocates from the cytosol to double membrane vesicles, where damaged proteins and cellular components are engulfed and degraded by lysosomal hydrolytic enzymes in autophagolysosomes, formed by the fusion of autophagosomes with lysosomes [25]. The processes of autophagosome formation and the subsequent degradation of its content in the autophagolysosome, is referred as the autophagic flux. Impairment of the autophagic flux leads to the excessive accumulation of autophagosomes, which can result in neuronal cell death [26, 27].

The activation of autophagy under different conditions of cellular stress is well known in the nervous system, and its role in either neuronal survival [28–30] or neuronal

death [31, 32] has been suggested. The role of autophagy in hypoglycemia- and GD-induced neuronal damage has not been well characterized, but a recent study suggests that the disruption of the autophagic flux during glucose reperfusion is involved in the death of neurons exposed to glucose starvation [33].

In the present study we have investigated the effect of D-BHB on autophagy induced by GD in cultured neurons. We have evaluated the changes in the levels of three key autophagic proteins: Beclin 1, a protein that interacts with class III PI3K and is part of the complex necessary for the initiation of autophagosome formation [34], the transformation of LC3-I to LC3-II, which is essential for the formation of double membrane vesicles [25]; and SQSTM1/p62, a protein that interacts with LC3, recruits ubiquitinated proteins to the autophagosome and is finally degraded into the autophagolysosome [35]. Results show a rapid conversion of LC3-I to LC3-II and autophagosome formation during glucose withdrawal, followed by the degradation of autophagosome content when glucose is replenished. In the presence of D-BHB the transformation of LC3-I to LC3-II and the formation of autophagosomes decreases significantly and the rate of degradation of p62 occurs more rapidly, suggesting that D-BHB stimulates the autophagic flux preventing the accumulation of autophagosomes.

Materials and Methods

Materials

Neurobasal medium, B27, gentamicin and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) were obtained from Gibco life technologies (Grand Island, USA); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, L-Glutamine, poly-L-lysine, NADH, pyruvate, Hoechst, 3-Methyl adenine (3-MA) and chloroquine (CQ) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); D-BHB was from Fluka (Sigma-Aldrich). Calcein-AM/ethidium homodimer (live/death kit, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA); protease inhibitor cocktail (Roche complete, 11626200, Indianapolis, IN, USA); anti-LC3 antibody (MBL international, PD014); anti-Beclin 1 antibody (Sigma-Aldrich, PRS3613); anti-SQSTM1/p62 antibody (Cell signaling technology, 51146); anti-actin antibody (Chemicon, Merck, Millipore, MAB1501); goat anti-mouse (Jackson Immunoresearch Laboratories, 115035-062); goat anti-rabbit (Jackson Immunoresearch Laboratories, 115035-003) and goat anti-rabbit (Zymed, 62-6111) secondary antibodies; Chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corporation, P90720); Fluoromount-GTM (Electron Microscopy Sciences 17984); Cyto-ID (autophagy detection kit, Enzo Life Sciences, 51031-K200).

Cell Culturing

Cortical primary cultures were prepared from Wistar rat embryos of 17–18 days of gestation obtained from the animal house of the Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM) as previously described [15]. Animals were handled following the rules of the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996) with the approval of the Animal Care committee (CICUAL) of the Instituto de Fisiología Celular. Briefly, cells were suspended in Neurobasal medium supplemented with 1 % B27 + 1 % B27 Minus AO, 0.5 mM L-glutamine and 20 µg/ml gentamicin. Cells were plated at a density of $2.2 \times 10^5/\text{cm}^2$ in 12-well plates precoated with poly-L-lysine (5 µg/ml). Cells were cultured for 8 days in vitro (DIV) at 37 °C in a humidified 5 % CO₂/95 % air atmosphere. At 4 DIV, cytosine arabinoside (0.8 µM) and 400 µl of fresh Neurobasal medium (containing 2 % B27 Minus AO) was added.

Cell Treatment

At 8 DIV Neurobasal medium was withdrawn and cells were exposed to glucose free (GD) medium (DMEM) for 1 and 2 h in the presence or the absence of 10 mM D-BHB. Afterwards, GD medium was changed for the Neurobasal glucose-containing medium previously withdrawn (GR) containing or not 5 mM D-BHB. We have previously determined that at these doses and following this protocol of administration, D-BHB efficiently prevents GD-induced neuronal death [15]. Cultures were also treated with the class-III PI3K inhibitor 3-MA (10 mM) or chloroquine (CQ) (20 µM), to inhibit autophagosome formation and the autophagic flux, respectively. Trehalose (150 mM) was used as an autophagy inducer and it was incubated during 4 h in Neurobasal medium.

Cell Survival

Cell survival was monitored 22 h after glucose reintroduction by the determination of lactic acid dehydrogenase (LDH) activity present in the medium, MTT reduction and the calcein-AM/ethidium homodimer method (live/death kit) as previously described [15]. After 22 h of GR cells were incubated with MTT (150 µM) for 1 h at 37 °C in 5 % CO₂/95 % air atmosphere; the medium was withdrawn and acidic isopropanol was added to solubilize the precipitated formazan salts. Formazan absorbance was measured spectrophotometrically at 570 nm. Cell viability is expressed as percentage of MTT reduction relative to control. LDH activity was determined in the culture medium by measuring the decrease in the optical density resulting from the

oxidation of NADH at 340 nm adding pyruvate as a substrate. Culture medium was collected and added to potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.5) with NADH (9.4 mM). Pyruvate (20 mM) was added to the mixture, and the change in optical density was monitored after 5 min in a spectrophotometer. Data are expressed as percent LDH activity relative to control. LDH activity in control cultures not exposed to GD was normalized to 100 %. To corroborate cell survival the fluorescent markers for live and dead cells, calcein-AM and ethidium homodimer, respectively, were used. These markers (calcein 2 µM and ethidium homodimer 1 µM) were added to culture wells 22 h after GR during 30 min, cells were washed with Lockey medium and images were obtained using confocal microscopy (FV 1000; Olympus) motorized FV10ASW 2.1, with Ar 488 laser (for FITC) and Ar 596 nm (for ethidium) and images from the different treatments were captured.

Immunoblotting

Cells cultured in 35 mm dishes were exposed to GD for 1 or 2 h or 2 h of GD + 3, 6 and 20 h of GR. After the different treatments cells were washed in ice-cold PBS 0.1 M and lysed with a buffer containing: Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, sodium deoxycholate 0.5 % and SDS 1 % and 2 mg/ml of protease inhibitor cocktail, and were centrifuged at 10 000 rpm at 4 °C for 5 min. Protein concentration was determined by the Lowry method and 30 µg was separated in 10 % (Beclin 1 and p62) or 20 % (LC3) SDS-PAGE and subsequently transferred to PVDF membranes. Membranes were immunoblotted with specific antibodies against the different autophagic markers: LC3 antibody that recognizes both LC3-I and LC3-II (1:1000), Beclin 1 (1:1000) and SQSTM1/p62 (1:500). Stripped blots were incubated with antibody against actin (1:7000) used as a loading control. The reactions of primary antibodies were detected using the respective horseradish peroxidase, goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody and immunoreactivity was detected by chemiluminescent HRP substrate.

Immunocytochemistry

Cells were cultured on cover slips and exposed to 2 h of GD and to 2 h of GD + 3 h of GR. They were washed with ice-cold PBS 0.1 M and fixed with methanol for 20 min on ice. They were blocked with PBS-albumin 5 %, horse serum 5 %, Triton X-100 0.1 % for 1 h at room temperature. Primary antibody anti-LC3 (1:500) was incubated overnight at 4 °C and detected using FITC-coupled secondary anti-rabbit antibody (1:500) incubated at room temperature for 2 h. Cells nuclei were stained with Hoechst 0.001 % in PBS immediately after immunostaining and cells covered with

Fluoromount-GTM. Images were obtained by confocal microscopy (Leica TCS SP5) using a 63X objective with UV-405 nm laser for Hoechst and Arg-488 nm for LC3 immunoreactivity.

Live Imaging of Autophagosome Formation

Cyto-ID Autophagy detection kit was used to label autophagosomes in living cells [43]. Cells cultured in 35 mm dishes were exposed for 30, 60 and 90 min to GD. Before the onset of GD, Cyto-ID was incubated for 20 min in culture medium. Neurobasal medium was washed using a reperfusion chamber and progressively substituted with DMEM free-glucose medium. Confocal images (Leica TCS SP5 using 63X water immersion objective with UV-405 nm laser for Hoechst and Arg-488 nm for Cyto-ID) were taken at the onset of GD and at different times after GD. Hoechst was used as a nuclear counterstain. The number of Cyto-ID-positive vesicles was counted in the different experimental conditions from confocal images taken from 3 independent experiments using the Fiji image analysis software (Image J) [36]. We used the maximum projection and resorted parameters at the “analyze particles” plugin and an area of 0.3–1.5 μm^2 and a circularity from 0.2 to 1.0 were fixed as parameters for the identification of positive particles. The average size of the particles was 0.52 μm^2 .

Statistics

All data are expressed as Mean \pm SEM and were analyzed by One-way ANOVA followed by a Fisher's post hoc multiple comparison test.

Results

The effect of D-BHB on neuronal death induced after 2 h GD and 22 h GR is shown in Fig. 1. LDH activity in the medium of cultures exposed to GD/GR increased by 100 % relative to non-treated cultures, while a 60 % increase in LDH activity was observed in the medium of cells exposed to GD/GR in the presence of D-BHB (10 and 5 mM, respectively) (Fig. 1a). Similarly, MTT reduction decreased to 40 % of control values in cultures exposed to GD/GR in the absence of D-BHB, while treatment with the KB restored MTT reduction to 70 % of the control (Fig. 1b). These results are in agreement with our previous observations showing efficient protection against GD-induced neuronal death by D-BHB [15]. The effect of the KB on neuronal viability was corroborated by the fluorescent markers, calcein-AM (green) and ethidium homodimer (red), for live and dead neurons, respectively. As observed in

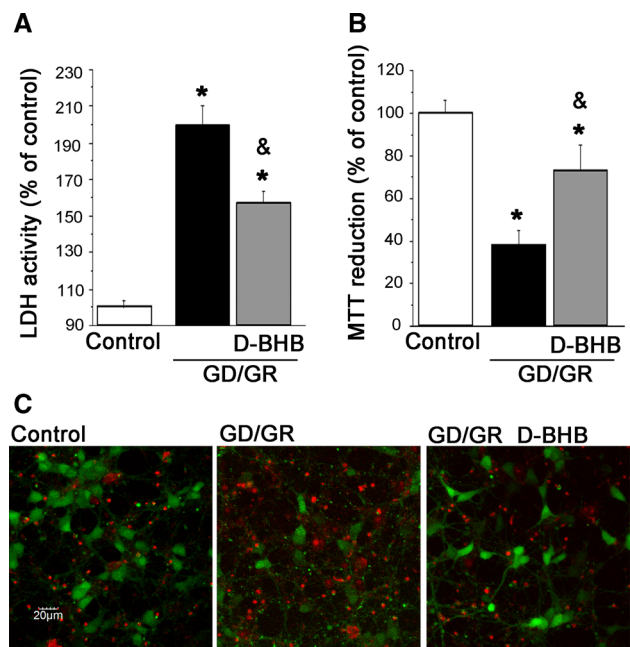


Fig. 1 Protective effect of D-BHB against GD-induced neuronal death in cortical cultures. Cultures were exposed to 2 h of GD and 22 h of GR in the presence of D-BHB (10 and 5 mM, respectively) and cell survival was assessed by LDH activity (a) and MTT reduction (b). Bars represent mean \pm SEM (n = 6). Data were analyzed by One-way ANOVA followed a Fisher's post hoc test $^*p < 0.005$ versus control and $^{\&}p < 0.005$ versus GD. Representative images from cells stained with calcein (green) and ethidium homodimer (red) to monitor live and dead cells, respectively after the different treatments, are shown in c

Fig. 1c, many green cells with a normal morphology are present in the control condition. In cells exposed to 2 h GD and 22 h GR the number of green cells is substantially reduced while numerous red cells appear. In contrast, cultures treated with D-BHB show more green and well-preserved cells and few red cells as compared to cultures not treated with D-BHB, demonstrating the improvement of cell survival by D-BHB. Neuronal viability was monitored at different times after GR. No significant increase in the number of cells positive to ethidium homodimer was observed before 8 h of GR and this number increased from 8 to 16 h (data not shown). Only a small elevation in the number of death cells occurred from 16 to 22 h, suggesting that most of the cells die between 8 and 16 h.

We then aimed to evaluate the changes in the levels of Beclin 1 and SQSTM1/p62, and in the LC3-II/LC3-I ratio. Figure 2a shows a significant decrease in Beclin 1 levels relative to control 3 h after GR, while no significant change was observed during GD. The autophagy inducer trehalose showed no effect on Beclin 1 levels after 4 h incubation, as shown in the representative immunoblot (Fig. 2a). In cultures treated with D-BHB, Beclin 1 content significantly decreased during 1 and 2 h of GD and at 3 h after GR Beclin

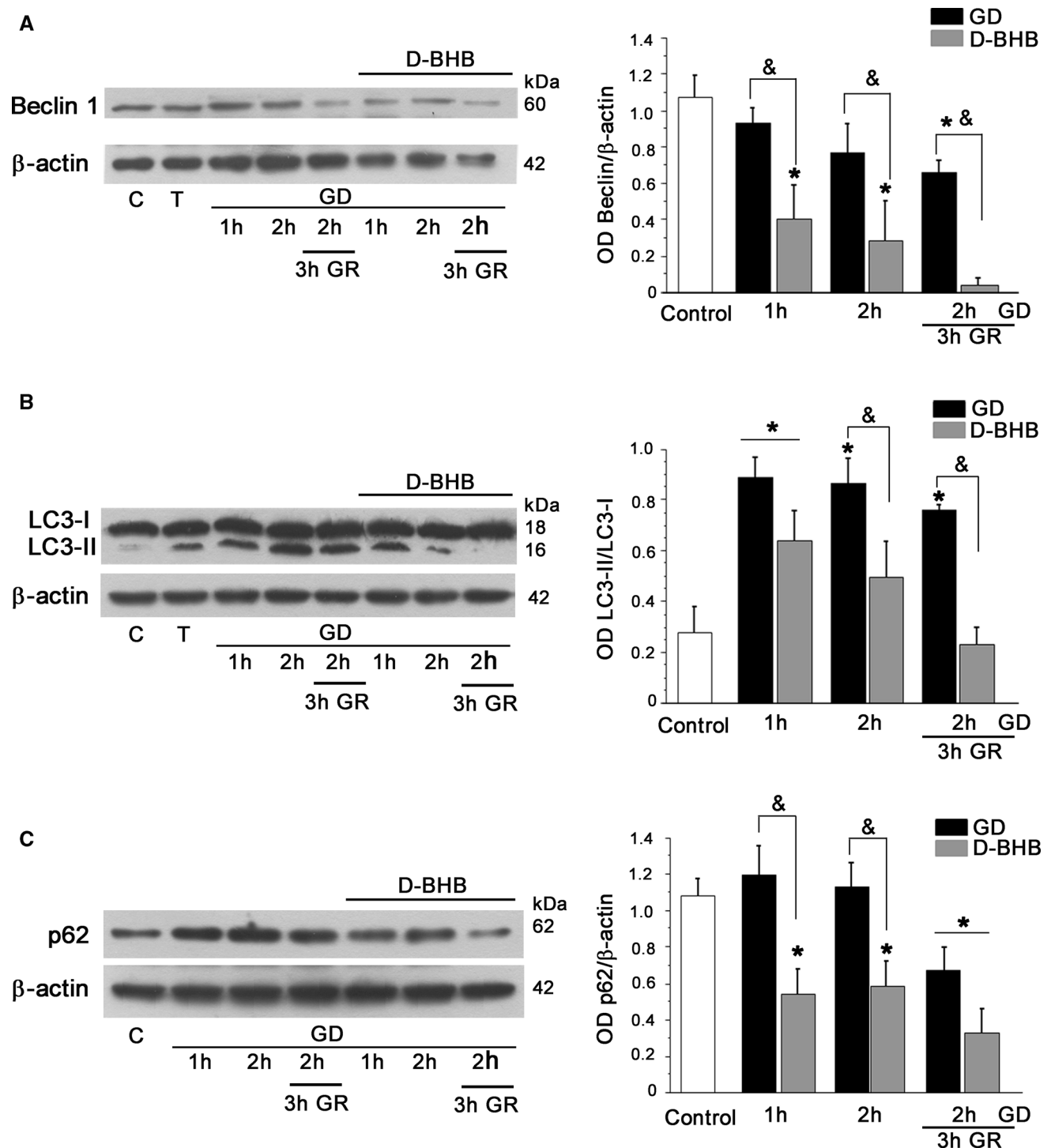


Fig. 2 Changes in Beclin 1, LC3-II/LC3-I ratio and p62 in cultures exposed to GD/GR in the presence or the absence of D-BHB. Representative western-blot and quantification of the changes in Beclin 1/actin levels (a), LC3-II/LC3-I ratio (b) and p62/actin levels

(c) are shown. Bars represent mean \pm SEM (n = 3–6). Data were analyzed by One-way ANOVA followed by a Fisher's post hoc test * $p < 0.05$ versus control and & $p < 0.05$ versus D-BHB. OD optical density

1 levels were very low. The transformation of LC3-I to LC3-II increases substantially when glucose is withdrawn and remains elevated at 3 h after glucose replenishment,

suggesting an increase in autophagosome formation (Fig. 2b). The levels of LC3-II also increased in cultures exposed to trehalose during 4 h consistent with its action as

an autophagy inducer (Fig. 2b). When D-BHB is added to the culture media during GD, the transformation of LC3-I to LC3-II significantly increases after 1 h of GD relative to control cultures but decreases at 2 h GD and 3 h after GR LC3-II content reaches control values (Fig. 2b).

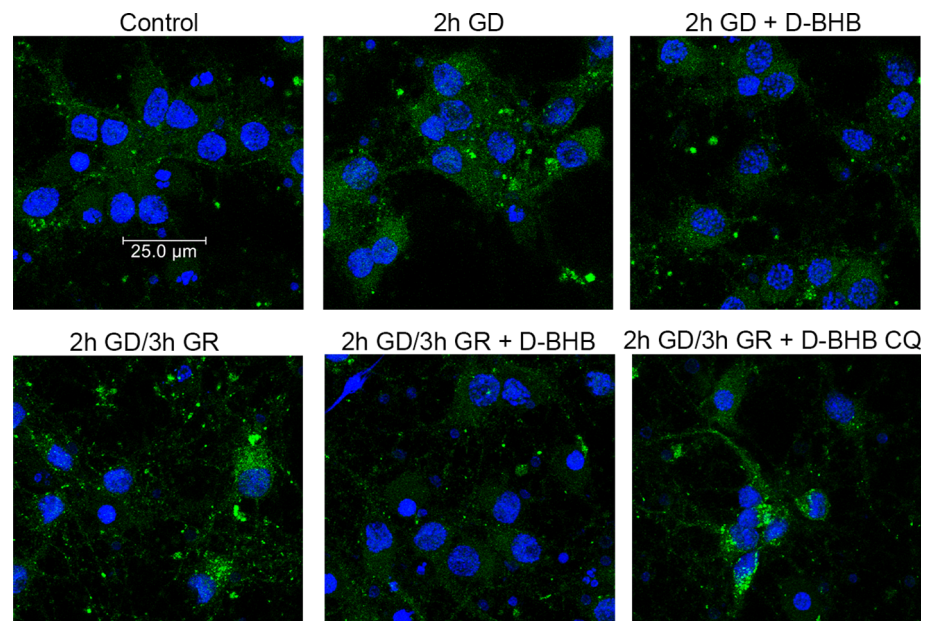
To monitor autophagic degradation, the levels of p62, a protein hydrolyzed within the autophagolysosome, were measured. As can be observed in Fig. 2c, p62 levels did not change during 1 and 2 h of GD whereas they decreased significantly 3 h after glucose replenishment suggesting it is degraded at this time. When cultures were treated with D-BHB, p62 levels significantly diminished below control levels after 1 and 2 h of GD and remained low at 3 h GR (Fig. 2c).

To corroborate that the transformation of LC3-I to LC3-II corresponds to the formation of autophagosomes, we performed immunocytochemistry using an antibody that recognizes both LC3-I and LC3-II, after the exposure of cortical cultures to 2 h GD and to 2 h GD followed by 3 h GR. As observed in Fig. 3, LC3 immunoreactivity increases 2 h after GD as compared to control and at 3 h after GR, LC3 puncta are visible in many cells. In contrast, in D-BHB-treated cultures immunoreactivity is more diffuse and basically no cells containing LC3 puncta are observed after GR. To confirm these data we followed autophagosome formation by time-lapse live confocal microscopy using the fluorescent marker Cyto-ID, which labels autophagic vesicles [37]. As observed in Fig. 4 (upper panel), 30 min after GD the number of Cyto-ID-positive green vesicles increased in many cells as compared to the control condition (time 0), and were still present after 60 min. After 90 min GD the number of autophagosomes

diminished in many cells although in some others Cyto-ID-positive vesicles remained. These observations were confirmed by the quantification of Cyto-ID-positive vesicles, as shown in Fig. 4b, and suggest that the formation of autophagic vesicles increases when glucose is withdrawn and progressively decreases during the last phases of GD. In cells exposed to GD in the presence of D-BHB, the number of Cyto-ID-positive vesicles increases at 30 min, but decreased substantially at 60 and 90 min of GD remaining only few cells containing green particles (Fig. 4a). These observations were confirmed by the quantification of the number of Cyto-ID-positive-puncta (Fig. 4b). Overall, these results suggest that a lower number of autophagosomes is accumulated in the presence of D-BHB, possibly due to the stimulation of the autophagic flux.

To investigate the time-course of the changes in autophagy proteins and its correlation to neuronal death, we monitored LC3-II and p62 levels at longer times after GR, in the presence or the absence of D-BHB. As indicated in Fig. 5a, the increased transformation of LC3-I to LC3-II is sustained at 6 and 20 h after GR, while in cells treated with D-BHB, LC3-II levels remain below those of non-treated cells. These observations suggest that the KB stimulates the rate of autophagosome degradation. To test this hypothesis we used CQ to inhibit lysosome acidification and thus the autophagic flux. As observed (Fig. 5a) LC3-II levels significantly increased when CQ was added to cultures non-treated with D-BHB, and the effect of D-BHB was completely abated by CQ. This result is consistent with immunocytochemistry observations showing that more cells containing LC3 puncta were evident when

Fig. 3 Anti-LC3 immunocytochemistry (green) and Hoechst nuclear counterstain (blue) in cultures exposed to 2 h GD or 2 h GD/3 h GR in the presence or the absence of D-BHB, and 2 h GD/3 h GR + D-BHB + CQ



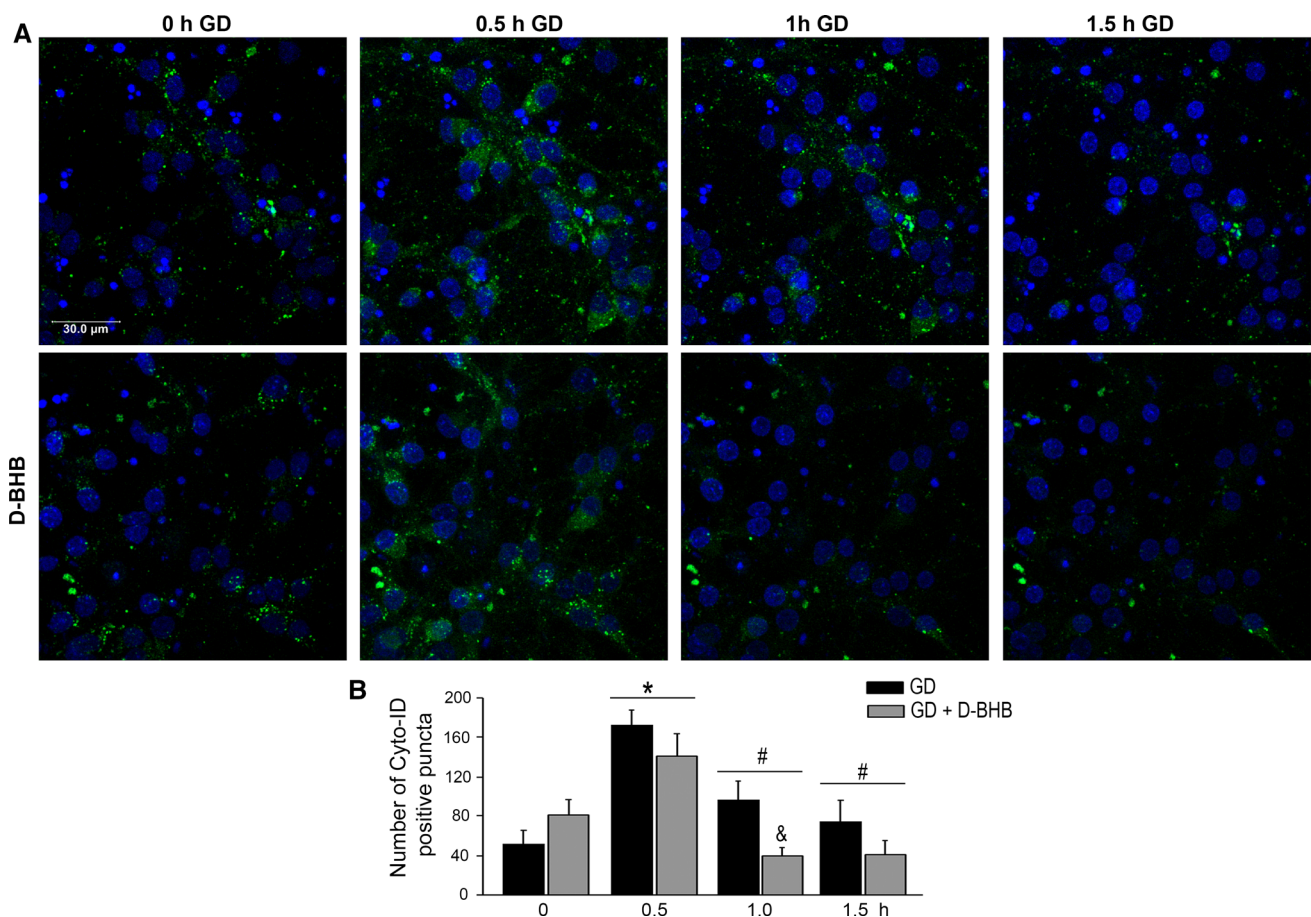


Fig. 4 Time-lapse of in vivo autophagosome formation in cortical cultures exposed to GD in the presence or the absence of D-BHB. Representative images showing autophagosome formation using the Cyto-ID detection kit (green) and Hoechst counterstaining (blue), during GD (from 0.5 to 1.5 h). The graph below shows the number of

Cyto-ID puncta in cells exposed to GD in the presence or the absence of D-BHB. * $p < 0.05$ versus GD (time 0), # $p < 0.05$ versus GD (0.5 h with or without D-BHB, respectively), & $p < 0.05$ versus GD (0.5 h without D-BHB)

CQ was added to D-BHB-treated cultures (Fig. 3). These observations support the hypothesis that the autophagic flux is accelerated in the presence of D-BHB. To further confirm these findings the changes in p62 content were also analyzed at longer times after GR in the presence or absence of D-BHB with and without CQ. As observed in Fig. 5b, p62 levels returned to control values at 6 and 20 h after GR. In the presence of D-BHB, p62 also increased after 6 and 20 h relative to the levels observed at 3 h, but remained below control values (Fig. 5b). When cells were exposed to D-BHB in the presence of CQ, p62 levels increased in agreement with the hypothesis that D-BHB stimulates the autophagic flux. Overall, the above-described results suggests that the accumulation of autophagosomes along the GR period precedes neuronal death and that protection by D-BHB is related to an accelerated rate of autophagic degradation.

Finally, we tested the effect of the autophagy inhibitor, 3-MA, which blocks the activity of class III PI3K, on

neuronal viability. As shown in Fig. 6a, 3-MA significantly improved cell survival as LDH activity in the medium was significantly reduced in cells exposed to GD in the presence of 3-MA. Similarly, MTT reduction was restored to 72 % of control values as compared to cells not treated with 3-MA, which showed a 60 % decrease in MTT reduction relative to controls (Fig. 6b). The effect of 3-MA on autophagosome formation was corroborated by LC3-II immunoblotting. As shown in Fig. 6c, the transformation of LC3-I to LC3-II decreased substantially in cultures treated with 3-MA, suggesting that inhibition of autophagy prevents neuronal death induced by glucose starvation.

Discussion

It is well-known that autophagy is up-regulated after the ischemic episode and its role in ischemic injury has been suggested [38, 39], either due to the excessive degradation

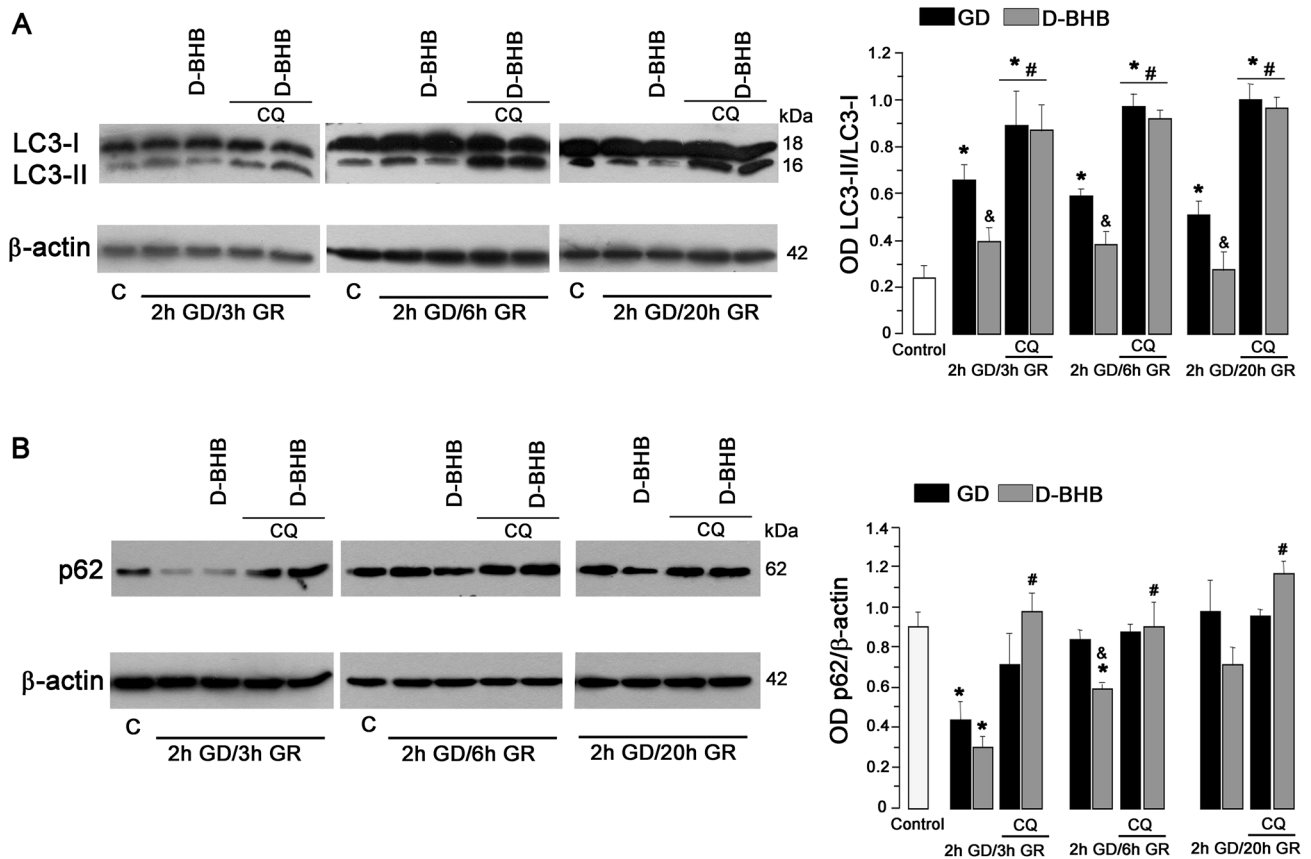


Fig. 5 Effect of Chloroquine (CQ) on LC3-II/LC3-I and p62 levels in cultures exposed to 2 GD and 3, 6 and 20 h GR in the presence or the absence of D-BHB. Representative western-blot and quantification of LC3-II/LC3-I and p62 levels are shown. Bars represent

mean ± SEM (n = 3–6). Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Fisher’s post hoc test **p* < 0.05 versus control, &*p* < 0.05 versus GD without D-BHB, #*p* < 0.05 versus cells exposed to GD/GR without CQ

of cellular components [31], or to impaired autophagy leading to the accumulation of damaged proteins and organelles within autophagosomes [27, 28, 40]. The role of autophagy in GD- or low glucose-induced neuronal damage has been poorly explored, but recent in vitro studies suggest that the impairment of autophagy during these conditions contributes to neuronal death [41, 33]. The present results show that cultures exposed to glucose starvation activate autophagy, possibly as a response to nutritional stress and a mechanism to gain energy for cell survival. However, blockade of class III PI3K activity reduce neuronal death, suggesting a contribution of autophagy to neuronal damage in the present conditions.

We and others have shown that KB preserve the energy status of neurons, sustain synaptic activity and prevent cell death in different in vitro models of energy depletion [14, 15, 42]. Furthermore, KB prevent neuronal damage induced by ischemia and hypoglycemia in vivo [8, 9, 13–15]. We now show that D-BHB stimulates the autophagic flux and that this effect is involved in its protective action. According to the results, the levels of LC3-II and p62 rapidly decline at 3 h after GR, suggesting that the fusion

of autophagosomes with lysosomes and the autophagic degradation take place soon after GR. This hypothesis is further supported by the results showing that the decline in these proteins is abated by CQ, which is commonly used to block the autophagic flux [43]. At later times after GR (6 and 20 h) the levels of LC3-II remained elevated and p62 returned to control values. In contrast, when GD occurs in the presence of D-BHB, LC3-II and p62 levels decrease to control values or below during GD and remain low during the entire GR period. The effect of D-BHB is completely abated by CQ suggesting that the autophagic flux is reestablished in the presence of the KB.

These present observations lead us to conclude that D-BHB stimulates the autophagic flux under energy-deficient conditions, possibly because the ATP levels of the cells are better preserved, preventing the overload of autophagosomes and improving neuronal survival. These results add new knowledge about the actions of KB and the mechanisms by which they can prevent neuronal death induced by energy failure. To our knowledge, this is the first study to suggest that protection by D-BHB against GD-induced neuronal death is mediated, at least in part, by

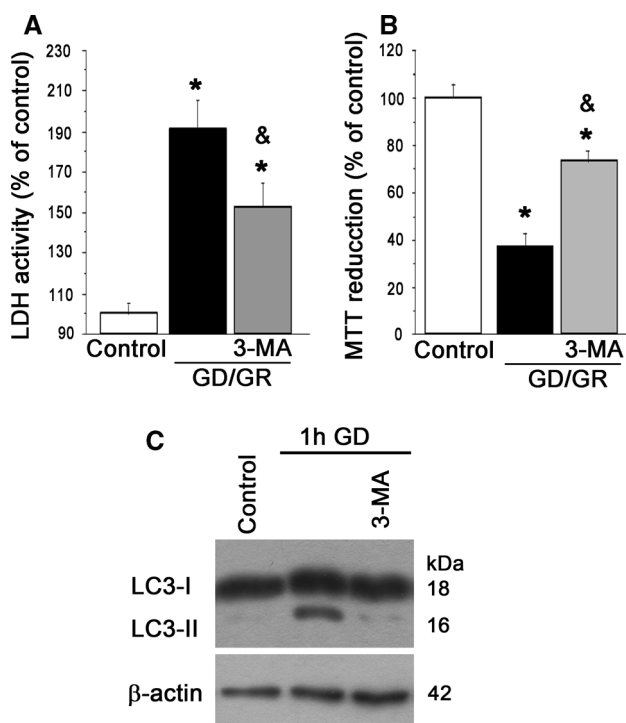


Fig. 6 Protective effect of 3-MA against GD-induced neuronal death in cortical cultures. Cultures were exposed to 2 h of GD in the presence of 3-MA (10 mM) and 22 h of GR and cell survival was assessed by LDH activity (a) and MTT reduction (b). Bars represent mean \pm SEM ($n = 6$). Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Fisher's post hoc test $*p < 0.005$ versus control and $\&p < 0.05$ versus GD. Representative western-blot showing the inhibitory effect of 3-MA on the transformation of LC3-I to LC3-II is shown in c

the stimulation of the autophagic flux. The molecular mechanisms by which D-BHB modulates autophagy are currently studied.

Acknowledgments This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Ciencias Biomédicas of L. Camberos-Luna at the Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) grant IN204213 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Grant CB-239607 to LM and CONACYT scholarship to L. Camberos-Luna. Authors thank Augusto César Poot-Hernández for his help in vesicle counting.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Robinson AM, Williamsom DH (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60:143–187
- Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA (1971) Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J* 122:13–18
- Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 40:163–221
- Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF Jr (1967) Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46:1589–1595
- Pan JW, de Graaf R, Petersen KF, Shulman G, Herrington HP, Rothman DL (2002) [2,4- $^{13}\text{C}_2$]-beta-hydroxybutyrate metabolism in human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:890–898
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I (2001) Ketogenic diet, amino acid metabolism and seizure control. *J Neurosci Res* 66:931–940
- Masuda R, Monahan JW, Kashiwaya Y (2005) D-beta-hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J Neurosci Res* 80:501–509
- Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S 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
- Puchowicz MA, Zechel JL, Valerio J, Emancipator DS, Xu K, Pundik S et al (2008) Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1907–1916
- Tai KK, Nguyen N, Pham L, Truong DD (2008) Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration. *J Neural Transm* 115:1011–1017
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K (2003) Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365–378
- Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han J, Bong JH, Kang SS et al (2006) Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 83:702–709
- Yamada KA, Rensing N, Thio LL (2005) Ketogenic diet reduces hypoglycemia-induced neuronal death in young rats. *Neurosci Lett* 385:210–214
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211:85–96
- Julio-Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, Gerónimo-Olvera C, Massieu L (2015) Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:851–860
- Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145:256–264
- Zhang J, Cao Q, Li S, Lu X, Zhao Y, Guan JS et al (2013) 3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism. *Biomaterials* 34:7552–7562
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky D (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069–1075
- Tanida I (2011) Autophagy basics. *Microbiol Immunol* 55:1–11
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S et al (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26:9220–9231
- Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40:280–293
- Alirezai M, Kembal CC, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL, Kiosses WB (2010) Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* 6:702–710

23. Tsujimoto Y, Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Diff* 12:1528–1534
24. Clarke PGH, Puyal J (2012) Autophagic cell death exists. *Autophagy* 8:867–869
25. Sou Y-S, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T et al (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 19:4762–4775
26. Kulbe JR, Levy JMM, Coultrap SJ, Thorburn A, Baye KU (2014) Excitotoxic glutamate insults block autophagic flux in hippocampal neurons. *Brain Res* 1542:12–19
27. Sarkar C, Zhao Z, Aungst S, Sabirzhanov B, Faden AI, Lipinski MM (2014) Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy* 10:2208–2222
28. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I et al (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441:880–884
29. Carloni S, Buonocore G, Balduini W (2008) Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 32:329–339
30. Bukcley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, Barrett JR, Kirks R et al (2014) Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Trans Stroke Med* 6:8
31. Shi R, Weng J, Zhao L, Li X-M, Gao T-M, Kong J (2012) Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosc Ther* 18:25–260
32. Higgins GC, Devenish RJ, Beart PM, Nagley P (2011) Autophagic activity in cortical neurons under acute oxidative stress directly contributes to cell death. *Cell Mol Life Sci* 68:3725–3740
33. Jang BG, Choi BY, Kim JH, Kim MJ, Sohn M, Suh SW (2013) Impairment of autophagic flux promotes glucose reperfusion-induced neuro2A cell death after glucose deprivation. *PLoS ONE* 8:e76466
34. Yue Z, Zhong Y (2010) From global view to focused examination: understanding cellular function of lipid kinase VPS34-Becclin 1 complex in autophagy. *J Mol Cell Biol* 2:305–307
35. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H et al (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282:24131–24145
36. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
37. Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, et al (2012) A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* 8:1371–1382
38. Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, Zhang XD 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
39. Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S et al (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172:454–469
40. Liu C, Gao Y, Barrett J, Hu B (2010) Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem* 115:68–78
41. Balmer D, Emery M, Andreux P, Auwerx J, Ginet V, Puyal J et al (2013) Autophagy defect is associated with low glucose-induced apoptosis in 66 W photoreceptor cells. *PLoS ONE* 8:e74162
42. Izumi Y, Benz AM, Katsuki H, Zorumski CF (1997) Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J Neurosci* 17:9448–9457
43. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140:313–326