



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL CUERPO CETÓNICO β -
HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA DINÁMICA
MITOCONDRIAL DE NEURONAS CORTICALES
SOMETIDAS A PRIVACIÓN Y REINTRODUCCIÓN
DE GLUCOSA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ASHLEY MICHEL SALCIDO GÓMEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021



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.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

A la Facultad de Ciencias y al Instituto de Fisiología celular de la UNAM

A la Dra. Lourdes Massieu, por permitirme formar parte de su laboratorio y por ser un ejemplo de una gran mujer y una gran científica

A la Biol. Teresa Montiel Montes, por toda la sabiduría y soporte técnico sin en cual este proyecto no hubiera sido posible

A la Dra. Ruth Rincón Heredia, por todo su apoyo, su paciencia y sobretodo su tiempo

A los miembros del jurado, por su tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo:

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Dra. Mina Konisberg Fainstein

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Thelma Gómez Arias y Roberto Carlos Salcido Palazuelos, por todo su amor y apoyo incondicional. No hay palabras, pero ustedes saben que lo son todo para mí.

A todos y todas mis amigos y amigas que me ha dado la UNAM

A Natalia González, Paulina De la Vega, Christopher Franco y Gustavo Rodríguez, por seguir conmigo después de todos estos años

A Daphne Álvarez, por las lágrimas (buenas y malas), no sé qué hubiera sido de mi carrera sin ti

A la grasa, por los encuentros en el Darwin para desayunar, por las cenas navideñas y los discursos cursis que siempre terminaban en abrazo grupal; estoy segura de que todos y todas ustedes serán grandes biólogos y biólogas, me llenan de orgullo

Al laboratorio AL-302, especialmente a Carmen Torres, por tantos momentos divertidos y las llamadas largas y a Juan Carlos Gómora García, por ser mi maestro, guía y amigo

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| I. | LISTA DE ABREVIATURAS | 7 |
| II. | RESUMEN | 9 |
| III. | ABSTRACT | 10 |
| IV. | INTRODUCCIÓN | 11 |
| | 1. Importancia de la glucosa para el funcionamiento del cerebro | 11 |
| | 1.1 Transporte y metabolismo de la glucosa en el cerebro | 11 |
| | 1.2 Hipoglucemia..... | 14 |
| | 1.2.1 Muerte neuronal asociada a la hipoglucemia | 15 |
| | 2. La mitocondria..... | 16 |
| | 2.1 Dinámica mitocondrial | 17 |
| | 2.1.1 Fisión y fusión mitocondrial..... | 18 |
| | 2.1.2 Mitofagia | 20 |
| | 2.2 Regulación metabólica de la dinámica mitocondrial..... | 23 |
| | 3. D-β-Hidroxiacetato..... | 26 |
| | 3.1 Metabolismo del D-β-Hidroxiacetato..... | 26 |
| | 3.2 Efecto neuroprotector del D-β-Hidroxiacetato..... | 29 |
| V. | ANTECEDENTES | 31 |
| VI. | HIPÓTESIS..... | 36 |
| VII. | OBJETIVOS..... | 36 |
| VIII. | MATERIAL Y MÉTODOS | 37 |
| | 1. Cultivo primario de neuronas corticales de rata | 37 |
| | 2. Tratamientos | 37 |
| | 3. Fraccionamiento mitocondrial..... | 38 |
| | 4. Inmunoblot..... | 39 |
| | 5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial..... | 39 |
| | 6. Inmunoprecipitación..... | 40 |
| | 7. Análisis estadístico | 41 |
| IX. | RESULTADOS..... | 41 |
| | La PG disminuye el potencial de membrana mitocondrial y aumenta la translocación de DRP1 a la mitocondria | 41 |
| | La PG/RG disminuye la fosforilación de DRP1 en la serina 616 | 42 |
| | El BHB no evita la disminución de la fosforilación de DRP1 ni su translocación a la mitocondria inducidos por la PG..... | 43 |
| | La PG aumenta la fosforilación del receptor MFF mientras que la RG la disminuye | 44 |

| | |
|---|----|
| El BHB aumenta la abundancia de MFF en la mitocondria durante la PG | 47 |
| La PG/RG no altera el procesamiento de OPA1 ni la abundancia de MFN2..... | 48 |
| Distintas dosis de BHB tienen distintos efectos sobre las proteínas de fusión mitocondrial durante la PG | 51 |
| La PG induce la activación parcial de la mitofagia vía PINK1/Parkin y la RG la inhibe .. | 53 |
| El BHB no modifica la vía de PINK1/Parkin en condiciones de PG..... | 55 |
| La PG disminuye la dimerización de BNIP3, pero no la de NIX, mientras que la RG disminuye la abundancia de ambas proteínas..... | 56 |
| El BHB previene el aumento de la interacción NIX/LC3 inducida por la PG | 58 |
| X. DISCUSIÓN..... | 60 |
| XI. CONCLUSIÓN..... | 74 |
| XII. PERSPECTIVAS | 75 |
| XIII. REFERENCIAS..... | 76 |
| XIV. APÉNDICE I. | 83 |

I. LISTA DE ABREVIATURAS

ACA- Acetoacetato
AMP- Adenosín monofosfato
AMPK- Cinasa activada por AMP
ATP- Adenosín trifosfato
BDNF- Fractor neurotrófico derivado del cerebro
BHB- β -Hidroxiacetato
BNIP3- Proteína de interacción con BCL2 3
BNIP3L- *BNIP3-like*
CAMK- Cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
CCCP- Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CDK1- Cinasa dependiente de ciclina 1
CDK5- Cinasa dependiente de ciclina 5
CoA- Coenzima A
DIV- Días *in vitro*
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DRP1- Proteína relacionada a dinamina 1
ER- Retículo endoplásmico
EROs- Especies reactivas de oxígeno
FIS1- Proteína de fisión 1
FOXO3a- Forkhead box O3
GED- Dominio efector de GTPasa
GTP- Guanosín trifosfato
HDACs- Desacetilasas de histonas
HM- Hipoglucemia moderada
HMG- Hidroximetilglutaril
HMR- Hipoglucemia moderada recurrente
HS- Hipoglucemia severa
LC3- Proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3
LDH- Lactato deshidrogenasa
LIR- Región de interacción con LC3
MCAO- Oclusión de la arteria cerebral media
MCT- Transportadores de monocarboxilatos
MEM- Membrana externa mitocondrial
MFF- Factor de fisión mitocondrial
MFN1- Mitofusina 1
MFN2- Mitofusina 2
MiD49- Proteína de dinámica mitocondrial de 49 kDa
MiD51- Proteína de dinámica mitocondrial de 51 kDa

MIM- Membrana interna mitocondrial
MIRO- GTPasa mitocondrial Rho
MPTs- Modificaciones post-traduccionales
MPP- Peptidasa de procesamiento mitocondrial
MT2- Metalotioneína 2
mtDNA- Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
MTFP1- Proteína del proceso de fisión mitocondrial 1
mTOR- Diana de rapamicina en mamíferos
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAD⁺- Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH- Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NBR1- Proteína vecina de BRCA1
NFκB- Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NMDA- N-metil-D-aspartato
OGD- Privación de oxígeno y glucosa
OMA1- Metaloendopeptidasa mitocondrial 1
OPA1- Atrofia Óptica 1
PARL- Proteína de tipo romboide asociada a las presenilinas mitocondrial
PG- Privación de glucosa
PGC1α- Coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
PINK1- Cinasa 1 inducida por PTEN
PKA- Proteína cinasa dependiente de AMP
RG- Reintroducción de glucosa
SCOT- Succinil-CoA transferasa
SOD2- Superóxido dismutasa 2
YME1L- Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP

II. RESUMEN

La glucosa es el sustrato energético esencial en el cerebro y cuando el suministro de glucosa disminuye o se interrumpe puede ocurrir daño celular que podría llevar a la muerte de las neuronas. La mitocondria es uno de los organelos más afectados tras episodios hipoglucémicos que pueden ocurrir en pacientes diabéticos por el uso incorrecto de insulina o durante la privación de glucosa (PG) asociada a la isquemia cerebral. Dado que las neuronas poseen un perfil metabólico principalmente oxidante, son altamente dependientes de la mitocondria, por lo que el correcto funcionamiento de este organelo es de vital importancia para la sobrevivencia neuronal. La mitocondria es un organelo que responde a las demandas celulares a través de su fisión, fusión, transporte, biogénesis y degradación, procesos que en su conjunto se denominan dinámica mitocondrial. Se ha observado que los cuerpos cetónicos tienen un papel neuroprotector en modelos de estrés energético tanto *in vivo* como *in vitro* y, aunque los mecanismos aún siguen siendo investigados, se sabe que uno de ellos es a través del mantenimiento de la función mitocondrial. En el presente trabajo nos preguntamos si la administración del cuerpo cetónico β -Hidroxibutirato (BHB) es capaz de afectar algún proceso de la dinámica mitocondrial neuronal en un modelo *in vitro* de privación y reintroducción de glucosa (PG/RG, respectivamente). Los resultados sugieren que la PG induce la fisión mitocondrial y activa parcialmente la mitofagia, mientras que durante la RG las neuronas inhiben la degradación mitocondrial. La administración de BHB durante la PG no provoca cambios significativos en los procesos de fisión y fusión mitocondrial; sin embargo, los resultados sugieren que podría estar afectando la mitofagia vía BNIP3/NIX, ya que disminuye la interacción de NIX con LC3. No obstante, el efecto del BHB sobre la progresión de la mitofagia y sobre la sobrevivencia neuronal, así como el mecanismo detrás de este efecto son aspectos de vital importancia para la interpretación de este resultado que no fueron explorados en este estudio.

III. ABSTRACT

The brain relies on circulating glucose as its main source of energy; thus, interruption or reduction in glucose supply to the brain causes cellular damage that can lead to neuronal death. Mitochondria is among the most affected organelles after either hypoglycemic events in diabetic patients due to wrong use of insulin, or ischemic glucose deprivation. Neurons are highly dependent on mitochondria because of its oxidative metabolic profile; as a result, mitochondrial health is indispensable for neuronal survival. Mitochondrial dynamics refers to distinct processes, like fission, fusion, transport, biogenesis, and degradation, that allow the adaptation of mitochondria to cellular demands. Since the preservation of mitochondrial function is among the neuroprotective mechanisms of ketone bodies, both *in vivo* and *in vitro*, the purpose of this study was to determine if the administration of one ketone body, β -Hydroxybutyrate (BHB), could modify mitochondrial dynamics in response to glucose deprivation/reintroduction (GD/GR). Results suggest that GD induces mitochondrial fission and activates mitophagy; in contrast, neurons inhibit mitochondrial degradation during RG. Whereas BHB administration has no effect on neither mitochondrial fission nor mitochondrial fusion during GD, it appears to modify BNIP3/NIX pathway of mitophagy, since administration of BHB decreases NIX-LC3 interaction. Nevertheless, the effect of BHB on mitophagy progression and neuronal survival, apart from mechanistic aspects behind this effect remain to be elucidated.

IV. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la glucosa para el funcionamiento del cerebro

La glucosa es un sustrato energético necesario para el correcto funcionamiento del cerebro adulto de los mamíferos, ya que a través de su metabolismo se obtiene la energía necesaria para procesos fundamentales como: la generación de potenciales de acción y señalización posináptica, la regulación del potencial de membrana en reposo y la liberación y recaptura de neurotransmisores, entre otros (Magistretti & Allaman, 2015; Niven, 2016). Así pues, el cerebro es altamente dependiente del suministro de la glucosa sanguínea, ya que es uno de los órganos con mayor demanda energética y, por otro lado, la alta selectividad de la barrera hematoencefálica limita la entrada de otros compuestos potencialmente utilizables como sustratos energéticos a este órgano (Mergenthaler et al., 2013).

1.1 Transporte y metabolismo de la glucosa en el cerebro

La glucosa que se encuentra en el torrente sanguíneo es capaz de ingresar al cerebro mediante los transportadores de glucosa que se expresan en las células endoteliales que forman parte de la barrera hematoencefálica (Mergenthaler et al., 2013). Posteriormente, la glucosa es capaz de ingresar a las células cerebrales mediante los transportadores que se encuentran en la membrana plasmática de cada célula. Dichos transportadores de glucosa son denominados GLUTs (por sus siglas en inglés: *Glucose Transporters*). En las células endoteliales, astrocitos, oligodendrocitos y microglía predomina el GLUT1, mientras que las neuronas expresan mayoritariamente el GLUT3, que es el que posee mayor tasa de transporte de glucosa, debido a que posee mayor afinidad por este sustrato (K_m de 2.6 mM contra K_m de 9.5mM del GLUT1 para 2-desoxiglucosa) (Mergenthaler et al., 2013; Custódio et al., 2020). El metabolismo de la glucosa en el cerebro es un proceso dinámico, que responde a

las necesidades locales de este órgano; adicionalmente, se ha sugerido que los astrocitos y las neuronas poseen perfiles metabólicos distintos, pero complementarios (Bélanger et al., 2011; Mergenthaler et al., 2013).

La tasa glucolítica se regula mediante tres reacciones irreversibles: la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato mediante enzima la hexocinasa/glucocinasa, la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa 1,6 bisfosfato mediante la enzima 6-fosfofructo-2-cinasa (PFK1, por sus siglas en inglés) y la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato mediante la enolasa. Por ello, la regulación de estas enzimas es clave para la progresión de la glucólisis. La fructosa 2,6 bisfosfato es un potente activador de la PFK1 y es producida por otra enzima, la PFK2. Se ha observado que la abundancia de PFK2 es mayor en astrocitos que en neuronas, lo que se ha relacionado, por un lado, con que las neuronas contienen menos RNA mensajero de *Pfk2* que los astrocitos y, por otro lado, con que esta proteína es degradada constantemente vía proteosomal en neuronas (Herrero-Méndez et al., 2009; Zhang et al., 2014). Lo anterior ha llevado a proponer que la tasa glucolítica de los astrocitos es mayor de la de las neuronas.

En el último paso de la glucólisis, el fosfoenolpiruvato es convertido a piruvato, que a su vez puede convertirse a lactato o bien, puede entrar a la mitocondria y convertirse en Acetil-CoA, un intermediario del TCA. Se ha sugerido que los astrocitos convierten una gran parte del piruvato que producen a lactato, mientras que el piruvato es generalmente convertido a Acetil-CoA en neuronas (Magistretti & Allaman, 2015). Dos hallazgos soportan esta teoría; por un lado, los astrocitos expresan preferencialmente la isoforma de la enzima lactato deshidrogenasa tipo b (*Ldhb*), cuyo equilibrio está desplazado hacia la producción de lactato; a diferencia de las neuronas, que expresan principalmente la de tipo a (*Ldha*), cuyo equilibrio está desplazado hacia la producción de piruvato (Zhang et al., 2014). Adicionalmente, Zhang

et al. (2014) observaron que los astrocitos sobreexpresan *Pdk4* (cuyo transcrito se encontró enriquecido hasta 30 veces más en astrocitos que en neuronas), que codifica para la proteína piruvato deshidrogenasa cinasa, una enzima que fosforila e inactiva al complejo piruvato deshidrogenasa, que realiza la conversión de piruvato a acetil-coenzima A y, por lo tanto, que disminuye la proporción de piruvato capaz de alimentar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La glucosa también puede ser metabolizada a través la vía de las pentosas fosfato (Magistretti & Allaman, 2015). La vía de las pentosas fosfato consiste en diversas reacciones de tipo oxidante en las que a partir de glc-6-P se producen dióxido de carbono (CO₂), ribulosa-5-fosfato (Ribulosa-5-P) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) + 2H⁺ (McKenna et al., 2012). La ribulosa-5-P es un precursor de los azúcares necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos durante el desarrollo. Sin embargo, en neuronas post-mitóticas, su importancia está relacionada con la reparación del DNA (Bolaños et al., 2010).

Por otra parte, el nucleótido NADPH es necesario para regenerar el glutatión reducido (GSH). El GSH es un antioxidante no enzimático que lleva a cabo la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) producidas en muchas de las reacciones metabólicas celulares de tipo oxidante (Fernandez-Fernandez et al., 2012). Así pues, el metabolismo de la glucosa, a través de la vía de las pentosas fosfato, permite a las neuronas lidiar con el estrés oxidante que conlleva su propio perfil metabólico, que se lleva a cabo en la mitocondria, el principal productor de EROs en la célula (Battin & Brumaghim, 2009; Magistretti & Allaman, 2015).

1.2 Hipoglucemia

La hipoglucemia, o estado hipoglucémico, consiste en la disminución de glucosa en la sangre por debajo de los 65–70 mg/dl (3.6–3.9 mmol/L) (American Diabetes Association, 2005). Ante un estado hipoglucémico, el sistema neuroendócrino de los mamíferos es capaz de promover diversos mecanismos que regulan los niveles de glucosa a su concentración normal (Rehni & Dave, 2018) la cual oscila entre 3.9 y 7.1 mM (Amaral, 2013). El sistema endócrino controla la tasa de utilización y síntesis de la glucosa mediante la secreción de adrenalina, que a su vez modula los niveles de insulina y glucagon (Fanelli et al., 1994).

Así pues, cuando la concentración de glucosa en sangre decrece, la concentración de insulina disminuye también, mientras que la de glucagon aumenta, dando como resultado la disminución en la utilización de glucosa y la inducción de la gluconeogénesis en el hígado, respectivamente (Rehni & Dave, 2018). Por lo anterior, la hipoglucemia es poco común o es considerada un estado transitorio en humanos sanos sin trastornos metabólicos; no obstante, representa una de las complicaciones más comunes en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, ya sea por la administración de dosis muy altas de insulina o porque la terapia insulino-dependiente prolongada disminuye la eficiencia de los mecanismos adaptativos del cuerpo en respuesta a la hipoglucemia (Haces del Blanco & Massieu, 2005; Cryer, 2007; Rooijackers et al., 2015).

Cuando los niveles de glucosa se mantienen por arriba de los 40 mg/dl, se habla de hipoglucemia moderada (HM); sin embargo, si los niveles de glucosa llegan a ser más bajos de 20 mg/dl, se le denomina hipoglucemia severa (HS) (Haces del Blanco & Massieu, 2005).

Durante la HS, la tasa de consumo de la glucosa disponible en sangre es mayor que la de transporte, por lo que la concentración de glucosa en el cerebro puede caer hasta niveles cercanos a cero (Amaral, 2013). Dado que el cerebro depende de la glucosa para llevar a cabo muchas de sus funciones, la HS puede provocar daño permanente en zonas vulnerables de este órgano, como la corteza y el hipocampo (Haces del Blanco & Massieu, 2005; Rooijackers et al., 2015). Por otro lado, la HM también puede tener consecuencias negativas en el cerebro cuando ocurre de manera crónica (Wang et al., 2007), en cuyo caso es denominada hipoglucemia moderada recurrente (HMR); no obstante, los mecanismos mediante los cuales la HMR induce daño cognitivo aún se encuentran en proceso de investigación (Zhou et al., 2018).

1.2.1 Muerte neuronal asociada a la hipoglucemia

La disminución del metabolismo de la glucosa está relacionada con vías de muerte celular asociadas con la neurodegeneración (Mergenthaler et al., 2013), ya que los procesos dependientes de energía dejan de llevarse a cabo adecuadamente, lo que lleva a la disfunción neuronal y finalmente a la muerte de estas células. La muerte asociada a la falta de glucosa en el cerebro se debe principalmente al daño excitotóxico provocado por la liberación e inhibición de la recaptura de glutamato, desregulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , y disfunción mitocondrial (Haces del Blanco & Massieu, 2005; Suh et al., 2007).

Para mantener el gradiente iónico después de llevarse a cabo los potenciales de acción y los potenciales posinápticos, así como para la recaptura de los neurotransmisores, la célula utiliza transportadores de iones o bombas ubicadas en la membrana plasmática de las neuronas que son dependientes de energía. De manera que estas bombas dejan de funcionar adecuadamente cuando la falta de glucosa disminuye la producción de ATP. Esto ocasiona, por un lado, la

despolarización de las neuronas y la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato (Szydłowska & Tymianski, 2010) y, por otro lado, la inhibición de la recaptura de dicho neurotransmisor (Haces del Blanco & Massieu, 2005). Todo este fenómeno ocasiona la hiperactivación de los receptores de glutamato de la neurona postsináptica y una entrada masiva de Na^+ y Ca^{2+} , lo que contribuye a la pérdida de la homeostasis iónica dentro de la neurona (Haces del Blanco & Massieu, 2005).

El gradiente electroquímico generado en la cadena de transporte de electrones hace que el interior de la mitocondria se encuentre cargado negativamente, permitiendo la entrada de Ca^+ al interior de ésta. En condiciones de excitotoxicidad, en las que la concentración intracelular de Ca^+ es más alta de lo normal, la entrada masiva de este ion a la mitocondria disminuye el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP, afectando los procesos celulares dependientes de energía (Szydłowska & Tymianski, 2010).

La disminución de la producción de ATP ocasionada por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial aumenta la producción de ERO. Aunado a esto, la falta de glucosa disminuye la cantidad de NADPH generado por la vía de las pentosas fosfato y, por lo tanto, la regeneración del GSH mediante la enzima glutatión reductasa (GR) (Liu et al., 2003). Esto provoca que las ERO generadas en la neurona puedan dañar proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Thorpe et al., 2004).

2. La mitocondria

La mitocondria es un organelo de que consta de dos membranas, la membrana interna mitocondrial (MIM), que delimita la matriz mitocondrial y cuyas invaginaciones forman las crestas mitocondriales y la membrana externa mitocondrial (MEM), que se encuentra en

contacto con el citosol (Frey et al., 2002), pero que también puede tener puntos de contacto con la MIM. El espacio que se encuentra entre la MIM y la MEM se denomina espacio intermembranal. Ambas membranas tienen un contenido muy alto de proteínas; por ejemplo, la MIM posee los complejos proteicos que llevan a cabo la fosforilación oxidativa (OXPHOS, por sus siglas en inglés Oxidative phosphorylation) y en la MEM se encuentra una gran cantidad de proteínas que realizan funciones muy diversas, desde el importe de otras proteínas a la mitocondria hasta el contacto con otros organelos (Pernas & Scorrano, 2016).

La mitocondria posee su propio genoma (mtDNA, por sus siglas en inglés *mitochondrial Desoxyribonucleid Acid*); sin embargo, éste sólo codifica para 13 proteínas mitocondriales (en humanos) y dos rRNAs, así como los tRNAs que son utilizados para la traducción de sus respectivos mRNAs dentro de la misma mitocondria (Anderson et al., 1981). El resto de los genes que codifican para las proteínas mitocondriales han sido transferidos al DNA nuclear, por lo que estas proteínas deben ser transportadas a la mitocondria una vez sus mRNAs han sido traducidos (Anderson et al., 1981; Pagliarini et al., 2008).

Aunque la función más descrita de la mitocondria es la producción de ATP, este organelo también participa en el ciclo celular, la respuesta inmune, la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} y en respuestas de muerte celular como necrosis o apoptosis (Pagliarini et al., 2008; Tilokani et al., 2018). Por lo tanto, el correcto funcionamiento de la mitocondria es fundamental para la sobrevivencia celular en condiciones fisiológicas y patológicas.

2.1 Dinámica mitocondrial

La dinámica mitocondrial se refiere al conjunto de procesos necesarios para asegurar el buen funcionamiento de este organelo, por ejemplo, la biogénesis, degradación, fisión, fusión y transporte mitocondrial, cuyo balance es indispensable para que la mitocondria sea capaz de adaptarse a las necesidades celulares. Anteriormente, se denominaba *dinámica mitocondrial*

a los cambios en la morfología de las mitocondrias que ocurren mediante los procesos de fusión y fisión mitocondrial; sin embargo, recientemente, este término se ha ampliado a todos los procesos ya mencionados (Pernas & Scorrano, 2016; Eisner et al., 2018). Esto se debe en parte a la evidencia de la íntima relación que existe entre las proteínas que participan en todos estos procesos, lo que convierte a la dinámica mitocondrial en una compleja red de interacciones y vías de señalización, que, a su vez, se encuentran altamente reguladas y cuya perturbación puede tener efectos desde la disfunción mitocondrial hasta el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Eisner et al., 2018).

2.1.1 Fisión y fusión mitocondrial

La fusión y fisión mitocondrial son procesos llevados a cabo por proteínas GTPasas de la familia de la dinamina: mitofusina 1 (MFN1) y mitofusina 2 (MFN2) llevan a cabo la fusión de las MEM; la proteína atrofia óptica 1 (OPA1, por sus siglas en inglés) realiza la fusión de las MIM y la proteína relacionada a la dinamina 1 (DRP1, por sus siglas en inglés), que lleva a cabo la fisión mitocondrial (Burté et al., 2015; Wai & Langer, 2016; Dorn, 2019).

DRP1

Es una proteína citosólica que se transloca a la mitocondria bajo condiciones que inducen su activación, tales como estímulos pro-apoptóticos, daño mitocondrial o la división celular (Pagliuso et al., 2018). Una vez activada, DRP1 puede ser reconocida por distintos receptores localizados en la MEM como Fis1, MiD49, MiD51 y MFF (Losón et al., 2013) que permiten la acumulación de DRP1 alrededor del sitio marcado para la fisión mitocondrial; posteriormente, DRP1 se oligomeriza y se une a GTP, lo que provoca un cambio

conformacional que le permite formar una estructura tipo anillo que constriñe a la mitocondria y da origen a dos “mitocondrias hijas” de distinto tamaño (Figura 1A) (Tilokani, et al., 2018).

DRP1 posee una estructura que consta de cuatro dominios: el dominio GTPasa (que contiene un inserto denominado A en neuronas), un dominio medio, un dominio variable (también llamado inserto b) y un dominio efector de GTPasa (GED, por sus siglas en inglés) que controla la oligomerización de la proteína (Pagliuso et al., 2018). La actividad y/o interacción entre estos cuatro dominios es regulada por modificaciones post-traduccionales (MPT), lo que permite el control de la fisión mitocondrial a distintos niveles.

Entre las MPT que regulan la actividad de la DRP1 se encuentran la fosforilación, acetilación nitrosilación y SUMOilación; cada una de las cuales es, a su vez, estrictamente controlada por el contexto celular (Chang and Blackstone, 2010). La diversidad de receptores y de MPT que posee DRP1 sugieren que el estricto control del proceso de fisión mitocondrial es de suma importancia para la función celular.

MITOFUSINAS 1 y 2.

Son GTPasas de la MEM que poseen una homología del 81% y son idénticas en ~60% de sus aminoácidos; MFN1 posee mayor actividad de GTPasa y se expresa de manera homogénea en la mayoría de los tejidos, mientras que MFN2 parece expresarse mayoritariamente en tejidos altamente diferenciados (Pagliuso et al., 2018). Ambas proteínas llevan a cabo la fusión de las membranas externas mitocondriales (Figura 1B) (Tilokani, et al., 2018), sin embargo, también poseen funciones no redundantes. Por ejemplo, MFN2, a diferencia de MFN1, se encuentra en los sitios de contacto de la mitocondria con el retículo endoplásmico (RE), participa en el tráfico mitocondrial mediante su interacción con la GTPasa mitocondrial

Rho (MIRO) y representa la comunicación entre los procesos de fusión y la degradación selectiva de mitocondrias denominada mitofagia, ya que puede actuar como receptor de parkin (descrita más adelante) (Dorn, 2019)

OPA1

Es una proteína capaz de realizar la fusión de las membranas internas de dos mitocondrias una vez que MFN1/2 han fusionado las MEM (Figura 1B). No obstante, a diferencia de éstas, OPA1 puede llevar a cabo esta función incluso si se encuentra en una sola de las membranas que serán fusionadas (Tilokani et al., 2018). Aunque la mayoría de OPA1 se encuentra anclada a la MIM, esta proteína puede ser cortada por dos metaloproteasas (OMA1 y YME1L) en dos sitios de corte independientes (S1 y S2, respectivamente) (Tilokani et al., 2018) y dar lugar a fragmentos cortos (denominados S-OPA1) que se encuentran de manera libre en la matriz mitocondrial. Por el contrario, la porción de OPA1 que se encuentra en la MIM está conformada por fragmentos largos de esta proteína denominados L-OPA1 (Head et al., 2009; Anand et al., 2014; Baker et al., 2014). En condiciones normales, las cantidades disponibles de L-OPA1 y S-OPA1 se encuentran en equilibrio; sin embargo, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial aumenta el corte de OPA1 y, dado que únicamente L-OPA1 puede llevar a cabo la fusión de las MEM, esto puede afectar la tasa de fusión/fisión (MacVicar & Langer, 2016).

2.1.2 Mitofagia

La mitofagia es un proceso de control de calidad que permite mantener el balance entre la biogénesis y la degradación mitocondrial (Dorn, 2019). Durante la mitofagia, las porciones mitocondriales dañadas o mitocondrias disfuncionales son secuestradas en una estructura de

doble membrana denominada autofagosoma (Pickles et al., 2018), que finalmente se fusiona con un lisosoma, del que son liberadas enzimas proteolíticas capaces de degradar a las mitocondrias (o porciones de estas) en sustancias que pueden ser liberadas al citosol para su reciclamiento (Glick et al., 2010; Green & Levine, 2014). Se han descrito dos mecanismos de mitofagia: la vía PINK1-Parkin y la vía BNIP3/NIX.

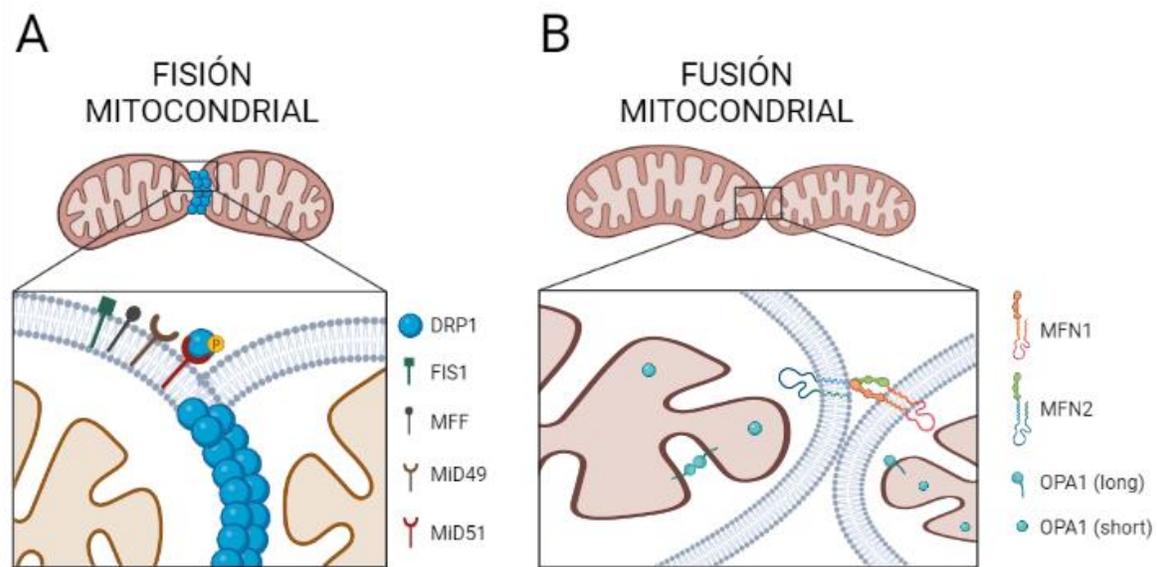


Figura 1. A, proceso de fisión mitocondrial, DRP1 es reconocida en la MEM mediante sus receptores FIS1, MFF, MiD49 y MiD51, que permiten su translocación a la mitocondria, donde se oligomeriza y forma una estructura en forma de anillo que constriñe a la mitocondria mediante la hidrólisis de GTP. B, fusión mitocondrial, MFN1 y MFN2 fusionan las MEMs mediante la formación de homo o heterodímeros, mientras que OPA1-L fusiona las MIMs. OPA1-S se encuentra en la matriz mitocondrial y no puede llevar a cabo la fusión mitocondrial. Creado en Biorender.com

PINK1-PARKIN

La cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1, por sus siglas en inglés) es una proteína de 64kDa que posee una secuencia de localización en la mitocondria; así pues, bajo condiciones normales, PINK1 es importada a la mitocondria y una vez ahí, sufre dos procesamientos

proteolíticos: por un lado, la proteína de tipo romboide asociada a las presenilinas mitocondrial (PARL, por sus siglas en inglés) escinde su secuencia de localización mitocondrial en el espacio intermembranal, mientras que su dominio transmembranal es cortado en la matriz por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP, por sus siglas en inglés) (Hamacher-Brady & Brady, 2016). Esta nueva versión escindida de PINK1 (de ~55 kDa) es exportada al citosol y degradada vía proteosomal, lo que mantiene bajos los niveles basales de PINK1 (Hamacher-Brady & Brady, 2016). El procesamiento de PINK1 es dependiente del potencial de membrana mitocondrial, por ello, cuando este se pierde PINK1 no es cortado y se estabiliza en la MEM, donde es capaz de fosforilar a diversas proteínas mitocondriales, entre ellas, a la E3 ubiquitin ligasa, parkin (Zhang et al., 2016a).

Parkin es una proteína citosólica, que se transloca a la mitocondria cuando se induce la mitofagia; una vez en la mitocondria, PINK1 fosforila a parkin en la serina 65, lo que promueve su actividad de E3 ligasa, mediante la cual es capaz tanto de poliubiquitinar proteínas mitocondriales *de novo* como de elongar las cadenas preexistentes de ubiquitina (McWilliams & Muqit, 2017; Pickles et al., 2018). La poliubiquitinación de diversas proteínas mitocondriales es reconocida por receptores que reconocen cargo que debe ser dirigido hacia los autofagosomas para su degradación, tales como p62/SQSTM1 optineurina y NBR1 (Figura 2) (Hamacher-Brady & Brady, 2016; Kubli & Gustafsson, 2012; McLelland et al., 2014; Tang et al., 2016).

BNIP3/NIX

La proteína 3 de interacción con BLC2 (Bnip3, por sus siglas en inglés) y Bnip3L (*Bnip3-Like*), también conocida como Nix, son dos proteínas homólogas que se localizan en la

membrana externa mitocondrial y que son capaces de promover la mitofagia mediante su dominio de interacción con LC3, que es una proteína asociada a microtúbulos, pero que cuando forma un conjugado con fosfatidiletanolamina, forma parte de la membrana de los autofagosomas (Green & Levine, 2014). Así pues, a través de su interacción con LC3, Bnip3 y Nix son capaces de acoplar la MEM con la membrana de los autofagosomas (Figura 2) (Novak et al., 2010).

El dominio de interacción con LC3 (*LC3-Interacting Region* o LIR) de Bnip3 es activado mediante la fosforilación de dos sitios cercanos al LIR; primero, se lleva a cabo la fosforilación en la serina 17 de Bnip3, lo cual es indispensable para su interacción con LC3 y, posteriormente, la fosforilación en su serina 24 aumenta la afinidad de esta interacción (Hamacher-Brady & Brady, 2016; Zhu et al., 2013). Por otro lado, la fosforilación de Nix en sus serinas 34 y 35 incrementan de manera importante su afinidad por LC3 y parecen controlar la eficacia de la mitofagia mediada por Nix (Rogov et al., 2017). No obstante, las cinasas responsables de las fosforilaciones mencionadas de Bnip3 y Nix aún son desconocidas (Hamacher-Brady & Brady, 2016).

2.2 Regulación metabólica de la dinámica mitocondrial

La estricta regulación de la dinámica mitocondrial es necesaria para la supervivencia celular, debido a que el correcto funcionamiento de los procesos que la componen determina la funcionalidad de este organelo. Por un lado, la fisión mitocondrial es necesaria para la correcta segregación de mitocondrias durante la división celular y está vinculada a la herencia del mtDNA; adicionalmente, la fisión está relacionada con el transporte mitocondrial dentro de la célula, la mitofagia y la progresión de la apoptosis (Detmer & Chan, 2007). La fusión, por otro lado, permite el intercambio de lípidos y proteínas entre mitocondrias y la interacción

de moléculas de mtDNA, lo que disminuye la acumulación de mutaciones en una sola mitocondria (Detmer & Chan., 2007; Pagliuso et al., 2018; Tilokani et al., 2018).

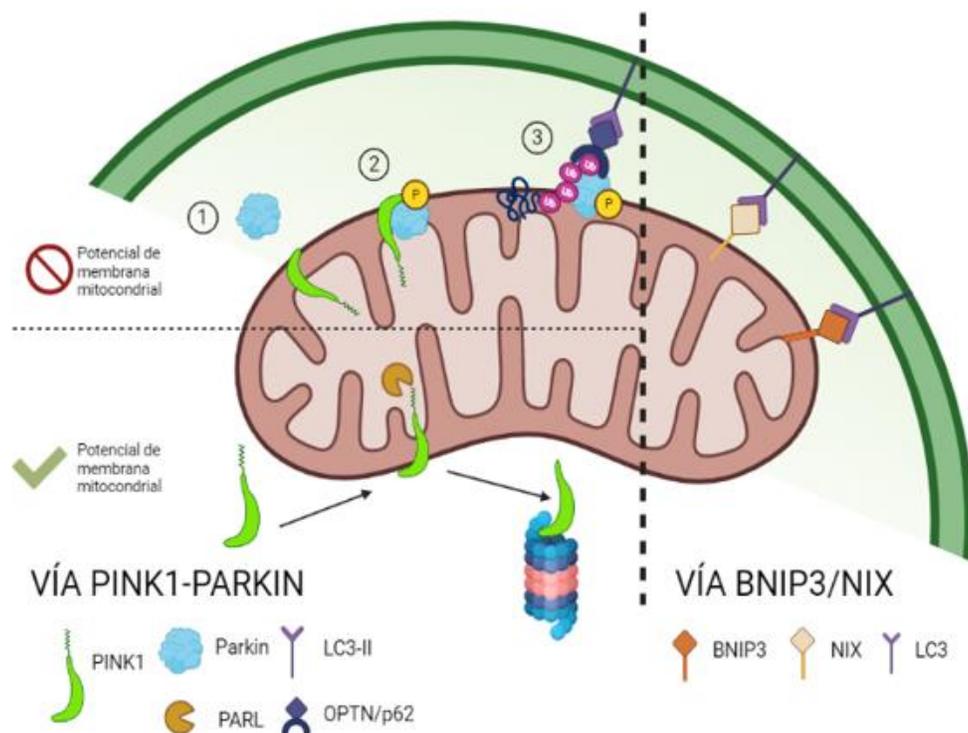


Figura 2. Proceso de mitofagia mediante las vías de PINK1-Parkin (izquierda) y BNIP3/NIX (derecha). Cuando el potencial de membrana mitocondrial se encuentra intacto, PINK1 es cortada en la mitocondria y, posteriormente, liberada al citosol para su degradación vía proteosomal (izquierda abajo). Cuando se pierde el potencial de membrana mitocondrial, (1) PINK1 se estabiliza en la MEM, (2) en donde es capaz de fosforilar a parkin, (3) que puede poli-ubiquitinar a diversas proteínas. Así, receptores de ubiquitina que también reconocen a LC3-II como OPTN, p62, y NBR1, unen a las mitocondrias dañadas con la membrana del fagóforo en formación (izquierda arriba). Por otro lado, BNIP3 y NIX poseen un dominio de interacción con LC3, por lo que unen a las mitocondrias con el fagóforo de manera directa (derecha). Una vez que el fagóforo se cierra se dice que se ha formado un autofagosoma que, posteriormente, se fusiona con un lisosoma, del cual son liberadas enzimas proteolíticas que degradan el cargo. Creado en de Biorender.com

La fisión es regulada, en parte, por los diferentes tipos de MPT de DRP1 antes mencionadas, que ocurren en respuesta al estado metabólico de la célula. Las MPT de DRP1 más estudiadas

son la fosforilación en la serina 616 (S616) llevada a cabo por CDK1, que correlaciona con el aumento de la fisión mitocondrial durante el ciclo celular y, por otro lado, la fosforilación en la serina 637 (S637) llevada a cabo por la proteína cinasa dependiente de AMP (PKA, por sus siglas en inglés), que corresponde a la inactivación de DRP1, ya que impide la interacción de sus dominios GTPasa y GED (Chang and Blackstone, 2010; Tilokani, et al., 2018; Kraus et al., 2021). La proporción de DRP1 fosforilada en la serina 637 o 616 puede ser regulada por la proteína del proceso de fisión mitocondrial 1 (MTFP1, por sus siglas en inglés), una proteína de la membrana interna mitocondrial, cuya expresión depende de la actividad de mTOR (diana de rapamicina en mamíferos), por lo que está asociada a la disponibilidad de nutrientes y oxígeno en el medio extracelular (Morita et al., 2017).

Dado que el potencial de membrana mitocondrial está directamente relacionado con el correcto funcionamiento de este organelo, su pérdida indica daño mitocondrial, lo que promueve la fisión y eliminación de dichas mitocondrias, así como la degradación de MFN1/2 vía proteosoma (Kubli & Gustafsson, 2012; Escobar-Henriques, 2014). Así pues, la ubiquitinación de las mitofusinas es una de las MPT que afectan la fusión (Escobar-Henriques, 2014). Ésta es llevada a cabo por E3-ubiquitin-ligasas como Parkin (Tanaka et al., 2010) y Huwe1 (Leboucher et al., 2012). Por el contrario, el potencial de membrana mitocondrial intacto es un requisito para que dos mitocondrias se fusionen, lo que constituye un mecanismo que impide que las mitocondrias disfuncionales puedan fusionarse y mezclar componentes de mala calidad con mitocondrias sanas (Detmer & Chan, 2007; Youle & van der Bliek, 2012).

Los estímulos intra y extracelulares como el estado metabólico de las células, la demanda energética, la disponibilidad de nutrientes y oxígeno y factores de crecimiento afectan la dinámica mitocondrial (Wai & Langer, 2016). El estrés moderado y niveles altos de

fosforilación oxidativa promueven la fusión de las mitocondrias (Wai & Langer, 2016). Así pues, ante estímulos de estrés moderado (como la privación de aminoácidos), la hiperfusión de las mitocondrias es capaz de proteger a las células, ya que aumenta la producción de ATP y previene la fisión, disminuyendo así la degradación mitocondrial y la progresión de la apoptosis (Hoppins, 2014; Morita et al., 2017). Sin embargo, estímulos de estrés prolongados u otros tipos de estrés nutricional considerados severos (como la privación de glucosa en algunos tipos celulares), así como los niveles bajos de fosforilación oxidativa, inducen la fisión mitocondrial (Rambold et al., 2011; Wai & Langer, 2016).

3. D- β -Hidroxibutirato

El β -Hidroxibutirato, junto con el acetoacetato y la acetona, se denominan cuerpos cetónicos. Son compuestos sintetizados en el hígado a partir del acetil-coA producido mediante la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria que no es procesado en el ciclo de Krebs (Puchalska & Crawford, 2017; Yang et al., 2019). El acetoacetato (ACA) y el β -Hidroxibutirato (BHB), que son interconvertibles mediante una sola reacción, constituyen una fuente de energía para diversos tejidos extrahepáticos, mientras que la acetona, formada a partir de la descarboxilación espontánea del acetato, es un compuesto altamente volátil que se elimina durante la respiración, por lo que no es considerada de importancia metabólica (Morris, 2005).

3.1 Metabolismo del D- β -Hidroxibutirato

La síntesis de cuerpos cetónicos se denomina cetogénesis y ocurre en la matriz mitocondrial de los hepatocitos; por otro lado, la descomposición de cuerpos cetónicos se denomina cetólisis y ocurre en la mitocondria de las células que conforman tejidos extrahepáticos de alta demanda energética, tales como el cerebro, músculo esquelético, corazón y riñón (Figura

3) (Puchalska & Crawford, 2017). La proporción de síntesis/consumo, es decir, el metabolismo de los cuerpos cetónicos depende principalmente de dos factores: de la concentración de cuerpos cetónicos que se encuentran circulando en la sangre y, en el caso del cerebro, de su transporte a través de la barrera hematoencefálica (Morris, 2005).

Normalmente, la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre es baja; en humanos adultos sanos, por ejemplo, esta concentración oscila entre 100 y 250 μM (Puchalska & Crawford, 2017). No obstante, en estados fisiológicos en los que la disponibilidad de carbohidratos es baja, por ejemplo, el ayuno, el período neonatal, las jornadas de ejercicio intenso y el embarazo, se promueve la cetogénesis y la concentración de cuerpos cetónicos en sangre puede alcanzar niveles de 1 mM a 5 mM (Puchalska & Crawford, 2017).

La cetogénesis parte del acetyl-CoA que proviene de la oxidación de los ácidos grasos (Newman, 2014). Primero, la enzima tiolasa condensa dos moléculas de acetyl-CoA y produce acetoacetyl-CoA. Posteriormente, la enzima hidroximetilglutaril (HMG)-CoA sintasa condensa el acetyl-CoA con acetoacetyl-CoA para formar hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA), a partir del cual la HMG-CoA liasa libera acetoacetato (Newman, 2014). Así pues, el acetoacetato es el primer cuerpo cetónico en formarse y, por lo tanto, es el precursor de los dos restantes (Newman, 2014). Por un lado, la acetona se produce a partir de la descarboxilación no enzimática del acetoacetato (Morris, 2005), mientras que la producción de BHB se da mediante una reacción que requiere de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y que es llevada a cabo por la enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa; por lo que la proporción de ACA/BHB depende a su vez de la proporción de $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ (Newman, 2014; Yang et al., 2019). Una vez que se producen los cuerpos cetónicos, éstos son liberados al torrente sanguíneo, donde son distribuidos a los tejidos de mayor demanda energética.

En el caso del cerebro, los cuerpos cetónicos deben atravesar la barrera hematoencefálica a través de los transportadores de monocarboxilatos (MCT's, por sus siglas en inglés *Monocarboxylate Transporters*) que se encuentran en las células endoteliales (MCT1) (Morris, 2005). Los transportadores de monocarboxilatos también les permiten a los cuerpos cetónicos entrar a los astrocitos (MCT1 y MCT4) y a las neuronas (MCT2) (Achanta & Rae, 2017; Halestrap, 2013). Una vez que se encuentran dentro de las células cerebrales, los cuerpos cetónicos son nuevamente procesados hasta producir Acetil-CoA mediante el proceso denominado cetolisis. En el caso del BHB, éste es convertido a acetoacetato mediante la enzima β -Hidroxibutirato deshidrogenasa mediante una reacción que requiere de NAD^+ y libera NADH (Achanta & Rae, 2017). Posteriormente, el acetoacetato es convertido mediante la enzima succinil CoA-transferasa (SCOT) a acetoacetyl-CoA, a partir del cual la enzima tiolasa genera 2 Acetil-CoA capaces de entrar al ciclo de Krebs y así producir ATP (Achanta & Rae, 2017).

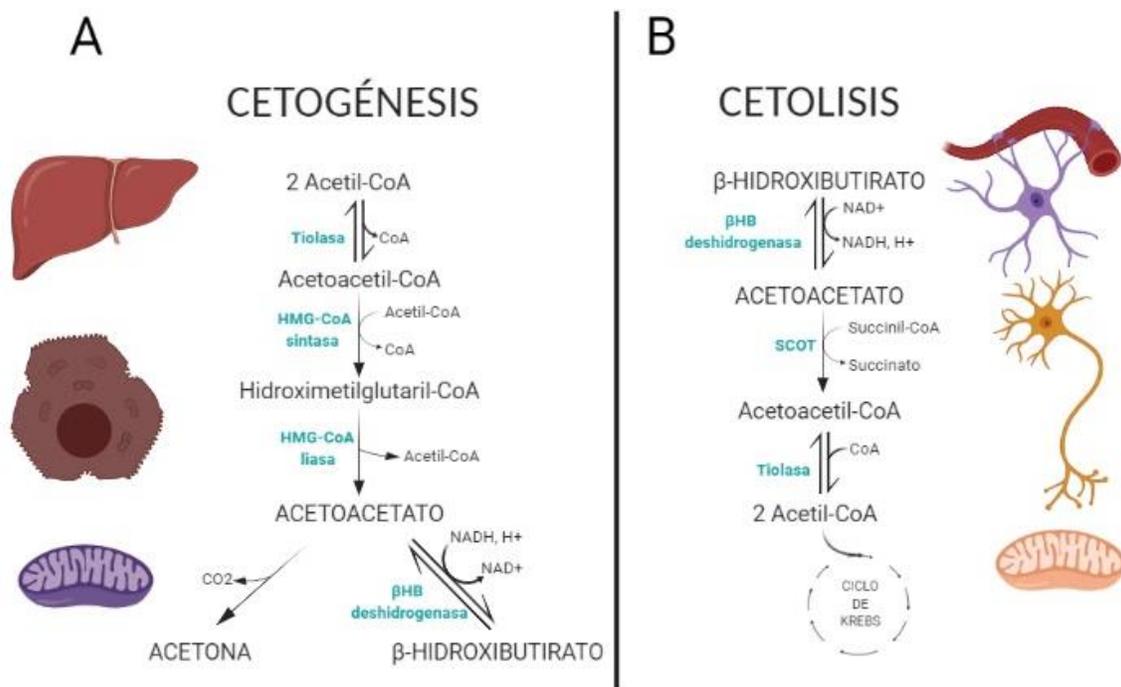


Figura 3. A, Cetogénesis, proceso por el que se producen los cuerpos cetónicos ACA, BHB y acetona a partir del acetil-CoA que se genera mediante la β -oxidación de los ácidos grasos que ocurre en la mitocondria de los hepatocitos. B, Cetolisis, los cuerpos cetónicos son liberados del hígado al torrente sanguíneo y son capturados por las células de los tejidos extrahepáticos de alta demanda energética como astrocitos y neuronas, en el caso del cerebro. Posteriormente, el ACA y BHB son convertidos nuevamente a acetil-CoA, que es metabolizado mediante el ciclo de Krebs. Creado en Biorender.com

3.2 Efecto neuroprotector del D- β -Hidroxibutirato

La función metabólica del cuerpo cetónico BHB en condiciones en las que la concentración de glucosa es baja fue de las primeras en reconocerse; sin embargo, por estudios más recientes, ahora se sabe que el BHB es más que un metabolito, ya que desempeña también diversas funciones de señalización (Newman, 2014). Muchas de las vías en las que participa el BHB han sido elucidadas al estudiar los posibles mecanismos que puedan explicar su efecto neuroprotector, el cual ha sido probado en diversos modelos de estrés. Uno de los mecanismos más descritos del BHB que se sabe contribuye a su efecto neuroprotector es la disminución de estrés oxidante, que a su vez es un mecanismo que contribuye en gran parte a la muerte celular asociada a diversas neuropatologías (Camberos-Luna & Massieu, 2020).

El efecto antioxidante del BHB es multifactorial y está dado por la combinación de diversos mecanismos que tienen que ver, por un lado, con su papel a nivel epigenético y por otro, con el aumento del cociente $NAD^+/NADH$. Respecto a su papel epigenético, Shimazu et al. (2013), demostraron que el BHB es un inhibidor endógeno de las deacetilasas de histonas (HDAC) de clase I. La acetilación es una de las modificaciones de histonas que pueden alterar la expresión génica, ya que promueve el estado relajado de la cromatina que facilita el acceso de factores de transcripción a sitios específicos del DNA. Así pues, la acetilación es considerada una marca de “activación génica”, que es removida por las HDAC. Por lo tanto, al ser un inhibidor de las HDAC, la administración de BHB promueve la transcripción de

algunos genes; entre ellos, dos que son importantes para la resistencia al estrés oxidante: *Foxo3a* y *Mt2* (Shimazu et al., 2013).

El segundo mecanismo que contribuye al efecto antioxidante del BHB es el aumento del cociente NAD^+ (Maalouf et al., 2007) mediante el incremento de la función del complejo I de la cadena de transporte de electrones, que es el encargado de la oxidación de NADH (Maalouf et al., 2009). El incremento de NAD^+ intracelular es censado por proteínas denominadas sirtuinas, que son capaces de modificar la actividad de otras proteínas mediante su deacetilación (Shimazu et al., 2013). Yin et al. (2015) describieron que el BHB activa a la sirtuina 3 y aumenta la abundancia de dos de sus blancos: FOXO3a y SOD2, dos proteínas que forman parte de la defensa antioxidante. Es importante recalcar que al estudiar el efecto antioxidante del BHB en condiciones de hipoglucemia, Haces et al (2008) encontraron que ambos isómeros, D-BHB y el L-BHB, tienen la capacidad de disminuir la presencia del radical hidroxilo ($\cdot OH$), lo que sugiere que el papel metabólico del D-BHB no es esencial para su efecto antioxidante.

Al disminuir los altos niveles de ERO que se producen durante eventos de excitotoxicidad, el BHB protege de manera indirecta la funcionalidad de las mitocondrias y, por lo tanto, previene la muerte celular programada (Maalouf et al., 2009). Adicionalmente, gracias a su papel metabólico, el isómero fisiológico del Betahidroxibutirato, el D-BHB, es capaz de mantener los niveles de ATP necesarios para disminuir la muerte neuronal inducida por la privación de glucosa (Julio-Amilpas et al., 2015) o por la inhibición de la glucólisis (Haces et al., 2008). Por otro lado, el D-BHB (1mM) también es capaz de aumentar la tasa de consumo de oxígeno y el contenido de ATP incluso en presencia de glucosa, aunque a bajas concentraciones de ésta (1mM) (Marosi et al., 2016).

En estas mismas condiciones de baja concentración de glucosa el D-BHB es capaz de promover la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, que a su vez activa la transcripción de *Bdnf* y aumenta los niveles celulares del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Marosi et al., 2016). Este aumento de BDNF es interpretado por los autores como una de las respuestas adaptativas que el BHB es capaz de promover ante condiciones de escasez de glucosa (Marosi et al., 2016). Otra respuesta adaptativa inducida por el BHB, que tiene un papel neuroprotector en condiciones de ausencia de glucosa, es la estimulación del flujo autofágico (Camberos-Luna et al., 2016). El flujo autofágico se refiere a la degradación de los componentes dañados de la célula que han sido capturados por los autofagosomas, lo cual requiere de su fusión con un lisosoma, ya que en este último se encuentran las enzimas proteolíticas (Green & Levine, 2014). En condiciones de estrés, puede ocurrir que se promueva la respuesta autofágica y ésta inicie de manera correcta, pero si no hay flujo autofágico, esto resulta en la acumulación de autofagosomas dentro de las células, lo que no ayuda a aliviar el estrés en el que se encuentran y que, incluso puede conducir a la muerte neuronal; por lo tanto, al inducir el flujo autofágico, el D-BHB induce la autofagia funcional en condiciones de estrés energético, lo que está relacionado con un aumento en la sobrevivencia de las neuronas (Camberos-Luna et al., 2016).

V. ANTECEDENTES

Los estudios de los cambios en la dinámica mitocondrial en respuesta a diversos estímulos comenzaron por realizarse en tipos celulares no neuronales; posteriormente, al comparar lo descrito en células no neuronales con la dinámica mitocondrial neuronal, se encontraron algunos aspectos que hacen a las neuronas distintas, tales como la morfología de sus mitocondrias o la velocidad a la que realizan la degradación mitocondrial. Las neuronas

poseen mitocondrias pequeñas y tubulares, lo que contrasta con las notables redes mitocondriales altamente interconectadas que se pueden observar en condiciones normales en células como los fibroblastos o los astrocitos (Uo et al., 2009; Wappler et al. 2013).

Para explicar las diferencias morfológicas entre las mitocondrias neuronales y las de los astrocitos y fibroblastos, Uo et al. (2009) compararon la abundancia de las principales proteínas que llevan a cabo los procesos de fisión y fusión y encontraron que las neuronas sobreexpresan la proteína de fisión DRP1. La presencia de mitocondrias tubulares, pequeñas y poco interconectadas sugiere que el balance de los procesos de fusión/fisión se inclina hacia la fisión en las neuronas y no así en astrocitos y fibroblastos (Uo et al., 2009). Se ha propuesto que las mitocondrias pequeñas son más fáciles de transportar a través de las proyecciones celulares, lo cual es de vital importancia en las células polarizadas como las neuronas, ya que el transporte mitocondrial es necesario para que se lleven a cabo los eventos de alta demanda energética en estos sitios, generalmente muy alejados del soma neuronal (Li et al., 2004). En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que DRP1 es necesaria para el transporte de las mitocondrias hacia las espinas dendríticas y los axones (Li et al., 2004; Berthet et al., 2014) y, además, favorece la formación de sinapsis (Li et al., 2004; Li et al., 2008).

Finalmente, la fisión mitocondrial es un proceso importante para la viabilidad neuronal, ya que el silenciamiento de *Drp1* mediante un RNA de interferencia en neuronas primarias aumenta la proporción de neuronas con señales de daño celular, tales como la condensación del núcleo y cuerpo celular hinchados y, por otro lado, disminuye la arborización de estas células; no obstante, el silenciamiento de *Drp1* no provoca cambios que indiquen daño celular al realizarse en células HeLa (Uo et al., 2009).

La importancia de DRP1 y su sobreexpresión en neuronas en condiciones basales ha hecho aún más interesante la pregunta de si la fisión mitocondrial aumenta en condiciones de estrés tal y como lo hace en otros tipos celulares (Yu et al., 2008). El aumento de la fisión mitocondrial en respuesta al estrés energético en neuronas ha sido demostrado en diversos modelos tales como OGD, MCAO y excitotoxicidad inducida por NMDA (Wappler et al., 2013; Martorell-Riera et al., 2014; Kumar et al., 2016; Guo et al., 2018) y, sorprendentemente, esto generalmente coincide con una disminución tanto de DRP1 total (Wappler et al., 2013; Martorell-Riera et al., 2014) como de su fosforilación en residuos de activación como la serina-616 (Wappler et al., 2013).

Los modelos de isquemia, ya sea *in vitro* (OGD) o *in vivo* (MCAO) se caracterizan por poseer una segunda fase de estrés celular asociada a la reperfusión de oxígeno y glucosa. Se ha observado que durante la reperfusión temprana las mitocondrias recuperan su morfología basal de manera transitoria; sin embargo, la reperfusión tardía provoca una segunda ola de fragmentación mitocondrial que culmina en la muerte neuronal (Martorell-Riera et al., 2014; Kumar et al., 2016). A diferencia de la fase de fragmentación inducida por la privación de oxígeno y nutrientes, la fisión mitocondrial inducida por la reperfusión no está asociada a un aumento en la translocación de DRP1 a la mitocondria, sino a la disminución de MFN2 (Martorell-Riera et al., 2014) y al procesamiento proteolítico de OPA1 (Kumar et al., 2016).

Aunque de manera clásica la dinámica mitocondrial ha hecho referencia únicamente a los eventos de fisión y fusión, es cada vez más común que ahora se incluya a otros procesos como la biogénesis, el transporte y la degradación mitocondrial, ya que su regulación es también fundamental para el correcto funcionamiento de estos organelos. En ese sentido, la mitofagia es un proceso particularmente interesante en neuronas, ya que parece regularse de manera

muy diferente a otros tipos celulares. Por un lado, Melser et al. (2013) observaron que cuando se estimula el metabolismo mitocondrial, se estimula también la mitofagia, lo que sugiere que las células con alta tasa metabólica mitocondrial poseen también una alta tasa de recambio de este organelo en condiciones basales, lo que contrastaría con otros tipos celulares cuya tasa metabólica mitocondrial es más baja.

Dado que las neuronas tienen un perfil metabólico de tipo oxidativo que ocurre principalmente en la mitocondria, los resultados de Melser et al. (2013) sugieren que la tasa de recambio mitocondrial basal podría ser alta en las neuronas; sin embargo, esto no se ha demostrado. Por otro lado, en condiciones de estrés se ha observado que la despolarización mitocondrial inducida por CCCP (un desacoplante mitocondrial artificial) no aumenta la colocalización de parkin con LC3 en cultivos primarios de neuronas, contrario a lo que ocurre en otros tipos celulares e incluso en líneas celulares que han sido diferenciadas a neuronas, por ejemplo, las líneas SH-SY5Y (humano) y PC6-3 (rata) (Van Laar et al., 2011), sugiriendo que el recambio de mitocondrias dañadas por mitofagia no es tan alto en las neuronas, aún cuando se ha perdido el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, no se ha descartado la posibilidad de que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial pueda inducir la mitofagia en las neuronas a través de la vía de BNIP3/NIX. También se ha observado que las neuronas inhiben la mitofagia durante la etapa de recuperación, una vez que ha ocurrido daño mitocondrial, por lo que se ha sugerido que en las neuronas la degradación mitocondrial es el último recurso ante un estrés energético (Puri et al., 2019; Evans et al., 2020).

La dinámica mitocondrial y el estado energético de las células están estrechamente relacionados, por lo que el papel de los cuerpos cetónicos como sustratos energéticos alternos a la glucosa y su acción antioxidante (en el caso del BHB) arroja la interrogante de si es, en

parte, a través de modular la dinámica mitocondrial, que los cuerpos cetónicos ejercen su efecto neuroprotector. Guo et al. (2018) describieron que tratar a células SH-SY5Y (derivadas de neuroblastoma humano) con BHB (10 mM) antes de someterlas a OGD, disminuye la fragmentación y translocación de DRP1 a la mitocondria inducidas por la OGD, por lo que promueve una morfología mitocondrial tubular y previene la disminución en la producción de ATP y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Por otro lado, Hasan-Olive et al. (2019) encontraron que el estrés oxidante inducido por H_2O_2 disminuye la abundancia de DRP1 y PGC1 α , lo cual es prevenido por el tratamiento con BHB (7mM) en neuronas hipocampales de rata. Por otro lado, aunque aún no se sabe si el BHB tiene un efecto sobre el proceso de mitofagia, se ha observado que su administración aumenta el flujo autofágico durante la fase de recuperación en un modelo de privación y reintroducción de glucosa (Camberos-Luna et al. 2016), lo que arroja la posibilidad de que también pueda estimular la degradación selectiva de mitocondrias.

Como se mencionó anteriormente, las líneas celulares parecen no replicar con exactitud las cualidades de la dinámica mitocondrial neuronal, por lo que el uso de modelos *in vivo* o el empleo de cultivos neuronales primarios son de vital importancia. Por otro lado, los estudios sobre dinámica mitocondrial generalmente se enfocan en un solo proceso, por lo que los datos disponibles se encuentran aislados, lo que dificulta su integración para describir lo que ocurre en un mismo tejido y más aún, un mismo tipo celular. Es por ello que este estudio pretende analizar el efecto de la privación y reintroducción (PG/RG) de glucosa sobre diversas proteínas que llevan a cabo los procesos de fisión, fusión y mitofagia en un cultivo primario de neuronas corticales y, posteriormente, determinar si el efecto neuroprotector del cuerpo cetónico BHB

está relacionado con algún cambio en uno de los procesos que conforman la dinámica mitocondrial.

VI. HIPÓTESIS

La privación de glucosa aumentará la fisión mitocondrial y la mitofagia, lo cual será prevenido por la administración de BHB, mientras que la reintroducción de glucosa permitirá la recuperación de la dinámica mitocondrial basal.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los efectos del BHB en la dinámica mitocondrial en un modelo *in vitro* de PG/RG en neuronas corticales.

Objetivos particulares

- Evaluar los niveles relativos de proteínas involucradas en la fisión, fusión y degradación mitocondrial a distintos tiempos de PG/RG en presencia y ausencia de BHB en neuronas corticales en cultivo.
- Evaluar los cambios en la activación de proteínas involucradas en la fisión, fusión y degradación mitocondrial (modificaciones post-traduccionales, translocación hacia la mitocondria, dimerización o procesamiento proteolítico) a distintos tiempos de privación y reintroducción de glucosa en presencia y ausencia de BHB en neuronas corticales en cultivo.
- Determinar los cambios en la morfología y el potencial de membrana mitocondrial en presencia y ausencia de BHB durante la PG/RG

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo primario de neuronas corticales de rata

Los cultivos primarios de neuronas corticales fueron realizados a partir de embriones de rata Wistar de 17-18 días de gestación obtenidos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. Todos los animales fueron manipulados siguiendo la NOM-062-ZOO-1999 y con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, LMT160-20) del Instituto de Fisiología Celular.

Se extrajo la corteza de 10-13 cerebros y el tejido fue disgregado de manera mecánica y enzimática mediante tripsina (0.10%). Posteriormente, se agregó solución con DNAsa (0.08%, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e inhibidor de tripsina (0.52%, Gibco, NY, USA) y se disgregaron mediante una malla. Las células fueron suspendidas en medio neurobasal (Gibco, NY, USA) suplementado con 1% de B27 (Gibco, NY, USA) y 1% B27 sin antioxidantes (Gibco, NY, USA), 0.5 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y 20 µg/ml de gentamicina (Gibco, NY, USA) y se sembraron a una densidad de 2.2×10^5 células/cm². Todas las cajas y cubreobjetos en los que fueron sembradas las células fueron previamente cubiertos con poly-l-lisina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (5 µg/ml) durante 4 h. Finalmente, a los 4 días *in vitro* (DIV) se agregaron 0.5 ml de medio neurobasal con citosina arabinósido (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) para inhibir la proliferación de células gliales. Las células se cultivaron durante 9 DIV a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂/95% aire.

2. Tratamientos

A los 9 DIV se retiró el medio neurobasal y se reemplazó por medio DMEM (Gibco, NY, USA) sin glucosa (fase de PG) para cada tiempo analizado. Se realizaron raspados celulares

de las cajas correspondientes a los tiempos de 30 min, 1 y 2 h PG. Por otro lado, se analizó la fase de RG. Para ello, se sometió a las células a 2 h PG; posteriormente, se retiró el medio DMEM y se añadió nuevamente el medio neurobasal en el que inicialmente fueron sembradas las células. Finalmente, se realizaron los raspados celulares de los tiempos correspondientes a 2, 4, 8, 16 y 20 h posteriores a la reintroducción de glucosa. Para el tratamiento con BHB (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), éste se agregó al medio DMEM al momento de realizar la PG a una concentración de 2, 5 o 10 mM.

3. Fraccionamiento mitocondrial

La obtención de la fracción celular enriquecida con mitocondrias fue obtenida mediante centrifugación utilizando el kit de aislamiento mitocondrial (Abcam, ab110170). Primero, las células cultivadas en cajas de 60 mm que fueron expuestas a PG/RG con o sin BHB, fueron lavadas con 1ml de PBS 0.1M e incubadas con 1 ml de buffer A más inhibidores de proteasas durante 10 min. Posteriormente, se rasparon delicadamente para preservar la integridad de las mitocondrias y fueron transferidas a un homogeneizador Dounce. Utilizando el pistilo B, se dieron 15 golpes a las células con cuidado de no hacer burbujas y luego se transfirieron a un tubo de 1.5 ml. Se centrifugaron a 1,000 g durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en otro tubo de igual capacidad (S1) y se resuspendió el pellet en buffer B; este último tubo fue etiquetado como “núcleo”. Se centrifugó S1 y *núcleo* a 1,000 g durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante de *núcleo*. Luego, se recuperó el sobrenadante de S1 en otro tubo (S2) y se centrifugó a 12,000g durante 15 min a 4°C. El pellet resultante de esta última centrifugación fue etiquetado como “mitocondria” y el sobrenadante fue etiquetado como “citoplasma”.

4. Inmunoblot

Las células fueron lavadas con PBS 0.1 M y tratadas con buffer de lisis con Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, desoxicolato de sodio 0.5 % y SDS 1 % y se agregaron 2 mg/ml de inhibidores de proteasas. Posteriormente, las muestras se sonicaron y se centrifugaron a 10 000 rpm a 4° C durante 4 min. La concentración de proteína de cada muestra fue determinada mediante el método de Lowry utilizando el kit “*DC Protein Assay*” (Bio-Rad, CA, USA) y 25µg de proteína fueron separados en geles de 10 % de acrilamida para OPA 1 y de 12 % para el resto de las proteínas mediante electroforesis. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore, Massachusetts, USA) y las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario (Apéndice 1) y, posteriormente, con anticuerpo secundario anti-rabbit, anti-mouse o anti-goat, según el caso (Apéndice 1). Finalmente, la inmunoreactividad fue detectada con sustrato HRP quimioluminiscente (Millipore, Massachusetts, USA) utilizando un fotodocumentador (LI-COR Biosciences) y, posteriormente, fue cuantificada mediante densitometría utilizando ImageJ. Los niveles de todas las proteínas analizadas se expresaron como abundancia relativa a la de β-actina (1:8000) (Chemicon, Millipore, Merck Group), incluyendo a aquellas que se muestran como cocientes (OPAS/OPAL, BNIP3 dímero/monómero y NIX dímero/monómero).

5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Las células cultivadas en placas de 12 pozos sembradas sobre cubreobjetos que fueron sometidas PG, así como la condición control, fueron tratadas con el fluorocromo JC-1 a una concentración final de 1 µM durante 20 min. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos de la caja de 12 pozos y se colocó en una placa con medio neurobasal (control) o DMEM sin glucosa (PG) y fueron observadas mediante microscopía confocal (Leica TCS SP5) utilizando un objetivo 63X. El potencial de membrana mitocondrial fue analizado mediante los cambios en

el cociente de la intensidad de fluorescencia obtenida a 590 nm respecto a la obtenida a 530 nm. Por lo menos tres imágenes independientes para cada condición experimental de tres experimentos independientes fueron procesadas mediante el software LAS X (Leica Microsystems). Se obtuvo la proyección máxima de 10 stacks de cada replicado de cada condición experimental y se eliminó el fondo utilizando los mismos parámetros para todas las imágenes de cada experimento independiente. Posteriormente, se obtuvieron los valores de fluorescencia mediante Image J generando un histograma de color.

6. Inmunoprecipitación

En cajas de 60 mm de diámetro, las células fueron sometidas a PG en presencia y ausencia de BHB 5mM durante 2 h. Posteriormente, se lavaron con PBS 0.1 M y se rasparon tras agregar 200 µl de buffer de lisis (Tris HCl 20 mM pH=7.5, EDTA 1mM, NaCl 20mM y tritón 1%) con inhibidor de proteasas (Roche diagnostics, Indianapolis, USA). Luego, se transfirieron a tubos de 0.6 ml y se sonicaron con un pulso de 3 segundos. Enseguida, se determinó la concentración de proteína de cada muestra mediante el método de Lowry y se transfirieron 200 µg de proteína a un volumen total de 100 µl de buffer "A" (NaH_2PO_4 0.02 M, NaCl 0.15 M, pH=8) a un tubo limpio; posteriormente, se agregó 1 µl de anticuerpo contra NIX a cada tubo y se dejaron en agitación a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se agregaron 20 µl de solución de Proteína-A sefarosa de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en un volumen total de 100 µl de buffer "A" y se dejaron en agitación a 4°C durante 2 h. Posteriormente, se centrifugaron 3 veces a 12,000 g durante 2 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo la muestra en 200 µl de buffer "A" después de cada centrifugación, excepto en la última, en cuyo caso, se agregaron 30 µl de buffer Laemmli 4X (0.5 M Tris HCl, pH 6.8, glicerol, SDS 10%, azul bromofenol 0.5% y

10% de β -mercaptoetanol. Finalmente, 25 μ g de proteína para el caso del *input* (procesadas como se describió en la sección 4) o 30 μ l de la inmunoprecipitación de NIX fueron separados en geles de 16% de acrilamida, transferidos a membranas de PVDF, incubadas con Anti-LC3 (1:5,000) /Anti-rabbit (1:5000) o Anti-NIX (1:3,500) /Anti-rabbit (1:3500) y reveladas con sustrato HRP quimioluminiscente utilizando un fotodocumentador.

7. Análisis estadístico

Los datos son presentados como la media \pm error estándar (n=3-5) y las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía, en la que $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo, seguido de la prueba post hoc de comparación múltiple de Fisher. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante GraphPad Prism 7.

IX. RESULTADOS

La PG disminuye el potencial de membrana mitocondrial y aumenta la translocación de DRP1 a la mitocondria

Los complejos de la cadena de transporte de electrones generan una diferencia tanto en la concentración de protones como en la carga entre ambos lados de la MIM; esto da lugar al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que es necesario para la producción de ATP (Zorova et al., 2018). En términos generales, dado que los complejos I, III y IV expulsan los protones hacia el espacio intermembranal, éste se carga positivamente, mientras que la matriz mitocondrial está cargada negativamente, lo cual favorece el importe de cationes (Zorova et al., 2018). Es precisamente esta última propiedad la que permite medir el potencial de membrana mitocondrial mediante el uso de fluoróforos catiónicos, tales como el JC1. Este compuesto emite fluorescencia verde (~530nm) cuando se encuentra a bajas concentraciones; sin embargo, una vez que entra a la mitocondria, el JC1 es capaz de formar agregados que

emiten fluorescencia roja (~590nm) (Sivandzade, Bhalerao & Cucullo, 2019). Dado que el JC1 sólo entra a la mitocondria cuando esta se encuentra cargada negativamente, los cambios en el cociente de fluorescencia roja respecto a la verde son considerados como un reflejo de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Sivandzade, Bhalerao & Cucullo, 2019).

Con el objetivo de relacionar a la PG/RG con la función mitocondrial, se analizó el $\Delta\Psi_m$ mediante el uso de JC1. Los resultados mostraron que 2 h de PG provocan una caída drástica en el potencial de membrana mitocondrial (pérdida de la fluorescencia roja respecto a la verde), que se recupera de manera parcial tras 30 min de RG, aunque a este tiempo el $\Delta\Psi_m$ sigue siendo significativamente menor al del control (Figura 4A, B). La disminución en el potencial de membrana se ha asociado con un aumento en la fisión mitocondrial (Ishihara et al., 2003). Para saber si la pérdida del $\Delta\Psi_m$ observada durante la PG coincide con la inducción de la fisión mitocondrial, se analizó la translocación de DRP1 hacia la mitocondria mediante un fraccionamiento mitocondrial (Figura 4C). Se observó que 2 h de PG producen un aumento en los niveles de DRP1 en la mitocondria respecto al control (Figura 4D). Estos resultados sugieren que la PG induce la fisión mitocondrial.

La PG/RG disminuye la fosforilación de DRP1 en la serina 616

Para explorar los cambios en la activación de DRP1 durante la PG/RG y relacionarlos con la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y la translocación de DRP1 a la mitocondria que se observó durante la fase de PG, se analizó la abundancia de DRP1 y su fosforilación en la serina 616 (pS616DRP1) en la fracción celular total en un curso temporal de PG/RG (Figura 5A, B). Los resultados muestran que la abundancia de DRP1 se mantiene constante durante toda la fase de PG; sin embargo, ésta disminuye ligera, pero significativamente durante las 2, 4 y 8 h de RG,

recuperándose al nivel control desde las 16 y hasta las 20 h de RG (Figura 5A). Por otro lado, la fosforilación de DRP1 en la serina 616, disminuye ligeramente tras 1 h de PG y luego cae drásticamente a las 2 h de PG; esta caída en pS616DRP1 se mantiene durante casi todos los tiempos de RG, y aunque parece recuperarse a las 16 h de RG, su abundancia sigue siendo significativamente más baja que la del control (Figura 5B).

La fosforilación en la serina 616 se ha asociado con la activación de DRP1, por lo que una disminución en los niveles de pS616DRP1 indicaría menos fisión mitocondrial. No obstante, tras 2 h de PG, una condición en la que el $\Delta\Psi_m$ es bajo y DRP1 se transloca a la mitocondria (Figura 5A, D), los niveles de pS616DRP1 son drásticamente más bajos que en el control, sugiriendo que esta fosforilación no está relacionada con la translocación de DRP1 a la mitocondria.

El BHB no evita la disminución de la fosforilación de DRP1 ni su translocación a la mitocondria inducidos por la PG

Se ha observado que la inhibición de la fisión mitocondrial puede disminuir el daño ocasionado por la isquemia cerebral (Ma et al., 2016). Con el objetivo de investigar si el papel neuroprotector del cuerpo cetónico D-BHB (Haces et al., 2008; Julio-Amilpas et al., 2015; Camberos-Luna et al., 2016) está relacionado con la disminución de la fisión mitocondrial durante la PG, se analizó la abundancia de DRP1 y de su fosforilación en la serina 616 en ausencia y presencia de tres dosis distintas de BHB (2, 5 y 10 mM) (Figura 6A, B).

Los resultados obtenidos mostraron que ninguna dosis de BHB es capaz de evitar la disminución en los niveles totales de DRP1 ni la disminución de su fosforilación en la serina 616 inducidos por la PG. Dada la inconsistencia entre la pérdida del $\Delta\Psi_m$, el aumento en la translocación de DRP1 a la mitocondria (que sugieren aumento en la fisión mitocondrial) y

la disminución de pS616DRP1 (que sugiere disminución en la activación de DRP1), se analizó el efecto del BHB en la fracción mitocondrial (Figura 6C) y se observó que la abundancia de DRP1 mitocondrial en presencia de BHB no es diferente significativamente a la del control, pero tampoco lo es la abundancia de DRP1 mitocondrial durante la PG en ausencia de BHB, por lo que se concluye que la administración de BHB no es capaz de prevenir la translocación de DRP1 a la mitocondria inducida por la PG.

La PG aumenta la fosforilación del receptor MFF mientras que la RG la disminuye

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos respecto a DRP1 y su fosforilación en la serina 616, se analizó el efecto de la PG/RG en la abundancia de su receptor, MFF y su fosforilación (Figura 7). Primero, se observó que la PG no afecta los niveles totales de MFF; sin embargo, tras 1 h de RG, la abundancia de MFF disminuye de manera significativa respecto al control, lo cual se mantiene hasta las 8 h de RG y parece recuperarse tras 16 h de RG (Figura 7A). Excepto por el tiempo de 1 h de RG, los tiempos de RG en los que los niveles de MFF son más bajos coinciden con aquellos en los que DRP1 disminuye de manera significativa (Figura 7A), por lo que es probable que, durante los tiempos de 2, 4 y 8 h de RG la tasa de fisión mitocondrial sea baja.

Por otro lado, se observó que la PG aumenta rápidamente la fosforilación de activación de MFF, aumentando de manera significativa con tan sólo 30 min de PG (Figura 7B). La fosforilación de MFF parece ser una respuesta rápida y transitoria, ya que disminuye nuevamente tras 1 h de PG, recuperando el nivel control a las 2 h de PG. Esto sugiere que la activación de MFF podría ser uno de los primeros eventos que inducen la fisión mitocondrial en condiciones de ausencia de glucosa. En contraste, la RG parece tener el efecto opuesto en la fosforilación de MFF, ya que ésta disminuye de manera significativa tras 30 min de RG y

se mantiene así hasta las 8 h de RG, recuperando el nivel control tras 16 h de RG, aunque parece disminuir nuevamente a las 20 h de RG (Figura 7B).

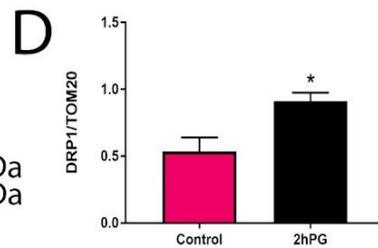
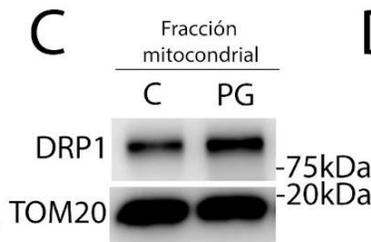
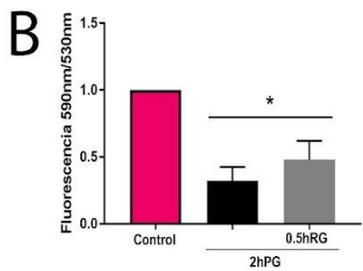
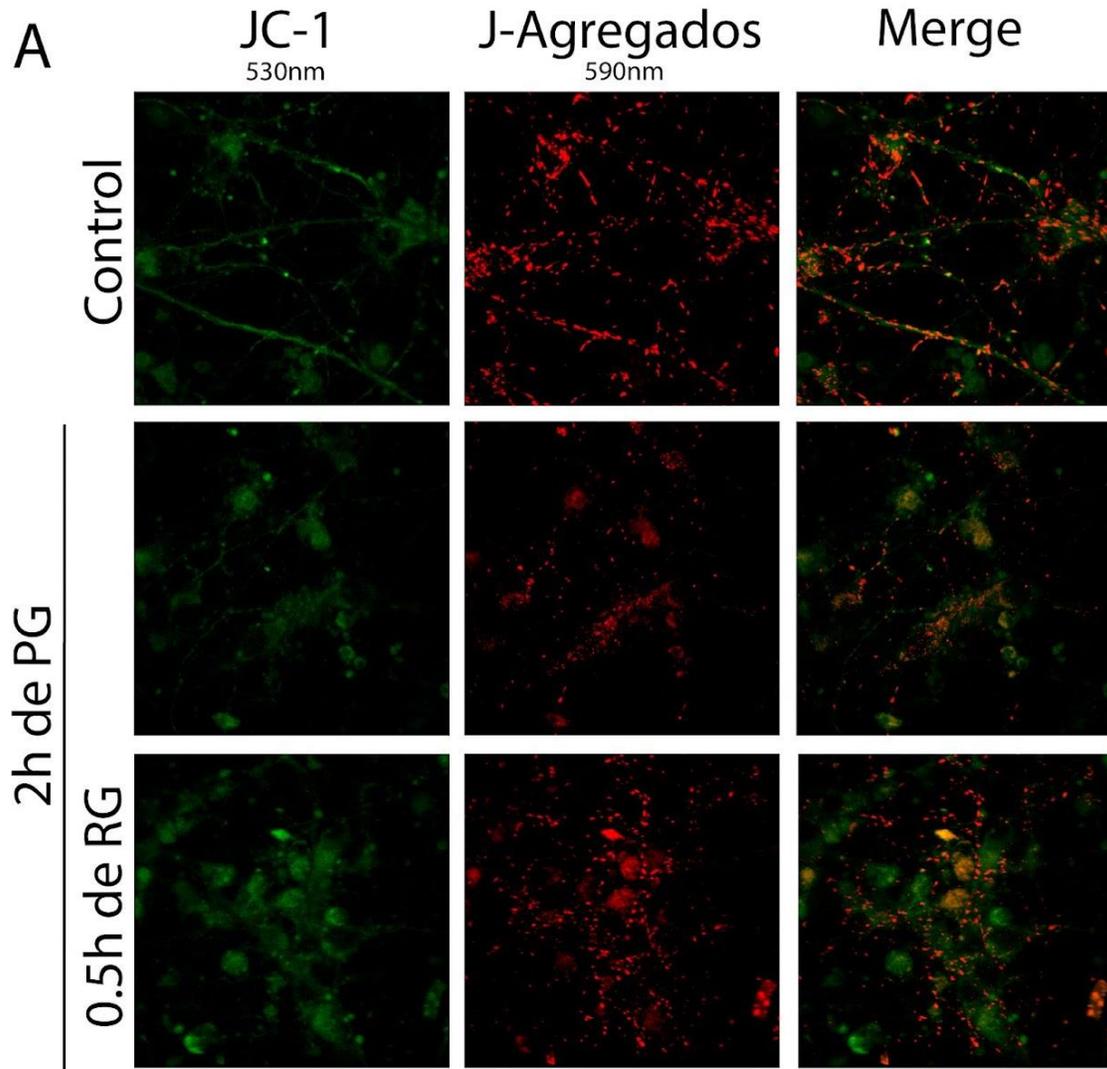


Figura 4. A, Imágenes representativas de la determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante JC1 obtenidas mediante microscopía confocal. B, Cuantificación del cociente de fluorescencia roja (590nm) /verde(530nm) n=3, *P<0.05. C, Inmunoblot de DRP1 en un fraccionamiento mitocondrial. D, Cuantificación de DRP1 en la fracción mitocondrial, abundancia relativa a TOM20, n=3, *P<0.05.

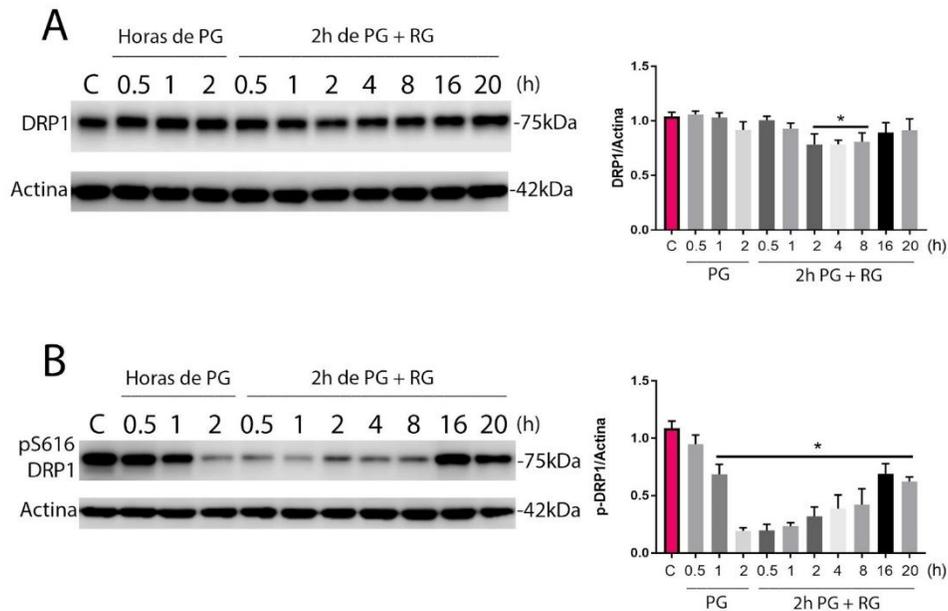


Figura 5. A, Inmunoblot de DRP1 en un lisado total de células (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a actina (derecha), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de DRP1 fosforilado en la serina 616 (izquierda) y su abundancia relativa (derecha), n=3, *P<0.05. Todos los tiempos de RG se realizaron tras someter a las células a 2 h de PG.

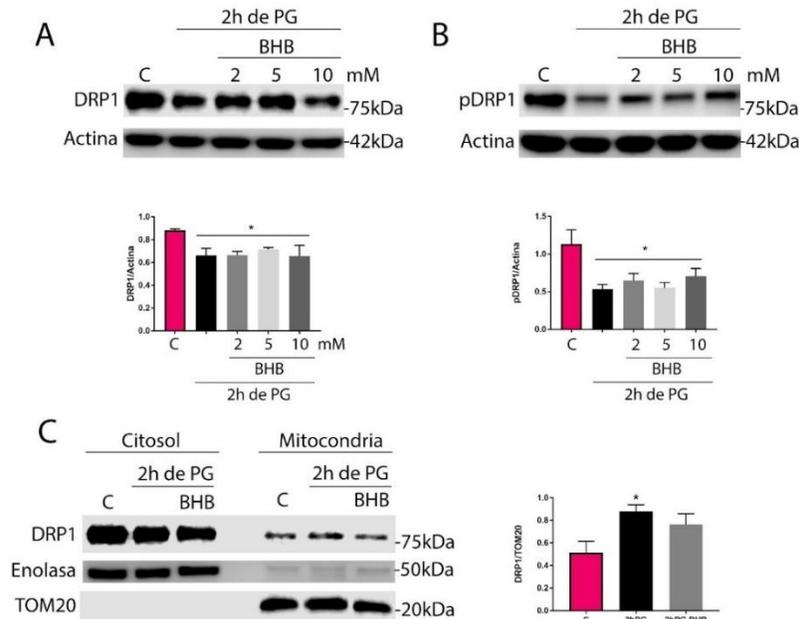


Figura 6. A, Inmunoblot de DRP1 total en un lisado total de células, en ausencia y presencia de distintas dosis (2, 5 y 10 mM) del cuerpo cetónico D-betahidroxibutirato (BHB) (arriba) y su abundancia relativa (abajo), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de DRP1 fosforilado en la serina 616 n=3, *P<0.05. C, Fraccionamiento mitocondrial que muestra los cambios en la localización subcelular de DRP1 (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a TOM20 únicamente en la mitocondria (derecha) en ausencia y presencia de BHB (5mM) n=3, *P<0.05. El BHB fue administrado en el medio de PG.

El BHB aumenta la abundancia de MFF en la mitocondria durante la PG

Tras observar que la administración de BHB no previene la translocación de DRP1 a la mitocondria, se investigó si este cuerpo cetónico podría ejercer algún efecto sobre la abundancia o fosforilación de MFF tras 2 h de PG (Figura 8A). Los resultados obtenidos mostraron que la administración de una dosis de 2 mM de BHB durante la privación de glucosa, produce un aumento en la abundancia de MFF respecto a la PG sin BHB (Figura 8A, B). Las otras dos dosis de BHB (5 y 10 mM) no modifican ni la abundancia ni fosforilación de MFF cuando se analizan en un lisado celular total. Por otro lado, al analizar la abundancia de MFF en un fraccionamiento mitocondrial, se observó que la dosis de 5mM de BHB

aumenta la abundancia de este receptor en la mitocondria respecto al control y también respecto a la PG sin BHB. No obstante, el análisis de la interacción MFF/DRP1 o de la longitud mitocondrial son necesarios para concluir si este aumento en la abundancia de MFF es suficiente para inducir la fisión mitocondrial.

La PG/RG no altera el procesamiento de OPA1 ni la abundancia de MFN2

La morfología mitocondrial es controlada simultáneamente por los procesos de fisión y fusión; por ello, se analizó también la abundancia de dos proteínas esenciales para la fusión mitocondrial, OPA1 y MFN2, en el modelo de PG/RG (Figura 9). La fusión de las membranas internas mitocondriales es realizada mediante la actividad de OPA1 “Long” (OPA1L), cuyo corte genera una variante soluble OPA1 “Short” (OPA1S) que es incapaz de fusionar membranas (Tilokani et al., 2018). El balance entre la proporción de OPA1S/L es una característica de condiciones basales, por lo que la alteración de este cociente altera también la tasa de fisión/fusión; así pues, cuando la fisión aumenta, se espera que el cociente de OPA1 S/L aumente y viceversa (MacVicar & Lange., 2016).

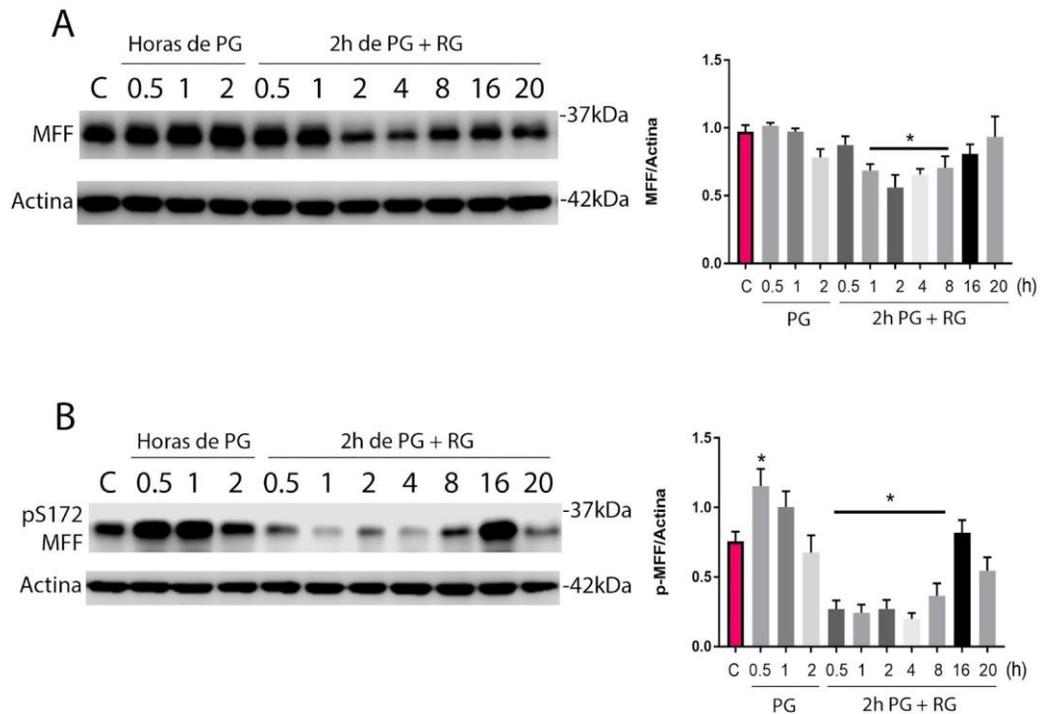


Figura 7. A, Inmunoblot de MF en un lisado total de células (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a actina (derecha), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de MF fosforilado en la serina 172 (izquierda) y su abundancia relativa (derecha), n=3, *P<0.05.

En la figura 9A se puede observar que tras 30 min y 1 h de PG, la abundancia de OPA1 (L) no cambia respecto a la del control; sin embargo, tras 2 h de PG, el nivel de OPA1 (L) aumenta. Este aumento se mantiene tras 1 h y hasta las 4 h de reintroducción de glucosa; posteriormente, la abundancia de OPA1 comienza a disminuir progresivamente a las 8 h de RG, hasta alcanzar un nivel significativamente más bajo que el control a las 20 h de RG. Dado que la relación de las variantes S/L de OPA1 permanece constante durante todo el curso temporal de PG/RG, es posible concluir que los cambios en la concentración de glucosa producen el mismo efecto en la abundancia tanto de OPA1-L como de OPA1-S.

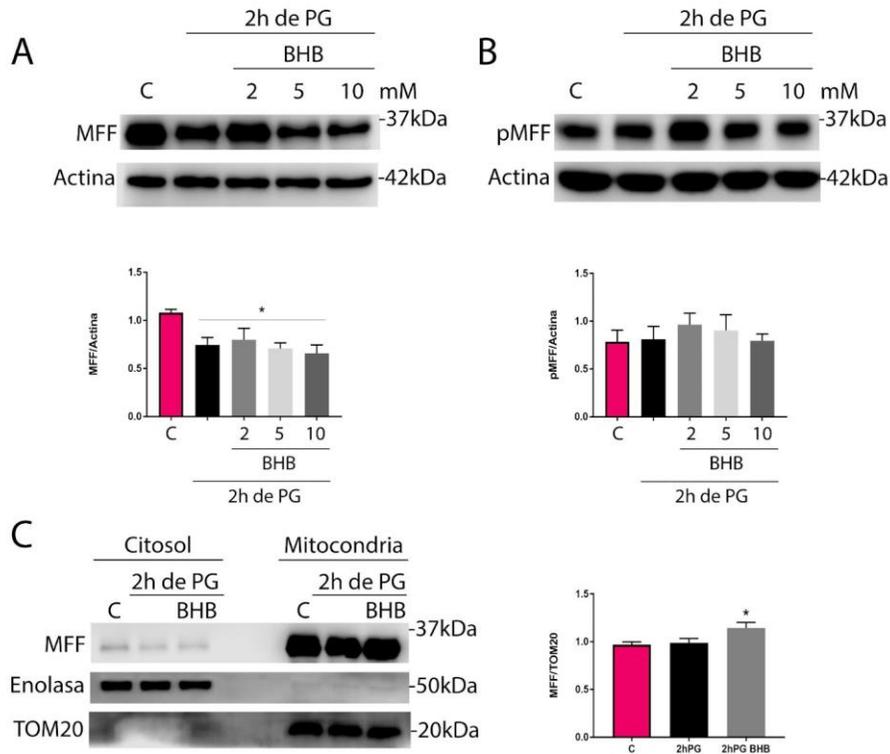


Figura 8. A, Inmunoblot de MFF, en ausencia y presencia de distintas dosis de BHB (arriba) y su abundancia relativa (abajo), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de MFF fosforilado en la serina 172 (arriba) y su abundancia relativa (abajo), n=3, *P<0.05. C, Análisis de la abundancia de MFF en un fraccionamiento mitocondrial (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a TOM20 (derecha) en ausencia y presencia de BHB (5mM), n=3, *P<0.05.

La fusión mitocondrial ocurre mediante dos pasos, la fusión de las MEM y de las MIM; este último, como se mencionó anteriormente, es llevado a cabo por OPA1-L. Por otro lado, la fusión de las MEM ocurre mediante dos proteínas, también con actividad de GTPasas: mitofusinas (MFNs) 1 y 2. Al analizar la abundancia de MFN2 durante la PG/RG se observó que los cambios en la concentración de glucosa no alteran los niveles de MFN2 que hay en las neuronas (Figura 9B).

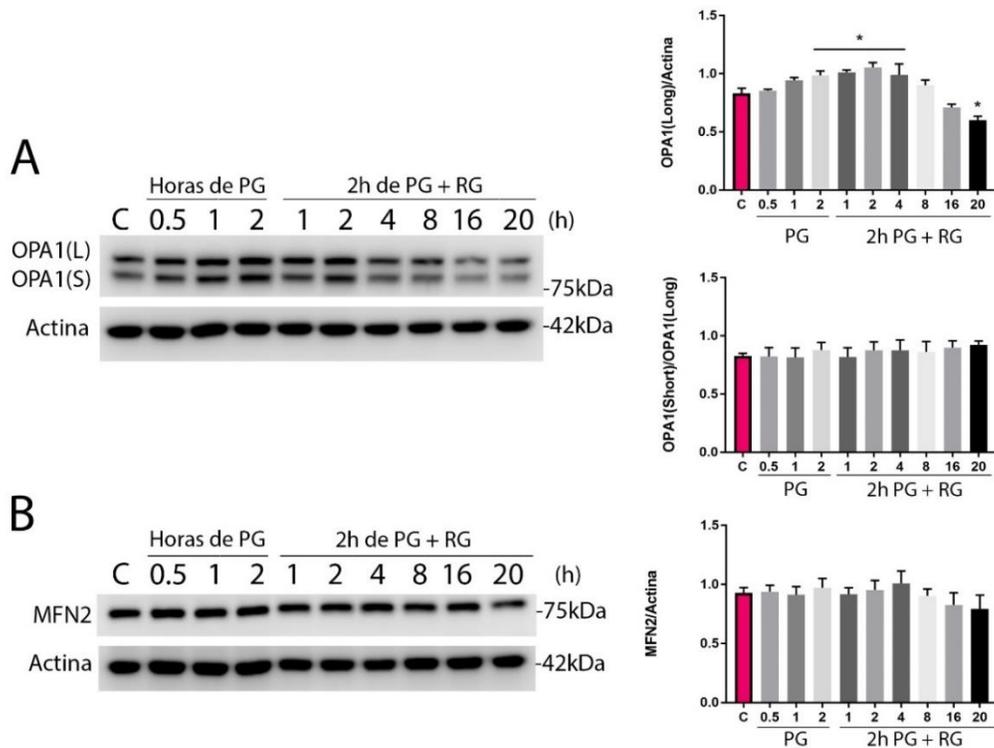


Figura 9. A, Inmunoblot de OPA1 en un lisado total de células (izquierda), cuantificación de su abundancia relativa a actina (derecha, arriba), relación de la abundancia OPA1(S)/OPA1(L) (derecha, abajo) $n=3$, $*P<0.05$. B, Inmunoblot de MFN2 (izquierda) y su abundancia relativa (derecha), $n=3$, $*P<0.05$.

Distintas dosis de BHB tienen distintos efectos sobre las proteínas de fusión mitocondrial durante la PG

Para investigar si el BHB es capaz de inducir la fusión mitocondrial en condiciones de PG, se analizó la abundancia de MFN2 y OPA1 en un lisado total (Figura 10A, B) y en un fraccionamiento mitocondrial (únicamente MFN2) (Figura 10C) en ausencia y presencia de distintas dosis de BHB. Como se observó anteriormente (Figura 9B), el nivel de MFN2 no cambia tras 2 h de PG respecto al control. No obstante, administrar 5mM de BHB aumenta la abundancia de MFN2 respecto al control y respecto a la condición de 2 h de PG sin BHB (Figura 10A). Sorprendentemente, este cambio es específico para esta dosis, ya que una dosis

más baja (2 mM) y una dosis más alta (10 mM) no tienen ningún efecto sobre la abundancia de MFN2 (Figura 10A).

Para confirmar que el aumento de MFN2 producido por la administración de 5 mM de BHB está relacionado con la fusión mitocondrial, se analizó su abundancia en un fraccionamiento mitocondrial (Figura 10C). Dado que no hay un aumento significativo en la abundancia de MFN2 mitocondrial ocasionado por la administración de BHB en la mitocondria, es probable que este cuerpo cetónico esté aumentando el nivel de MFN2 en el retículo endoplásmico. Esto es difícil de observar debido a que la mayoría de MFN2 se encuentra en la mitocondria.

Por otro lado, se analizó la abundancia de OPA1 en presencia y ausencia de BHB en condiciones de PG (Figura 10B). Anteriormente se mostró que la relación de las variantes S/L de OPA1 permanecen constantes a pesar del cambio en la concentración de glucosa (Figura 9A); sin embargo, en la gráfica de la Figura 10B se puede observar claramente que el tratamiento de 2h de PG aumenta la relación OPA1(S)/OPA1(L), el cual se mantiene a pesar de la administración de las dosis de BHB 2 mM y 5 mM. El aumento en OPA1S/L sólo es significativo respecto al control en el caso de la administración de BHB 5mM, probablemente por ser la condición con menor dispersión; no obstante, tanto la PG en ausencia de BHB, como la PG + BHB 2 mM muestran niveles muy similares de la relación OPA1 S/L a la condición de PG + BHB 5 mM (Figura 10B). Sorprendentemente, únicamente la dosis de BHB 10 mM parece evitar el aumento del corte de OPA1(L), manteniendo la relación S/L en niveles muy similares al control. Dado que únicamente OPA1(L) puede llevar a cabo la fusión de las MIM, un aumento en el cociente de OPA1 (S/L) disminuiría la tasa de fusión, lo que estaría ocurriendo durante la PG, mientras que la administración de BHB a una concentración de 10 mM podría estar previniendo el corte de OPA1 (Figura 10B).

Hasta el momento, los resultados obtenidos sugieren que la PG podría estar aumentando la fisión mitocondrial, lo que estaría asociado al aumento de la fosforilación de MFF a los 30 min de PG (Figura 6) y, a las 2 h de PG a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Figura 4), a la translocación de DRP1 a la mitocondria (Figura 4) y al corte de OPA1 (Figura 7). La administración de D-BHB, un cuerpo cetónico que ha mostrado tener efectos neuroprotectores en modelos de estrés energético, no es capaz de prevenir la translocación de DRP1 a la mitocondria (Figura 6) e incluso parece aumentar la abundancia de MFF (dosis 5mM) (Figura 8), por otro lado, aunque la dosis de 10 mM es capaz de prevenir el corte de OPA1 (Figura 10), no se confirmó que esto sea suficiente para evitar la inducción de la fisión mitocondrial. Durante la RG temprana (2-4 h) la abundancia de DRP1 y MFF es baja, mientras que la de OPA1 aumenta, lo que sugiere que durante la RG la tasa de fusión es mayor a la de fisión; sin embargo, durante la RG tardía (16-20 h), los niveles de DRP1 y MFF se recuperan y la abundancia de OPA1 disminuye; sin embargo, se requiere de un análisis morfológico para comprobar si esto provoca una segunda fase de fisión durante la RG tardía.

La PG induce la activación parcial de la mitofagia vía PINK1/Parkin y la RG la inhibe

La degradación selectiva de mitocondrias a través de la maquinaria autofágica es un proceso de control de calidad que permite mantener el balance en la cantidad de mitocondrias que hay en la célula. Hasta el momento, se ha observado que la mitofagia puede ocurrir mediante dos vías: PINK1/Parkin y BNIP3/NIX. Para determinar si la PG/RG provoca algún cambio en el proceso de mitofagia, primero se analizó la abundancia de PINK1/Parkin (Figura 11). PINK1 es constantemente degradada bajo condiciones normales, por lo que es posible identificar por lo menos dos versiones de esta proteína en las células: una de 64kDa que se localiza en la

MEM y favorece la progresión de la mitofagia y otra de 55kDa que será degradada vía proteosomal (Hamacher-Brady & Brady, 2016).

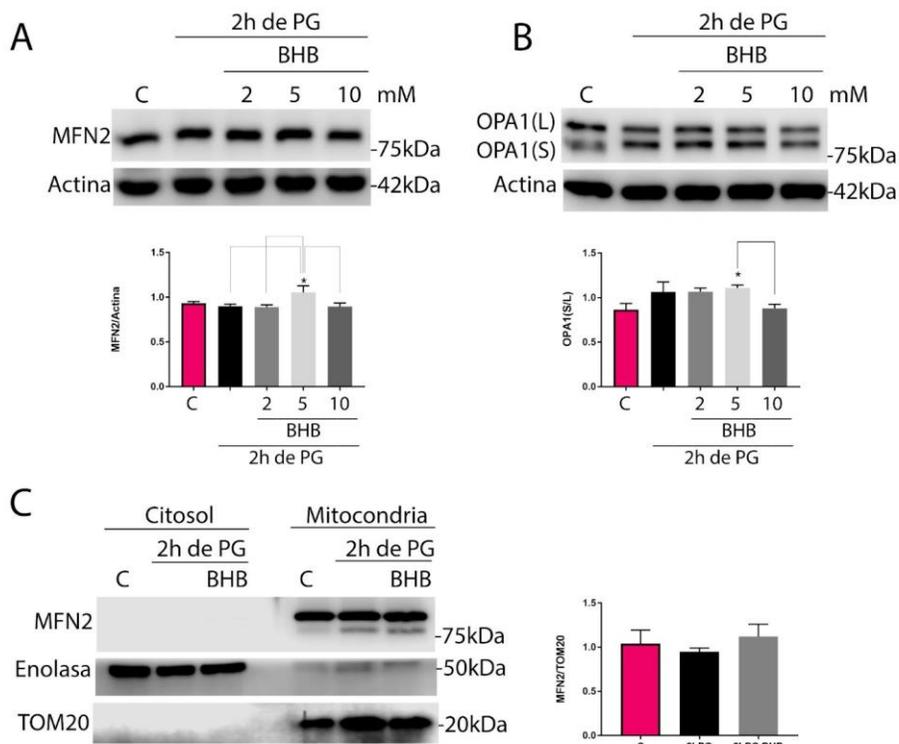


Figura 10. A, Inmunoblot de MFN2, en ausencia y presencia de distintas dosis de BHB (arriba) y su abundancia relativa (abajo), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de OPA1 (arriba) y relación de la abundancia de OPA1(S)/OPA(L) (abajo), n=3, *P<0.05. C, Análisis de la abundancia de MFN2 en un fraccionamiento mitocondrial (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a TOM20 (derecha) en ausencia y presencia de BHB (5mM), n=3, *P<0.05.

En la figura 11A se puede observar que en la condición control se detectó una sola banda, que corresponde con el peso de PINK1 escindida, es decir, que será degradada, lo que sugiere que el nivel de mitofagia basal mediante la vía PINK1/Parkin es bajo. Por otro lado, durante la PG se pudo detectar una banda adicional que corresponde con el peso de PINK1 que no ha sido cortada (64kDa), lo que sugiere que se encuentra en la MEM y es capaz de activar a

parkin; además, también se observa una gran cantidad de la banda que corresponde a PINK1 escindida (Figura 11A). Por el contrario, durante la RG ya no se observa la banda de PINK1 de 62kDa y la abundancia de PINK1 escindida también disminuye, lo sugiere que gran parte de ésta ha sido degradada (Figura 11A).

Por otro lado, al analizar la abundancia de parkin, se observó que, si bien la PG no aumenta los niveles de esta proteína de manera significativa, es posible observar una tendencia a aumentar (Figura 11B). Lo anterior sugiere que la PG induce la activación parcial de la mitofagia mediante la vía de PINK1/Parkin. En contraste, durante RG los niveles de ambas proteínas disminuyen de manera significativa. Aparentemente, la degradación de PINK1 es más rápida que la de parkin, ya que, desde 1 h de RG, la abundancia de PINK1 disminuye de manera significativa respecto al control, y se mantiene así hasta las 20 h de RG, mientras que la abundancia de parkin es significativamente más baja que la del control a partir de las 8 h de RG y hasta las 20 h de RG (Figura 11A). Lo anterior sugiere que la degradación mitocondrial mediante la vía de PINK1/parkin disminuye notablemente durante la fase de RG.

El BHB no modifica la vía de PINK1/Parkin en condiciones de PG

Con el objetivo de investigar si el BHB es capaz de inducir la mitofagia durante la PG, se analizó la abundancia de las proteínas PINK1/Parkin tras 2 h de PG (Figura 12). Los resultados mostraron que ni la PG ni la administración de BHB alteran la abundancia de PINK1 de 55kDa, que es aquella que será degradada vía proteosomal. Respecto a PINK1 64kDa, que se encuentra en la MEM, se pueden observar dos bandas difusas en la condición control, que se vuelven una sola banda, más densa, en las condiciones de 2 h de PG sin y con

BHB 5 mM, pero no así con la administración de las dosis de 2 y 10 mM de BHB (Figura 12A).

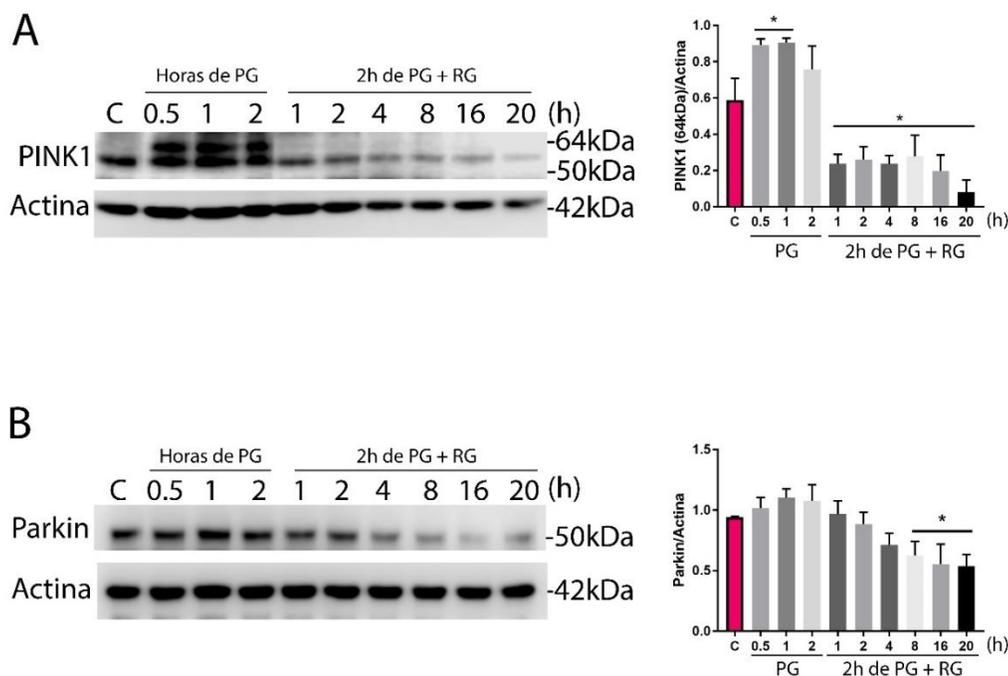


Figura 11. A, Inmunoblot de PINK1 en un lisado total de células (izquierda), cuantificación de su abundancia relativa a actina (derecha) n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de parkin (izquierda) y su abundancia relativa (derecha), n=3, *P<0.05.

La PG disminuye la dimerización de BNIP3, pero no la de NIX, mientras que la RG disminuye la abundancia de ambas proteínas

La mitofagia también puede ocurrir mediante la vía BNIP3/NIX, que son proteínas localizadas en la MEM, que poseen un dominio de reconocimiento para LC3, una proteína cuya forma lipídica, LC3-II forma parte de la membrana de los autofagosomas. Para investigar las diferencias en los cambios provocados por la PG/RG entre la vía de PINK1/parkin y BNIP3/NIX, también se analizó la abundancia de estas dos últimas proteínas (Figura 13). BNIP3 y NIX poseen un alto grado de homología, y aunque el patrón de abundancia que se observó en respuesta a la PG/RG es muy similar, es interesante que no sea idéntico. Primero, respecto a BNIP3, es claro que la PG provoca un aumento en la abundancia

del monómero; sin embargo, esta comienza a disminuir de manera progresiva tras 1 h de RG, hasta alcanzar un nivel significativamente más bajo que el control tras 20 h de RG (Figura 13A). Se ha sugerido que la homodimerización de BNIP3 (Hanna et al., 2012), por un lado y de NIX por otro (Marinković et al., 2021), favorece su interacción con LC3, por lo que un cociente del dímero/monómero podría determinar la proporción de la proteína que está involucrada en el proceso de mitofagia. Al analizar la proporción de dímero/monómero de BNIP3 se observó que esta disminuye durante la PG y, posteriormente, disminuye aún más durante la RG, aumentando nuevamente hasta las 20 h de RG (Figura 13A).

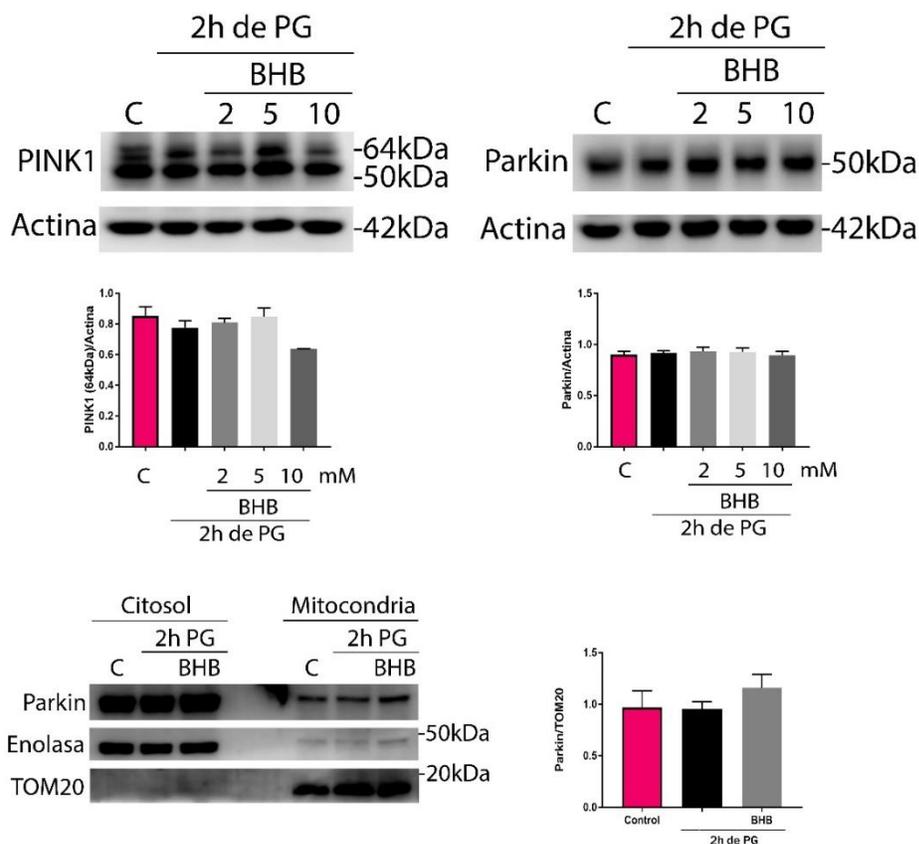


Figura 12. A, Inmunoblot de PINK1, en ausencia y presencia de distintas dosis de BHB (arriba) y su abundancia relativa (abajo), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de Parkin (arriba) y su abundancia relativa (abajo) en ausencia y presencia de distintas dosis de

BHB, n=3, *P<0.05. C, Análisis de la abundancia de Parkin en un fraccionamiento mitocondrial (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a TOM20 (derecha) en ausencia y presencia de BHB (5mM), n=3, *P<0.05.

Por otro lado, respecto a NIX, se observó que la PG no altera la abundancia del monómero, mientras que la RG lo disminuye significativamente desde 1 y hasta las 20 h (Figura 13B). Al realizar la proporción dímero/monómero de NIX se obtuvo que esta disminuye desde las 2 h de RG y disminuye aún más tras realizar la reintroducción de glucosa, de manera similar a lo que ocurre con BNIP3, sólo que, a diferencia de éste, la proporción dímero/monómero de NIX cae hasta valores cercanos a 0 desde las 8 y hasta las 20 h de RG (Figura 13B).

Todo lo anterior sugiere que la RG provoca una disminución significativa de las principales proteínas involucradas en las dos vías conocidas de mitofagia (Figuras 11 y 13), lo que podría reflejar la inhibición de la degradación selectiva de mitocondrias dañadas durante la etapa de recuperación en el modelo de PG/RG. Para descartar la posibilidad de que la disminución de las proteínas involucradas en la mitofagia sea debido a un aumento en la degradación de las mitocondrias, se analizó la abundancia de TOM20, una proteína del complejo de translocación de la MEM que se expresa de manera constitutiva (Figura 14) y se observó que la PG/RG no provoca cambios significativos en la abundancia de esta proteína. Esto sugiere que la disminución en la abundancia de las proteínas de mitofagia se debe a la inhibición de este proceso.

El BHB previene el aumento de la interacción NIX/LC3 inducida por la PG

Dado que se observó que la administración de BHB no modifica la vía de PINK1/parkin en condiciones de privación de glucosa, se investigó también la vía de BNIP3/NIX, para comprobar que el BHB no tuviera ningún efecto sobre la mitofagia. Al analizar la abundancia del monómero de BNIP3 (Figura 15A) tras 2 h de PG, ya no fue posible observar el aumento

que se observó en la Figura 13A; por el contrario, parece haber una ligera disminución en la abundancia del monómero de BNIP3 respecto al control. Por otro lado, la administración de una dosis de 2 mM de BHB no afecta la abundancia de BNIP3 ni su relación dímero/monómero respecto al control y aunque las dosis de 5 y 10 mM parecen provocar un ligero aumento en la relación dímero/monómero (que entre mayor sea indica más interacción con LC3 y más mitofagia) respecto a la condición de 2 h de PG sin BHB, este cambio no es significativo (Figura 13A). Los resultados obtenidos al analizar la abundancia de NIX muestran un patrón casi idéntico al de BNIP3; es decir, que 2 h de PG disminuyen la relación dímero/monómero respecto al control, la dosis de 2 mM no cambia la abundancia de NIX y las dosis de 5 y 10 mM aumentan la relación dímero/monómero de esta proteína; sin embargo, en este caso, este aumento sí es significativo (Figura 15B).

Con el objetivo de comprobar que el aumento de la relación dímero/monómero que provoca la administración de BHB corresponde a un aumento en la interacción de NIX con LC3, se realizó la inmunoprecipitación de NIX y se reveló LC3 tras 2 h de PG en ausencia y presencia de 5mM de BHB (Figura 15C). Sorprendentemente, los resultados mostraron lo opuesto a lo esperado basándose en la relación dímero/monómero observada en la Figura 14B, ya que se ha reportado que la dimerización de NIX favorece su interacción con LC3 y también el reclutamiento de la maquinaria autofágica a la mitocondria (Marinković et al., 2021). No obstante, en la figura 15C se puede observar claramente que en la condición control LC3 no interactúa con NIX, mientras que después de 2 h de PG, esta interacción aumenta considerablemente, lo cual es drásticamente disminuido al administrar BHB durante la PG. Este resultado sugiere que la administración de BHB es capaz de prevenir el aumento en la

interacción LC3/NIX provocado por la PG; no obstante, no es posible concluir si esto es suficiente para evitar la progresión de la mitofagia.

X. DISCUSIÓN

La PG disminuye el potencial de membrana mitocondrial y aumenta la translocación de DRP1 a la mitocondria

La morfología mitocondrial está íntimamente relacionada con las demandas energéticas de las células, así pues, mientras que la fusión mitocondrial requiere que el potencial de membrana mitocondrial esté intacto, la pérdida de éste promueve la fisión (Legros et al., 2002). Esto permite, por un lado, evitar que mitocondrias dañadas se fusionen con mitocondrias sanas y por otro, permite aislar fragmentos mitocondriales defectuosos que requieren ser reparados o degradados (Pernas & Scorrano., 2016). Durante la PG, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial está asociada con la entrada masiva de calcio a la mitocondria, lo que afecta la síntesis de ATP y los procesos dependientes de energía (Haces del Blanco & Massieu, 2005). En concordancia con lo anterior, los resultados observados en la Fig. 3 muestran que tras 2 h de privación de glucosa la pérdida del potencial de membrana correlaciona con la translocación de DRP1 a la mitocondria, es decir, sugieren que la PG induce la activación de la fisión mitocondrial.

Se ha reportado que la inhibición de DRP1 en un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (OGD) es capaz de prevenir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y aumentar la sobrevivencia (Guo et al., 2018), por lo que es probable que en el modelo de PG la fisión esté asociada al daño mitocondrial y que contribuya al estrés neuronal, a pesar de que DRP1 sea una proteína esencial para la sobrevivencia de las neuronas y que se sobreexpresa en este tipo celular (Uo et al., 2009).

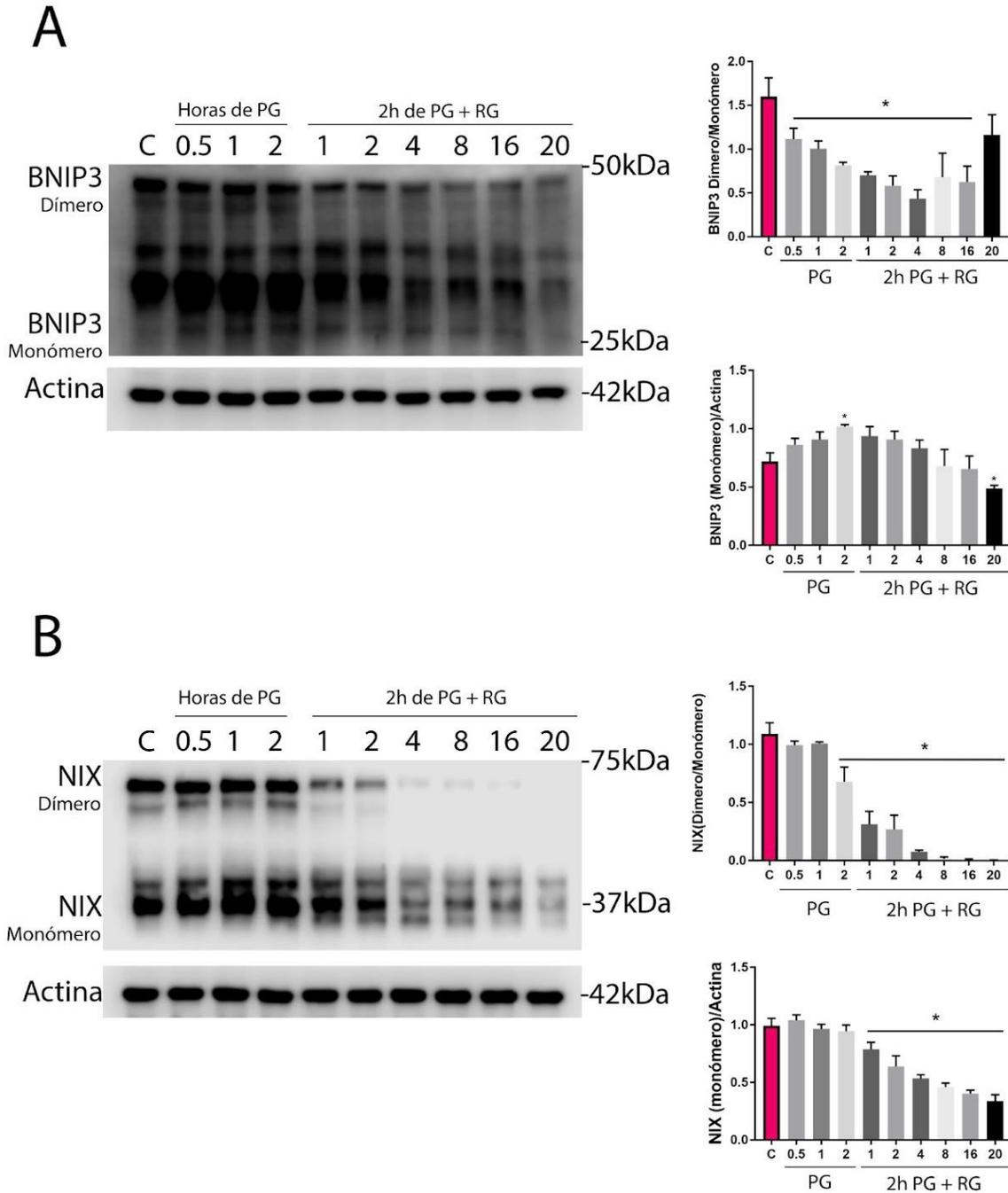


Figura 13. A, Inmunoblot de BNIP3 en un lisado total de células (arriba, izquierda), abundancia relativa del dímero respecto al monómero (derecha, arriba) y abundancia relativa del monómero (derecha, abajo), $n=3$, $*P<0.05$. B, Inmunoblot de BNIP3L/NIX (abajo, izquierda), abundancia relativa del dímero respecto al monómero (derecha, arriba) y abundancia relativa del monómero (derecha, abajo), $n=3$, $*P<0.05$.

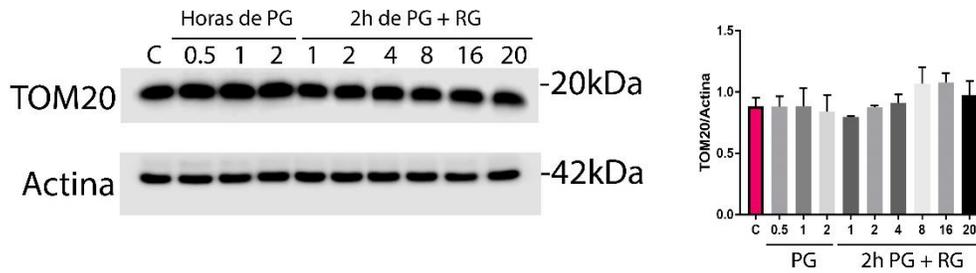


Figura 14. Inmunoblot de TOM20 en un lisado total de células (izquierda) y cuantificación de su abundancia relativa a actina (derecha) n=3.

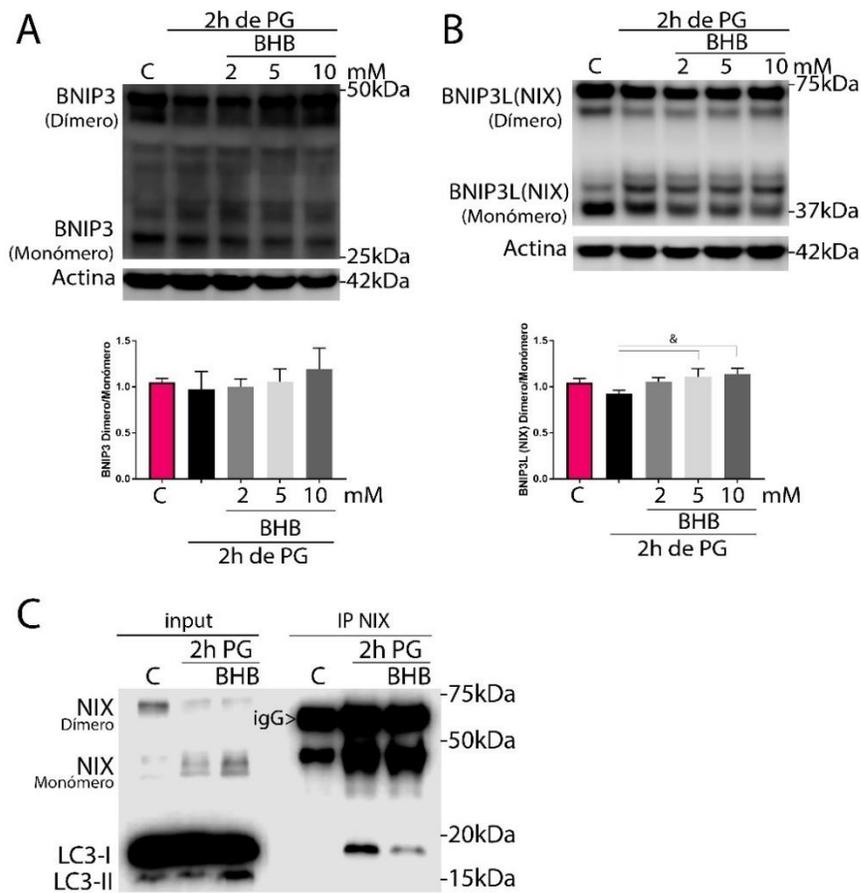


Figura 15. A, Inmunoblot de BNIP3, en ausencia y presencia de distintas dosis de BHB (arriba) y su abundancia relativa (abajo), n=3, *P<0.05. B, Inmunoblot de NIX (arriba) y su abundancia relativa (abajo) en ausencia y presencia de distintas dosis de

BHB, n=3, &P<0.05, diferencia respecto a 2h PG. C, Inmunoblot de LC3 en inmunoprecipitación de NIX en ausencia y presencia de BHB (5mM).

La PG/RG disminuye la fosforilación de DRP1 en la serina 616

DRP1 es una proteína cuya activación está altamente regulada por MPT (Pagliuso et al., 2018). Entre ellas, las más estudiadas son sus fosforilaciones en la serina 616 y en la serina 637, que se han asociado, clásicamente, con la activación y la inhibición de esta proteína, respectivamente (Chang and Blackstone, 2010). No obstante, en este trabajo se observó una disminución de la fosforilación de DRP1 en la serina 616, que indicaría menor activación de la proteína, al mismo tiempo que se observó el aumento de su translocación a la mitocondria, lo que sugiere que DRP1 no sólo está activa, sino que está participando en la constricción de la MEM (Fig. 5).

Este trabajo no es el primero en reportar este tipo de inconsistencias; de hecho, el aumento de la fisión mitocondrial a pesar de la disminución de DRP1 y/o pS616DRP1 ha sido observado en condiciones de privación de oxígeno y glucosa (Wappler et al., 2013) y de excitotoxicidad inducida por NMDA (Martorell-Riera et al., 2014) en neuronas corticales y tras la inducción de la apoptosis mediante estaurosporina en neuronas granulares de cerebelo (Cid-Castro & Morán., 2021). Esto ha sido interpretado, por un lado, como inducción de la fisión mitocondrial independiente de DRP1 (Wappler et al., 2013), mientras que Martorell-Riera et al. (2014) sugieren que la activación de DRP1 mediante nitrosilación y no mediante fosforilación es un evento clave durante la fragmentación inducida por la excitotoxicidad, ya que la inhibición de la óxido nítrico sintasa mediante 7-nitroindazol (7-Ni) es capaz de prevenir la fisión mitocondrial inducida por NMDA y no así la inhibición de calcineurina (fosfatasa que activa a DRP1 removiendo su fosforilación en la serina 637) ni la inhibición

de CaMK, cinasa que también fosforila a DRP1 en la serina 616. Adicionalmente, Cid-Castro & Morán (2021) demostraron que el cambio en la abundancia pS616DRP1 tras dos tratamientos pro-apoptóticos que inducen la fragmentación mitocondrial a través del aumento de ERO es estímulo-dependiente.

Para el caso específico de neuronas, Cho et al. (2014) reportaron que DRP1 es fosforilado en la serina 616 por CDK5, una cinasa dependiente de ciclina que sólo se expresa en este tipo celular. CDK5 fosforila a DRP1 principalmente durante los primeros 10 días *in vitro* (DIV) del cultivo neuronal, mientras que CDK5 y pS616DRP1 son poco abundantes en el cerebro murino adulto; sorprendentemente, la fosforilación de DRP1 mediante CDK5 está asociada con la inhibición de DRP1 y no con su activación (Cho et al., 2014). En concordancia con lo anterior, Wappler et al. (2013), reportaron un aumento en la fragmentación mitocondrial, pero una drástica disminución en la abundancia de pS616DRP1 en respuesta a la OGD, en cultivo primario de neuronas corticales durante los primeros 10 DIV, al igual que en el presente trabajo. Esto arroja la posibilidad de que, en neuronas, el mismo residuo de serina de DRP1 pueda ser fosforilado por distintas cinasas y tener efectos contrarios sobre la actividad de esta proteína.

Si se considera que en neuronas jóvenes la fosforilación de DRP1 en la serina 616 ocurre principalmente mediante CDK5, que inhibe a esta proteína, la disminución de pS616DRP1 tras 2 h de PG sería consistente con el aumento de su translocación a la mitocondria y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. No obstante, esto también significaría que la fisión mitocondrial se mantiene activa durante toda la etapa de reintroducción de glucosa temprana (30 min-8 h de RG), para disminuir parcialmente sólo tras 16 h de RG, lo que contrasta con los estudios que han reportado la recuperación transitoria de la morfología

mitocondrial control durante la etapa temprana de recuperación tras un evento de estrés como OGD (Kumar et al., 2016) o administración de NMDA (Martorell-Riera et al., 2014). Por ello, es necesario comparar la abundancia de pS616DRP1 con un análisis morfológico de las mitocondrias para determinar el efecto de esta fosforilación sobre la activación de la fisión mitocondrial en condiciones de PG/RG.

El BHB no evita la disminución de la fosforilación de DRP1 ni su translocación a la mitocondria inducidos por la PG

Dado que entre los mecanismos de neuroprotección de los cuerpos cetónicos se encuentran la disminución del estrés oxidante (Haces et al., 2008) y el mantenimiento de los niveles de ATP (Haces et al., 2008; Julio-Amilpas et al., 2015), la conexión entre estos sustratos energéticos y la mitocondria había sido establecida desde hace ya algunos años. No obstante, recientemente se ha abordado la pregunta de si estos efectos podrían estar relacionados con cambios en la dinámica mitocondrial. En el presente trabajo se encontró que la administración de BHB no tiene ningún efecto sobre la fosforilación y translocación de DRP1 a la mitocondria, lo que sugiere que no es capaz de prevenir la inducción de la fisión mitocondrial que podría estar ocurriendo durante la PG. Este resultado contrasta con un estudio realizado en células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y, en el que se encontró que tras 6 h de OGD y 1 h de reoxigenación/reintroducción de glucosa, el BHB es capaz de prevenir la translocación de DRP1 a la mitocondria y así inhibir la fisión mitocondrial (Guo et al., 2018).

Para descartar la posibilidad de que este cambio sólo ocurriera durante la fase de recuperación, en este estudio también se analizó el efecto de la administración de BHB durante la RG y tampoco se encontraron cambios (datos no mostrados). Así pues, las discrepancias entre los resultados de Guo et al. (2018) y los aquí presentados podrían deberse,

por un lado, a las diferencias en los modelos utilizados, o bien a diferencias entre los tipos celulares estudiados. Respecto al último punto, se ha observado que las neuronas poseen una dinámica mitocondrial única (Uo et al., 2009), que está íntimamente relacionada con su perfil metabólico de tipo oxidativo; sin embargo, las líneas celulares, aún habiendo sido diferenciadas a neuronas, parecen conservar el metabolismo glucolítico (Van Laar et al., 2011), lo que podría ocasionar diferencias importantes en la regulación de la dinámica mitocondrial. En concordancia con lo anterior, Newell et al. (2016) reportaron que la dieta cetogénica de una duración de 10-14 días provoca cambios en la abundancia de las proteínas que controlan la dinámica mitocondrial en el hígado, pero no así en el cerebro. Finalmente, respecto al efecto antioxidante del BHB, recientemente fue reportado que la administración de un agente antioxidante que mimetiza la actividad de la enzima superóxido dismutasa, no es capaz de disminuir la fragmentación mitocondrial inducida tanto por el tratamiento con estaurosporina como por la privación de potasio en neuronas granulares de cerebelo (Castro & Morán., 2021), lo que apoya la noción de que la dinámica mitocondrial es un conjunto de procesos altamente regulados que dependen de una gran cantidad de señales, por lo que la disminución de ERO podría no ser suficiente para prevenir el aumento en la fisión mitocondrial inducido por diversos agentes estresores.

La PG aumenta la fosforilación del receptor MFF mientras que la RG la disminuye

El factor de fisión mitocondrial, MFF es uno de los principales receptores de DRP1 e incluso se ha observado que la sobreexpresión de MFF es suficiente para inducir la fisión mitocondrial y viceversa (Otera et al., 2010). Es por ello, que cambios en la abundancia y/o activación de MFF podrían inducir la fisión mitocondrial tanto como la activación de DRP1. En este trabajo, se observó que la PG aumenta rápida y transitoriamente la fosforilación de

MFF (Fig. 7B). Aunque existe poca información sobre la fosforilación de MFF, se sabe, por un lado, que esta se ocurre a través de AMPK, una proteína cuya activación ocurre cuando hay un aumento en el cociente de AMP/ATP y, por otro lado, se ha observado que esta fosforilación está relacionada con un aumento en la fisión mitocondrial (Toyama et al., 2016). Tomando esto en cuenta, el aumento en la fosforilación de MFF que se observa tras 30 min de privación de glucosa sugiere que la producción de ATP disminuye rápidamente, lo que podría activar a AMPK, que, a su vez, podría fosforilar a MFF e iniciar la inducción de fisión mitocondrial, incluso antes de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y de la translocación de DRP1 hacia la mitocondria. Acorde con la activación de AMPK, una vez que se realiza la RG, la fosforilación de MFF disminuye drásticamente, lo que sugiere que el cociente de AMP/ATP disminuye y AMPK se inactiva. Aunque DRP1 posee más receptores además de MFF, se ha observado que la presencia de esta proteína es de gran importancia para que se lleve a cabo la fisión mitocondrial (Otera et al., 2010). Por ello, sería interesante determinar si la disminución en la abundancia y en la fosforilación de MFF que se observó durante la RG es suficiente para impedir que se lleve a cabo la fisión mitocondrial.

El BHB aumenta la abundancia de MFF en la mitocondria durante la PG

DRP1 y MFF participan no sólo en la fisión mitocondrial, sino también en la fisión peroxisomal (Gandre-Babbe & van der Bliet, 2008), por lo que analizar su presencia en el organelo de interés es vital para un mejor análisis. En el presente estudio se encontró que la administración de BHB durante la privación de glucosa aumenta de manera significativa la abundancia de MFF en la mitocondria, a pesar de que no modifica su fosforilación (Figura 8C). Aunque se sabe que AMPK regula la activación de MFF y favorece la fisión, aún se desconoce cómo se regula la abundancia de este receptor mediante la transcripción y

traducción de este gen y su respectiva proteína. No obstante, dado que el BHB parece modificar la abundancia de MFF exclusivamente en la mitocondria y no en la célula en general, una posible explicación es que este cuerpo cetónico pueda regular la eliminación de MFF y no su síntesis. Lee et al. (2019) observaron que, bajo condiciones normales, parkin ubiquitina a MFF y promueve su eliminación vía lisosomal de manera independiente al estrés mitocondrial, pero dependiente de PINK1, ya que la eliminación ya sea de PINK1 o parkin es suficiente para aumentar la abundancia de MFF. No obstante, al analizar el efecto del BHB sobre dichas proteínas, este no parece disminuir ninguna de ellas, lo que arroja la posibilidad de que, bajo condiciones de estrés como la PG, MFF sea eliminado mediante una vía independiente a PINK1/parkin. Acorde con lo anterior, se ha observado que la eliminación de MFF disminuye la translocación de parkin hacia la mitocondria tras la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida por CCCP (Gao et al., 2015).

La PG/RG no altera el procesamiento de OPA1 ni la abundancia de MFN2

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los cambios en dinámica mitocondrial que ocurren durante la privación y reintroducción de glucosa están dados por modificaciones en el proceso de fisión y no de fusión mitocondrial. Esto contrasta con los estudios en los que se ha descrito que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial induce el procesamiento proteolítico de OPA1 (Guillery et al., 2008), ya que en el presente trabajo la proporción de OPA1(S)/(L) permaneció constante incluso tras la pérdida del $\Delta\psi$ a las 2 h de PG (Figura 9B).

Por otro lado, la disminución de OPA1 y MFN2 se ha observado durante la fase de recuperación tras un período de OGD o administración de NMDA y se ha identificado como la causa de inducción de una fase de fisión mitocondrial excesiva que culmina en la muerte

neuronal (Wappler et al., 2013; Martorell-Riera et al., 2014). De manera consistente, nuestros resultados mostraron que la abundancia de OPA1 y MFN2 disminuyen tras 20 h de reintroducción de glucosa (aunque sólo significativamente en el caso de OPA1), un tiempo en el que los niveles de DRP1 y MFF se han recuperado casi hasta alcanzar niveles control (Figura 5 y 7). No obstante, el análisis de la morfología mitocondrial se requiere para determinar si, al igual que los modelos de OGD y excitotoxicidad por NMDA, la PG/RG consta de dos fases de fisión mitocondrial.

Distintas dosis de BHB tienen distintos efectos sobre las proteínas de fusión mitocondrial durante la PG

Se ha observado que durante la privación de nutrientes la fusión mitocondrial es capaz de mantener los niveles de ATP, prevenir la mitofagia y disminuir la muerte celular (Gomes et al., 2011); sin embargo, es bajo la privación de aminoácidos y no la privación de glucosa que se induce esta fusión mitocondrial adaptativa (Rambold et al., 2011). Es por ello que se evaluó si el efecto neuroprotector del cuerpo cetónico BHB podría estar relacionado con un aumento de la fusión mitocondrial, ya que esto podría preservar la integridad de las mitocondrias y disminuir la muerte neuronal. Los resultados obtenidos mostraron que la dosis de BHB utilizada determina su efecto sobre las proteínas de fusión mitocondrial, así pues, mientras que la dosis de 5 mM aumenta la abundancia de MFN2 (Figura 10A), la dosis de 10 mM previene el procesamiento proteolítico de OPA1 que podría impedir que esta lleve a cabo la fusión mitocondrial (Figura 10B). No obstante, el análisis de la morfología mitocondrial, así como la producción de ATP y de la sobrevivencia celular son necesarios para concluir que la administración de BHB es capaz de inducir la fusión mitocondrial y así proteger a las neuronas sometidas a PG.

Adicionalmente, es importante recalcar que el aumento de MFN2 ocasionado por la administración de BHB parece no estar relacionado con la fusión mitocondrial, ya que ocurre fuera de este organelo (Figura 10C). MFN2 también se localiza en el retículo endoplasmático (ER, por sus siglas en inglés) y, aunque se ha observado que está involucrada en el establecimiento de los contactos ER-mitocondria, aún no está claro si los mantiene o los previene (De Brito & Scorrano, 2008; Puri et al., 2019), por lo que es un aspecto interesante que requiere ser estudiado más a fondo.

La PG induce la activación parcial de la mitofagia vía PINK1/Parkin y la RG la inhibe

Actualmente, la mitofagia parece ser el aspecto más interesante de la dinámica mitocondrial neuronal, ya que se han observado diferencias importantes en este proceso respecto a otros tipos celulares. La primera de estas diferencias es que, mientras que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial induce la mitofagia mediante la vía de PINK1/Parkin en líneas celulares como SH-SY5Y, PC6-3 y HeLa, el tratamiento con CCCP no aumenta la colocalización de parkin con LC3 en neuronas (Van Laar, 2011). Nuestros resultados mostraron que la PG disminuye el corte de PINK1, lo que sugiere que esta se encuentra en la membrana externa mitocondrial y es capaz de fosforilar y activar a parkin (Figura 11A). No obstante, aunque la abundancia de parkin parece aumentar ligeramente en la célula, la estabilización de PINK1 no corresponde con un aumento en la translocación de parkin a la mitocondria (Figura 12C).

Estos resultados sugieren que la PG es capaz de activar parcialmente la mitofagia, pero es probable que haya un paso limitante que impide que esta se lleve a cabo. En concordancia con lo anterior, Evans & Holzbaur (2020) demostraron que la mitofagia en las neuronas se trata de un proceso lento, cuyos pasos están restringidos en el tiempo y que la degradación

mitocondrial puede ocurrir en horas o incluso días después de que estos organelos son secuestrados por los autofagosomas. Así pues, la gran cantidad de tiempo que se requiere para que las neuronas degraden las mitocondrias dañadas es la segunda diferencia respecto a la mitofagia en otros tipos celulares.

Estas diferencias han apoyado la idea de que la alta dependencia de las neuronas al metabolismo mitocondrial promueve que tras estímulos que dañan a las mitocondrias, estas sean reparadas y no degradadas, dejando a la mitofagia como último recurso para eliminar aquellas que no pudieron recuperarse (Puri et al., 2019; Doxaki & Palikaras, 2021). Los resultados obtenidos tras realizar la RG mostraron una drástica disminución en la abundancia de PINK1 y parkin, sugiriendo que ambas proteínas son degradadas, probablemente para inhibir la mitofagia y promover otros mecanismos de reparación mitocondrial.

El BHB no modifica la vía de PINK1/Parkin en condiciones de PG

Defectos en la mitofagia se han asociado con enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento, por lo que la búsqueda de moléculas capaces de inducir este proceso ha cobrado gran importancia en los últimos años (Doxaki & Palikaras, 2021). Al investigar si el BHB es capaz de promover la degradación mitocondrial tras 2 h de PG se observó que la dosis de 10mM disminuye la abundancia de PINK1 que no ha sido cortado, lo que sugiere que disminuye la activación de la mitofagia; sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre la abundancia de parkin (Figura 12). Dado que el procesamiento de PINK1 depende del potencial de membrana mitocondrial (Hamacher-Brady & Brady, 2016), es lógico pensar que si el BHB es capaz de mantener la funcionalidad de la mitocondria (Maalouf et al., 2007), esto disminuye la estabilización de PINK1 en la MEM y, como ocurre bajo condiciones

basales, esta sea degradada. Sin embargo, es necesario conocer el efecto del BHB sobre el potencial de membrana mitocondrial.

La PG disminuye la dimerización de BNIP3, pero no la de NIX, mientras que la RG disminuye la abundancia de ambas proteínas

Dada su relación con la enfermedad de Parkinson, los trabajos sobre mitofagia en neuronas se han centrado más en el estudio de la vía PINK1/Parkin; sin embargo, como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que la inducción de esta vía en condiciones de estrés es un fenómeno poco observado que ocurre en unas cuantas neuronas (Van Laar, 2011; Puri et al., 2019). Es por ello que el estudio de la vía BNIP3/NIX ha captado la atención en los últimos años; no obstante, los detalles sobre esta vía apenas comienzan a ser dilucidados (Puri et al., 2019; Doxaki & Palikaras, 2021). Los resultados obtenidos en el modelo PG/RG mostraron que la PG aumenta la abundancia del monómero de BNIP3, y disminuye la proporción del dímero respecto al monómero.

Dado que se ha sugerido que la dimerización de BNIP3 es necesaria para su interacción con LC3 (Hanna et al., 2012), esto indicaría que la PG disminuye la mitofagia mediante esta vía. Por otro lado, se ha observado que BNIP3 es la proteína que permite la estabilización de PINK1 en la membrana externa mitocondrial, interactuando con ella e impidiendo que esta sea cortada y, posteriormente, degradada (Zhang et al., 2016b). Esto apoya la idea de que la PG induce la activación de la vía PINK1/parkin, pero refuerza la noción de que PINK1 requiera más que encontrarse en la MEM para ser capaz de fosforilar y activar a parkin. Por otro lado, la PG no parece alterar la abundancia del monómero o la proporción dímero/monómero de NIX (Figura 13B).

Actualmente se han descrito dos mecanismos mediante los cuales las neuronas previenen la mitofagia tras un evento de estrés mitocondrial, uno es mantener los contactos de la mitocondria con el retículo endoplásmico (Puri et al., 2019) y otro es limitar la acidificación de los autofagosomas que contienen mitocondrias (Evans & Holzbaur, 2020). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la eliminación de las principales proteínas que llevan a cabo la mitofagia, también podría contribuir a la inhibición de este proceso, ya que, tras la RG, se observó una drástica disminución no sólo de PINK1/parkin, sino también de BNIP3/NIX. A pesar de que, tanto PINK1/parkin como BNIP3/NIX se degradan junto con las mitocondrias cuando ocurre la mitofagia, el análisis de la abundancia de una proteína mitocondrial constitutiva, TOM20, mostró que ésta no disminuye durante la RG, lo que sugiere que la degradación de las proteínas de mitofagia podría ser selectiva y no una consecuencia de la degradación mitocondrial. Adicionalmente, los niveles de las proteínas de fisión y fusión mitocondrial (DRP1, MFF y MFN2) no son significativamente menores a los del control durante la RG tardía, lo que apoya la noción de que son sólo las proteínas involucradas en la mitofagia las que se están degradando. Sorprendentemente, los niveles de PINK1, parkin, BNIP3 y NIX permanecen bajos incluso tras 20 h de reintroducción de glucosa, por lo que sería interesante investigar si la inhibición de la mitofagia es un proceso irreversible o si es posible que ocurra tras uno o varios días después del evento de estrés.

El BHB previene el aumento de la interacción NIX/LC3 inducida por la PG

Finalmente, para descartar que el BHB pudiera tener algún efecto sobre la dinámica mitocondrial en condiciones de PG, se analizó la proporción del dímero/monómero tanto de BNIP3 como de NIX en presencia y ausencia de BHB y se encontró que las dosis de 5 y 10 mM aumentan esta proporción respecto a la condición de 2 h de PG sin BHB, mientras que

no alteran la proporción de dímero/monómero de BNIP3. Tomando en cuenta lo reportado por Marinković et al. (2021), esto significaría que el BHB favorece la interacción de NIX con LC3 y, por lo tanto, la mitofagia. Sin embargo, tras realizar una inmunoprecipitación de LC3 y revelar NIX, se puede observar que en condiciones normales LC3 y NIX no interactúan, mientras que esta interacción aumenta notablemente tras 2 h de PG, interacción que disminuye al tratar a las neuronas con BHB.

Aunque la inconsistencia entre la abundancia del dímero de NIX y su interacción con LC3 es un resultado inesperado, es importante señalar que, además de la dimerización de NIX, se ha demostrado que la fosforilación también influye de manera importante su interacción con LC3 (Rogov et al., 2017). De hecho, mientras que la mutación de las serinas 34 y 35 adyacentes al LIR de NIX por alaninas (que no pueden ser fosforiladas) elimina por completo la interacción NIX/LC3 (Rogov et al., 2017), la mutación de las glicinas 204 y 208 del dominio transmembranal de NIX, que son necesarias para su dimerización disminuye de manera importante su interacción con LC3 (Marinković et al., 2021). Estos resultados indican que, si bien la dimerización de NIX favorece, de manera significativa, su interacción con LC3, no es un requisito para que se lleve a cabo esta interacción y, por lo tanto, para la progresión de la mitofagia. Aunque aún se desconoce la cinasa responsable de la fosforilación de NIX que favorece su interacción con LC3, una vez que se identifique, sería interesante investigar si dicha cinasa se activa durante el estrés energético y si el BHB es capaz de disminuir su activación y, por lo tanto, la interacción NIX/LC3.

XI. CONCLUSIÓN

La PG induce la translocación de DRP1 a la mitocondria y aumenta la fosforilación de MFF, lo que sugiere la activación de la fisión mitocondrial; adicionalmente, la PG incrementa los

niveles de PINK1, pero no aumenta la translocación de parkin a la mitocondria, sugiriendo la activación parcial de la mitofagia. Por otro lado, la RG disminuye la abundancia de proteínas de la fusión mitocondrial e inhibe la degradación mitocondrial mediante las vías PINK1-parkin y BINP3/NIX. El D-BHB no provoca cambios significativos en la abundancia de las proteínas de fisión y fusión durante la PG, por lo que se concluye que su efecto neuroprotector no está mediado a través de la modulación de los procesos de fisión y fusión mitocondrial. Por otro lado, la administración de D-BHB durante la PG disminuye la interacción del receptor mitocondrial NIX con la proteína LC3, por lo que podría tener algún efecto sobre la mitofagia; sin embargo, esto requiere mayor investigación para elucidar el mecanismo a través del cual esto podría estar sucediendo.

XII. PERSPECTIVAS

- Determinar si la inhibición de DRP1 previene la disminución del potencial de membrana mitocondrial durante la PG.
- Analizar la translocación de DRP1 a la mitocondria durante la fase de RG y relacionarlo con su fosforilación en la serina 616.
- Observar la morfología mitocondrial mediante mitotracker green para confirmar que la PG induce la fisión y, por otro lado, determinar si la RG permite la recuperación de la morfología mitocondrial basal.
- Determinar los niveles de mitofagia mediante el plásmido mitokeima durante la PG, para confirmar que la iniciación de la mitofagia culmina en la eliminación de las mitocondrias dañadas y si el BHB es capaz de reducir este proceso. Por otro lado, durante la RG, confirmar que no ocurra mitofagia.

XIII. REFERENCIAS

- Achanta, L. B., & Rae, C. D. (2017). β -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. *Neurochemical Research*, 42(1), 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2099-2>
- Amaral, A. I. (2013). Effects of hypoglycaemia on neuronal metabolism in the adult brain: Role of alternative substrates to glucose. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(4), 621–634. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9553-3>
- American Diabetes Association. (2005). Defining and reporting hypoglycemia in diabetes: a report from the American Diabetes Association Workgroup on Hypoglycemia. *Diabetes Care*, 28(5), 1245–1249
- Anand, R., Wai, T., Baker, M. J., Kladt, N., Schauss, A. C., Rugarli, E., & Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *Journal of Cell Biology*, 204(6), 919–929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308006>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., ... & Schreier, P. H. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465.
- Baker, M. J., Lampe, P. A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T., & Langer, T. (2014). Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO Journal*, 33(6), 578–593. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386474>
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7>
- Bélangier, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, 14(6), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Berthet, A., Margolis, E. B., Zhang, J., Hsieh, I., Zhang, J., Hnasko, T. S., ... & Nakamura, K. (2014). Loss of mitochondrial fission depletes axonal mitochondria in midbrain dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(43), 14304–14317.
- Bolaños, J. P., Almeida, A., & Moncada, S. (2010). Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
- Bouzier-Sore, A. K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J. M., & Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: A comparative NMR study. *European Journal of Neuroscience*, 24(6), 1687–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>
- Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P. F., & Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nature reviews neurology*, 11(1), 11.
- Camberos-Luna, L., & Massieu, L. (2020). Therapeutic strategies for ketosis induction and their potential efficacy for the treatment of acute brain injury and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 104614.
- Camberos-Luna, L., Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., & Massieu, L. (2016). The ketone body, β -hydroxybutyrate stimulates the autophagic flux and prevents neuronal death induced by glucose deprivation in cortical cultured neurons. *Neurochemical research*, 41(3), 600–609.

- Chang, C. R., & Blackstone, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1201, 34.
- Cho, B., Cho, H. M., Kim, H. J., Jeong, J., Park, S. K., Hwang, E. M., ... & Sun, W. (2014). CDK5-dependent inhibitory phosphorylation of Drp1 during neuronal maturation. *Experimental & molecular medicine*, 46(7), e105-e105
- Cid-Castro, C., & Morán, J. (2021). Differential ROS-Mediated Phosphorylation of Drp1 in Mitochondrial Fragmentation Induced by Distinct Cell Death Conditions in Cerebellar Granule Neurons. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021.
- Cryer, P. E. (2007). Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *The Journal of clinical investigation*, 117(4), 868-870.
- Custódio, T. F., Paulsen, P. A., & Pedersen, B. P. (2020). Structural comparative analysis of GLUT1 and GLUT3 reveal role of SP motif in transport regulation. *bioRxiv*.
- De Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605-610.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(11), 870-879.
- Dorn, G. W. (2019). Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annual Review of Physiology*, 81(1), 1–17. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114358>
- Doxaki, C., & Palikaras, K. (2021). Neuronal Mitophagy: Friend or Foe? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1864.
- Eisner, V., Picard, M., & Hajnóczky, G. (2018). Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nature cell biology*, 20(7), 755-765
- Escobar-Henriques, M. (2014). Mitofusins: ubiquitylation promotes fusion. *Cell research*, 24(4), 387.
- Evans, C. S., & Holzbaur, E. L. (2020). Degradation of engulfed mitochondria is rate-limiting in Optineurin-mediated mitophagy in neurons. *Elife*, 9, e50260.
- Fanelli, C., Pampanelli, S., Epifano, L., Rambotti, A. M., Ciofetta, M., Modarelli, F., ... Bolli, G. B. (1994). Relative roles of insulin and hypoglycaemia on induction of neuroendocrine responses to, symptoms of, and deterioration of cognitive function in hypoglycaemia in male and female humans. *Diabetologia*, 37(8), 797–807. <https://doi.org/10.1007/BF00404337>
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochemical Journal*, 443(1), 3–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20111943>
- Frey, T. G., Renken, C. W., & Perkins, G. A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1555(1–3), 196–203. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00278-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00278-5)
- Gandre-Babbe, S., & van der Blik, A. M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 19(6), 2402-2412.
- Gao, J., Qin, S., & Jiang, C. A. (2015). Parkin-induced ubiquitination of Mff promotes its association with p62/SQSTM1 during mitochondrial depolarization. *Acta Biochim Biophys Sin*, 47(7), 522-529
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.

- Gomes, L. C., Di Benedetto, G., & Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, *13*(5), 589-598.
- Green, D. R., & Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*, *157*(1), 65-75
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombès, A., ... & Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biology of the Cell*, *100*(5), 315-325.
- Guo, M., Wang, X., Zhao, Y., Yang, Q., Ding, H., Dong, Q., ... Cui, M. (2018). Ketogenic diet improves brain ischemic tolerance and inhibits NLRP3 inflammasome activation by preventing Drp1-mediated mitochondrial fission and endoplasmic reticulum stress. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00086>
- Haces Del Blanco, M. L., & Massieu-Trigo, L. (2005). Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Archivos de Neurociencias*, *10*(2), 83–91.
- Haces, M. L., Hernández-Fonseca, K., Medina-Campos, O. N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., & Massieu, L. (2008). Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Experimental neurology*, *211*(1), 85-96.
- Halestrap, A. P. (2013). Monocarboxylic Acid Transport. *Comprehensive Physiology*, *3*(4), 1611–1643. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130008>
- Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2016). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and molecular life sciences*, *73*(4), 775-795.
- Hanna, R. A., Quinsay, M. N., Orogo, A. M., Giang, K., Rikka, S., & Gustafsson, Å. B. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(23), 19094-19104.
- Hasan-Olive, M. M., Lauritzen, K. H., Ali, M., Rasmussen, L. J., Storm-Mathisen, J., & Bergersen, L. H. (2019). A ketogenic diet improves mitochondrial biogenesis and bioenergetics via the PGC1 α -SIRT3-UCP2 axis. *Neurochemical research*, *44*(1), 22-37.
- Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., & Van Der Bliek, A. M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, *187*(7), 959–966. <https://doi.org/10.1083/jcb.200906083>
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1. *Nature cell biology*, *11*(6), 747-752.
- Hoppins, S. (2014). The regulation of mitochondrial dynamics. *Current opinion in cell biology*, *29*, 46-52.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., & Mihara, K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *301*(4), 891-898.

- 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(5), 851–860. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.1>
- Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T. J., & Ryan, M. T. (2021). Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*, 590(7844), 57-66.
- Kubli, D. A., & Gustafsson, Å. B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circulation research*, 111(9), 1208-1221.
- Kumar, R., Bukowski, M. J., Wider, J. M., Reynolds, C. A., Calo, L., Lepore, B., ... & Sanderson, T. H. (2016). Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 76, 68-75.
- Leboucher, G. P., Tsai, Y. C., Yang, M., Shaw, K. C., Zhou, M., Veenstra, T. D., & Weissman, A. M. (2012). Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Molecular cell*, 47(4), 547-557.
- Lee, L., Seager, R., Nakamura, Y., Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2019). Parkin-mediated ubiquitination contributes to the constitutive turnover of mitochondrial fission factor (Mff). *Plos one*, 14(5), e0213116.
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., & Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4343-4354.
- Li, H., Chen, Y., Jones, A. F., Sanger, R. H., Collis, L. P., Flannery, R., ... & Jonas, E. A. (2008). Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2169-2174.
- Li, Z., Okamoto, K. I., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), 873-887.
- Liu, Y., Song, X. D., Liu, W., Zhang, T. Y., & Zuo, J. (2003). Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(1), 49–56. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00202.x>
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 24(5), 659-667.
- Ma, X., Xie, Y., Chen, Y., Han, B., Li, J., & Qi, S. (2016). Post-ischemia mdivi-1 treatment protects against ischemia/reperfusion-induced brain injury in a rat model. *Neuroscience letters*, 632, 23-32.
- Maalouf, M., Rho, J. M., & Mattson, M. P. (2009). The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain research reviews*, 59(2), 293-315.
- Maalouf, M., Sullivan, P. G., Davis, L., Kim, D. Y., & Rho, J. M. (2007). Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*, 145(1), 256-264.
- MacVicar, T., & Langer, T. (2016). OPA1 processing in cell death and disease—the long and short of it. *Journal of cell science*, 129(12), 2297-2306.

- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron*, 86(4), 883–901. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>
- Marinković, M., Šprung, M., & Novak, I. (2021). Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery. *Autophagy*, 17(5), 1232-1243.
- Marosi, K., Kim, S. W., Moehl, K., Scheibye-Knudsen, M., Cheng, A., Cutler, R., ... Mattson, M. P. (2016). 3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 139(5), 769–781. <https://doi.org/10.1111/jnc.13868>
- Martorell-Riera, A., Segarra-Mondejar, M., Muñoz, J. P., Ginet, V., Olloquequi, J., Pérez-Clausell, J., ... & Soriano, F. X. (2014). Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death. *The EMBO journal*, 33(20), 2388-2407.
- McKenna, M. C., Diemel, G. A., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S., & Schousboe, A. (2012). Energy Metabolism of the Brain. *Basic Neurochemistry*, 200–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00011-0>
- McLelland, G. L., Soubannier, V., Chen, C. X., McBride, H. M., & Fon, E. A. (2014). Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *The EMBO journal*, e201385902.
- McWilliams, T. G., & Muqit, M. M. (2017). PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Current opinion in cell biology*, 45, 83-91.
- Melser, S., Chatelain, E. H., Lavie, J., Mahfouf, W., Jose, C., Obre, E., ... & Bénard, G. (2013). Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell metabolism*, 17(5), 719-730.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Diemel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*, 36(10), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Morita, M., Prudent, J., Basu, K., Goyon, V., Katsumura, S., Hulea, L., ... & St-Pierre, J. (2017). mTOR controls mitochondrial dynamics and cell survival via MTFP1. *Molecular cell*, 67(6), 922-935.
- Morris, A. A. M. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(2), 109–121. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-5518-0>
- Newell, C., Shutt, T. E., Ahn, Y., Hittel, D. S., Khan, A., Rho, J. M., & Shearer, J. (2016). Tissue specific impacts of a ketogenic diet on mitochondrial dynamics in the BTBRt+tf/j mouse. *Frontiers in Physiology*, 7(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00654>
- Newman, J. C., & Verdin, E. (2014). β -hydroxybutyrate: Much more than a metabolite. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 106(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.08.009>
- Niven, J. E. (2016). Neuronal energy consumption: biophysics, efficiency and evolution. *Current Opinion in Neurobiology*, 41, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.09.004>
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., ... & Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports*, 11(1), 45-51.

- Otera, H., Wang, C., Cleland, M. M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R. J., & Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, *191*(6), 1141-1158.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., ... Mootha, V. K. (2008). A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell*, *134*(1), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016>
- Pagliuso, A., Cossart, P., & Stavru, F. (2018). The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(3), 355–374. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2603-0>
- Pernas, L., & Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Review of Physiology*, *78*(1), 505–531. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011>
- Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Current Biology*, *28*(4), R170-R185.
- Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*, *25*(2), 262–284. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Puri, R., Cheng, X. T., Lin, M. Y., Huang, N., & Sheng, Z. H. (2019). Mulf1 restrains Parkin-mediated mitophagy in mature neurons by maintaining ER-mitochondrial contacts. *Nature communications*, *10*(1), 1-19.
- Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(25), 10190-10195.
- Rehni, A.K., Dave, K.R. Impact of Hypoglycemia on Brain Metabolism During Diabetes. *Mol Neurobiol* **55**, 9075–9088 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1044-6>
- Rogov, V. V, Suzuki, H., Marinković, M., Lang, V., & Kato, R. (2017). *Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins*. (May 2016), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01258-6>
- Rooijackers, H. M. M., Wiegers, E. C., Tack, C. J., Van Der Graaf, M., & De Galan, B. E. (2016). Brain glucose metabolism during hypoglycemia in type 1 diabetes: Insights from functional and metabolic neuroimaging studies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(4), 705–722. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2079-8>
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., ... & Newgard, C. B. (2013). Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, *339*(6116), 211-214.
- Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio-protocol*, *9*(1).
- 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. *The Journal of clinical investigation*, *117*(4), 910-918.

- Szydłowska, K., & Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.003>
- Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology*, 191(7), 1367-1380
- Tang, Y. C., Tian, H. X., Yi, T., & Chen, H. B. (2016). The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein & cell*, 7(10), 699-713
- Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J., & Dawes, I. W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6564-6569
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, 62(3), 341-360.
- Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Losón, O. C., Hellberg, K., ... & Shaw, R. J. (2016). AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, 351(6270), 275-281
- Uo, T., Dworzak, J., Kinoshita, C., Inman, D. M., Kinoshita, Y., Horner, P. J., & Morrison, R. S. (2009). Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Experimental neurology*, 218(2), 274-285
- Van Laar, V. S., Arnold, B., Cassady, S. J., Chu, C. T., Burton, E. A., & Berman, S. B. (2011). Bioenergetics of neurons inhibit the translocation response of Parkin following rapid mitochondrial depolarization. *Human molecular genetics*, 20(5), 927-940
- Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>
- Wang, F., Zhao, M., Han, Z., Li, D., Zhang, S., Zhang, Y., ... Lei, P. (2017). Long-term subclinical hyperglycemia and hypoglycemia as independent risk factors for mild cognitive impairment in elderly people. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 242(2), 121–128
- Wappler, E. A., Institoris, A., Dutta, S., Katakam, P. V., & Busija, D. W. (2013). Mitochondrial dynamics associated with oxygen-glucose deprivation in rat primary neuronal cultures. *PloS one*, 8(5), e63206
- Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Wu, J., & Wang, Q. (2019). Ketone bodies in neurological diseases: Focus on neuroprotection and underlying mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00585>
- Yin, J., Han, P., Tang, Z., Liu, Q., & Shi, J. (2015). Sirtuin 3 mediates neuroprotection of ketones against ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(11), 1783-1789

- Youle, R. J., & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065
- Yu, T., Sheu, S. S., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular research*, 79(2), 341-351
- Zhang, H. T., Mi, L., Wang, T., Yuan, L., Li, X. H., Dong, L. S., ... & Zhou, Z. C. (2016). PINK1/Parkin-mediated mitophagy play a protective role in manganese induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology In Vitro*, 34, 212-219
- Zhang, T., Xue, L., Li, L., Tang, C., Wan, Z., Wang, R., Tan, J., Tan, Y., Han, H., Tian, R., Billiar, T. R., Tao, W. A., & Zhang, Z. (2016). BNIP3 Protein Suppresses PINK1 Kinase Proteolytic Cleavage to Promote Mitophagy. *The Journal of biological chemistry*, 291(41), 21616–21629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733410>
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keeffe, S., ... Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zhou, Y., Huang, L., Zheng, W., An, J., Zhan, Z., Wang, L., ... Liu, L. (2018). Recurrent nonsevere hypoglycemia exacerbates imbalance of mitochondrial homeostasis leading to synapse injury and cognitive deficit in diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 315(5), E973–E986
- Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-lindner, S., Eils, R., ... Brady, N. R. (2013). *Modulation of Serines 17 and 24 in the LC3-interacting Region of Bnip3 Determines Pro-survival Mitophagy versus Apoptosis* 288(2), 1099–1113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399345>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., ... & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50-59.

XIV. APÉNDICE I.

Lista de anticuerpos y reactivos

Anticuerpos

| Anticuerpo | Especie | Producto | Dilución anticuerpo 1° | Dilución anticuerpo 2° |
|------------|---------|----------|------------------------|------------------------|
| | | | | |

| | | | | |
|---------------|--------|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| | | | | (1 hora a temperatura ambiente) |
| OPA1 | Conejo | 80471 Cell signaling technology | 1:3,000 1 hora a temperatura ambiente | 1:3,000 |
| p-DRP1 (S616) | Conejo | 4494 Cell signaling technology | 1:2,000 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:2,000 |
| DRP1 | Conejo | 8570 Cell signaling technology | 1:2,000 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:2,000 |
| MFF | Conejo | 84580 Cell signaling technology | 1:11,000 1 hora a temperatura ambiente | 1:8,000 |
| p-MFF | Conejo | 49281 Cell signaling technology | 1:5,000 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:5,000 |
| Mitofusina-2 | Conejo | 9482 Cell signaling technology | 1:2,000 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:2,000 |
| BNIP3 | Ratón | sc-56167 Santa cruz | 1:500 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:500 |
| NIX | Conejo | 12396S Cell signaling technology | 1:3,500 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:3,500 |
| LC3 | Conejo | PM036 MBL international | 1:5,000 1 hora a temperatura ambiente | 1:5,000 |
| PINK-1 | Conejo | AB23707 Abcam | 1:500 | 1:500 |

| | | | | |
|---------|-------|---------------------------------------|--|----------|
| | | | Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | |
| Parkin | Ratón | 4211S Cell signaling technology | 1:3,500 1 hora a temperatura ambiente | 1:3,500 |
| Actina | Ratón | MAB1501 Merck Millipore | 1:10,000 1 hora a temperatura ambiente | 1:10,000 |
| Enolasa | Cabra | sc-271384 Santa Cruz | 1:500 Toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente | 1:500 |

Reactivos

| Reactivo | Proveedor |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Medio de cultivo neurobasal | Gibco |
| Medio de cultivo DMEM sin glucosa | Gibco |
| Gentamicina | Gibco |
| Suplemento B27 | Gibco |
| Suplemento B27 minus AO | Gibco |
| L-Glutamina | Sigma |
| Tripsina | Sigma |
| Inhibidor de tripsina | Gibco |
| DNAsa | Sigma |
| AraC | Sigma |
| Poli-L-Lisina | Sigma |
| ECL (WBLUF0500) | Millipore Corporation |
| D-BHB | Sigma |

| | |
|------------------------|-------------------|
| JC-1 | Invitrogen |
| Mitotracker Green | Invitrogen |
| Hoechst | Enzo |
| Inhibidor de proteasas | Roche diagnostics |
| Proteína-A sefarosa | Sigma |

Kits

| Nombre | Proveedor |
|------------------------------|------------------------------|
| Ensayo de proteínas | DC Protein Assay 500-0115 |
| Fraccionamiento mitocondrial | Abcam ab110170 |