



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del β -hidroxibutirato sobre la mitofagia y la función lisosomal en neuronas de cultivo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Juan Carlos Gómora García

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Lourdes Massieu Trigo
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dra. María Soledad Funes Argüello
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la doctora Lourdes Massieu Trigo por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, ser un ejemplo a seguir y enseñarme a ser un mejor científico.

Se agradece ampliamente a la Bióloga Teresa Montiel Montes por toda su asesoría técnica, los consejos, apoyo, sabiduría y paciencia que me ha brindado, haciendo posible la realización de este trabajo.

A mi comité tutor, la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez y la Dra. María Soledad Funes Argüello que guiaron y aportaron valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

Se agradece a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por su gran apoyo en la realización de los experimentos de microscopia de 2 fotones y por todos sus consejos.

Se agradece a la Dra. Ruth Rincón y al Dr. Abraham Rosas Arellano por su apoyo en el manejo del microscopio confocal y en el análisis de imágenes.

Se agradece al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y al Maestro en Ciencias Miguel Ramírez Aragón en la asesoría y elaboración de plásmidos utilizados en este trabajo, además de apoyarme en la realización de diversas técnicas de biología molecular.

Se agradece a la Técnica Académica Beatriz Aguilar por su apoyo, consejos y donación de incontables reactivos para la realización de este trabajo.

Se agradece a la Maestra en Ciencias Mara Guadalupe Prior González por su apoyo y material donado para la realización de este trabajo.

Se agradece el apoyo de la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Este proyecto se realizó con recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN204919) y recursos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto A1-S-17357).

Se contó con el apoyo de una beca otorgada por CONACYT (No. CVU: 852732) para la realización de mis estudios de maestría y una beca de obtención de grado proveída por PAPIIT (No. 118621).

Finalmente se agradece a los miembros del jurado que revisaron y enriquecieron con sus observaciones a este trabajo:

- Dra. Susana Castro Obregón
- Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
- Dra. Diana Escalante Alcalde
- Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
- Dra. Leonor Pérez Martínez

Agradecimientos Personales

Quiero agradecer a mi querida madre Rosa María García Vázquez, mi querido padre Juan Carlos Gómora Martínez y mis increíbles hermanos Yazmín Abigail Ochoa García, Aldo Iván Ochoa García y Melanie Gómora García. Querida familia, gracias por apoyarme a cada instante de mi vida, por alentarme en la toma de mis decisiones y siempre darme su cariño. Siempre recuerden que cada uno de ustedes me inspira a ser mejor en la vida.

Agradezco ampliamente a Teresa Montiel por toda su paciencia y sabiduría que me transmitía en cada dicho y sermón, no nada más me brindo todos sus conocimientos, también me otorgo su amistad. Gracias Tere.

A todos los grandiosos compañeros y amigos que he tenido la fortuna de conocer y trabajar en el Instituto de Fisiología Celular: Brenda Vianey García, Carolina Cid, Elisa Gorostieta, Pilar Acevo, Daniel Moreno, Aura Campero y muchos más. Me ayudaron y aprendí de ustedes tantas cosas pero sobre todo disfrute cada plática y risa que pude tener a su lado. Gracias.

A Carmen Torres porque se convirtió en una gran amiga en mi vida, mi estancia en el laboratorio AL-302 acompañado de fiestas, pijamadas y aventuras que tuvimos juntos los recordare con mucha felicidad. Gracias por sacarme tantas risas pero sobre todo gracias por ser mi amiga.

Al laboratorio AL-302, Carmen Torres, Cristian Gerónimo, Lucy Camberos, Gabriela Santana, Karla Aviléz, Perla Coronado, Eduardo Monterrubio, Lizbeth García y Ashley Michel. Gracias por tantos momentos de diversión y por cada enseñanza que tuve la fortuna de poder recibir de ustedes.

A Ashley Michel Salcido Gómez

Mi mayor dicha en la realización de este trabajo fue haberla podido realizar a lado tuyo. Aun con el desafío de afrontar una pandemia mundial, tuve la fortuna de poder trabajar en el laboratorio Al-302 contigo.

Te agradezco por todos los ratos hasta en la noche trabajando en el laboratorio juntos, por cada historia que tuviste la confianza de contarme, por las incontables caminatas a tu lado y por toda tu infinita sabiduría que me das en cada platica que tenemos. Realmente eres mi gran maestra ya que me enseñas y me sigues enseñando a ser mejor persona, científico, amigo y sobre todo me enseñas a amar contigo.

Gracias por toda tu confianza y apoyo en mí el cual siempre me da tantas fuerzas a esforzarme por ser mejor en la vida. Por ser un equipo conmigo, por todo tu amor y por querer construir una historia juntos. En fin gracias por compartir este gusto por la ciencia conmigo.

Te amo con todo mí ser y gracias por existir Ashley.

Índice

Lista de abreviaturas	5
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
1. Las Neuronas y su alta demanda energética	9
2. Autofagia	9
2.1. Regulación transcripcional de la autofagia	11
2.1.1. FOXO	12
2.1.2. TFEB	12
3. Mitofagia	13
3.1. BNIP3/NIX	14
3.2. PINK1/Parkin	15
4. Sirtuinas	16
4.1. Las sirtuinas, reguladores indispensables de la autofagia y mitofagia	17
5. Los cuerpos cetónicos	18
Pregunta Experimental	20
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
Metodología	21
• Cultivo celular	21
• Tratamiento de neuronas corticales	21
• qRT-PCR	21
• Fraccionamiento subcelular	22
• Análisis mediante Inmunoblot	22
• Ensayos de viabilidad	23
• Transfección de neuronas	23
• Inmunofluorescencia	23
• Análisis de mitofagia	24
• Detección de autofagosomas y lisosomas	24
• Autofluorescencia de NADH.....	24

• Análisis estadístico	25
Resultados.....	26
El BHB estimula la translocación de factores de transcripción esenciales para la autofagia y la biogénesis lisosomal	26
El D-BHB activa la autofagia y la biogénesis lisosomal en neuronas corticales	29
El D-BHB estimula el flujo autofágico y la degradación de mitocondrias en neuronas corticales.	31
La dieta de D-BHB confiere efectos neuroprotectores a neuronas corticales ante estrés mitocondrial y energético	36
El aumento en el número de autofagosomas y lisosomas correlaciona con una disminución en los niveles de NADH en neuronas tratadas con D-BHB	39
El D-BHB aumenta los niveles de la sirtuina 2	43
Discusión	47
Conclusión.....	55
Perspectivas	55
Referencias	56

Lista de Abreviaturas

BHB	β -hidroxibutirato
D-BHB	D- β -hidroxibutirato
L-BHB	L- β -hidroxibutirato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
ATP	Adenosín trifosfato
AMP	Adenosín monofosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>
Ac	Acetona
AcAc	Acetoacetato
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation System</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
PI3K de clase III	<i>class 3 phosphoinositide 3-kinase</i>
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
ATG4	<i>Autophagy related 4A cysteine peptidase</i>
ATG7	<i>Autophagy related 7</i>
OPTN	<i>Optineurin</i>
NBR1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1 protein</i>
p62/SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
FOXO	<i>Forkhead box protein O</i>
AKT	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2</i>
TFEB	<i>Transcription factor EB</i>
CTSA	<i>Cathepsin A</i>
CTSB	<i>Cathepsin B</i>
GBA	<i>β-glucosidase</i>
ATP6AP1	<i>ATPase H⁺ Transporting Accessory Protein 1</i>
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LAMP2	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>
MCOLN1	<i>Mucolipin-1</i>
BNIP3	<i>Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3</i>
NIX	<i>NIP3-Like Protein X</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology 3</i>
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
TOM	<i>Translocase of the outer membrane</i>

TIM	<i>Translocase of the inner membrane</i>
PARL	<i>Presenilins-associated rhomboid-like protein, mitochondrial</i>
HDAC	<i>Histone deacetylases</i>
SIRT	<i>Sirtuin</i>
MCTs	<i>Monocarboxylate transporters</i>
BDH	<i>D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase</i>
SCOT	<i>Succinyl-CoA-Ketoacid-CoA transferase</i>
mBKD	<i>mitochondrial β-ketothiolase</i>
RFP-LC3	<i>Red fluorescent protein - LC3</i>
TOM20	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 20</i>
COX IV	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1</i>
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
TFAM	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
AG	Ausencia de Glucosa
RG	Reintroducción de Glucosa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
LDH	Lactato deshidrogenasa
qRT-PCR	<i>Reverse Transcription - Real time Polymerase Chain Reaction</i>
CQ	<i>Cloroquina</i>
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone</i>

Resumen

La autofagia es una vía conservada entre los eucariontes que se caracteriza por el secuestro y entrega de contenido citoplasmático al lisosoma para su degradación. Específicamente, la degradación de mitocondrias dañadas se denomina mitofagia y las neuronas dependen en gran medida de un estado óptimo de este proceso. En los últimos años se han descubierto diversos factores de transcripción maestros que regulan los procesos de autofagia, biogénesis de lisosomas y mitofagia entre los cuales se encuentran TFEB y la familia de los FOXOs. La estimulación de estos factores de transcripción se ha asociado con efectos benéficos en varias enfermedades neurodegenerativas y se ha observado que la translocación al núcleo de estas proteínas está controlada por sirtuinas, desacetilasas altamente reguladas por cambios en los niveles de NAD⁺ y el metabolismo celular. Una molécula implicada en el metabolismo celular es el cuerpo cetónico β -hidroxibutirato (BHB), este metabolito se sintetiza en el hígado a partir de ácidos grasos y representa un acarreador esencial de energía desde el hígado a los tejidos periféricos cuando el suministro de glucosa es bajo. Además de fungir como fuente de energía alterna, el BHB también se le ha encontrado muchas funciones de señalización celular, como la estimulación de la autofagia en condiciones de estrés energético y aumentar los niveles de NAD⁺. Sin embargo, se desconoce si este cuerpo cetónico puede estimular la mitofagia y la biogénesis lisosomal a través de la activación de factores de transcripción dependiente de sirtuinas en neuronas sanas.

En el presente estudio evaluamos los niveles nucleares de TFEB, FOXO1 y FOXO3a, la dinámica de activación de la autofagia, la biogénesis lisosomal y la degradación mitocondrial por mitofagia en neuronas corticales primarias incubadas con BHB. Los resultados muestran que las neuronas incubadas con BHB incrementan los niveles de TFEB, FOXO1 y FOXO3a en el núcleo, esto asociado con un aumento en la expresión de genes de autofagia y lisosomas. Se detectó un mayor número de lisosomas y autofagosomas en neuronas tratadas con el cuerpo cetónico sugiriendo la estimulación de la autofagia y la biogénesis lisosomal. Usando cloroquina, un compuesto que bloquea la degradación lisosomal, observamos que el BHB estimula el flujo autofágico y la degradación de proteínas mitocondriales. Adicionalmente, mediante microscopía confocal observamos una mayor colocalización de autofagosomas y mitocondrias en presencia de BHB, lo que sugiere inducción de mitofagia. Asimismo, la pre incubación de BHB en las neuronas confirió un efecto neuroprotector frente al estrés energético inducido por la ausencia de glucosa. Para evaluar el posible mecanismo observamos que el BHB cambió los niveles de NAD⁺/NADH y aumentó los niveles de la sirtuina 2. Al inhibir farmacológicamente la sirtuina 2, encontramos que se revierten los efectos protectores de BHB en neuronas sometidas a la ausencia de glucosa y de manera interesante se encontró que la translocación al núcleo de los FOXOs fue dependiente de la actividad de la sirtuina 2. En conclusión estos resultados sugieren que BHB regula positivamente la autofagia, la biogénesis lisosomal y la mitofagia a través de estimular los factores de transcripción TFEB y FOXOs, confiriendo a las neuronas una resistencia ante un estrés energético. Todo esto regulado posiblemente por un aumento en la actividad de sirtuinas.

Abstract

Autophagy is a conserved pathway among eukaryotes that delivers cytoplasmic content to the lysosome for degradation. Specifically, the degradation of damaged mitochondria is called mitophagy and neurons are highly dependent on an optimal state of this process. In recent years, several master transcription factors such as TFEB and the FOXO family have been discovered to regulate the processes of autophagy, lysosome biogenesis and mitophagy. The stimulation of these transcription factors has been associated with beneficial effects in several neurodegenerative diseases and it has been observed that the nuclear translocation of these proteins is controlled by sirtuins, deacetylases highly regulated by changes in NAD⁺ levels and cell metabolism. A molecule involved in cell metabolism is the ketone body β -hydroxybutyrate (BHB), this metabolite is synthesized in the liver from fatty acid and represents an essential energy carrier from the liver to peripheral tissues when glucose supply is low. In addition to its action as an alternative energy source, BHB has many cellular signaling functions, such as the stimulation of autophagy in energy stress conditions and the increase of NAD⁺ levels. However, it is unknown if this ketone body can stimulate mitophagy and lysosomal biogenesis through the activation of sirtuin-dependent transcription factors in healthy neurons.

In the present study we determined the nuclear levels of TFEB, FOXO1 and FOXO3a, the activation of autophagy, lysosomal biogenesis and mitochondrial degradation by mitophagy, in primary cortical neurons incubated with BHB. The results show that neurons incubated with BHB have increased levels of TFEB, FOXO1 and FOXO3a in the nucleus, which is associated with an increase in the expression of autophagy and lysosomes genes. An increase in the number of lysosomes and autophagosomes was detected in neurons treated with the ketone body indicating the stimulation of autophagy and lysosomal biogenesis. Using chloroquine, a compound that blocks lysosomal degradation, we observed that BHB stimulates the autophagic flux and mitochondrial protein degradation. Additionally, using confocal microscopy we observed higher colocalization of autophagosomes and mitochondria in the presence of BHB, which suggests mitophagy induction. Furthermore, the pre-incubation of BHB in neurons conferred a neuroprotective effect against energy stress induced by glucose deprivation. To evaluate the possible mechanism, we observed that BHB changed the NAD⁺/NADH ratio and increased the levels of the sirtuin 2. Pharmacological inhibition of sirtuin 2 abated BHB neuroprotective effect on neurons exposed to glucose deprivation, and most importantly, we found that the translocation to nucleus of the FOXOs transcription factors was dependent on sirtuin 2 activity. In conclusion these results suggest that BHB positively regulates autophagy, lysosomal biogenesis and mitophagy through the stimulation of TFEB and FOXOs transcription factors, conferring neurons a resistance to energy stress. All this possibly regulated by an increase in sirtuin activity.

Introducción

1. Las neuronas y su alta demanda energética

El cerebro es un órgano con alta demanda energética y depende de la glucosa como principal fuente de energía. Del peso total del cuerpo humano, el cerebro representa solamente el 2 % pero para asegurar un correcto funcionamiento consume aproximadamente el 25 % de la glucosa total del cuerpo (Mergenthaler et al, 2013). Estudios pioneros en los 1940s por Schmidt y Kety (Kety & Schmidt, 1948) y después por Sokoloff (Sokoloff, 1981) demostraron que el metabolismo energético del cerebro es prácticamente oxidativo, siendo la glucosa metabolizada a CO₂ y agua dentro de las mitocondrias para producir aproximadamente de 32 a 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada (Squire, 2013). Esta alta demanda energética se debe a la gran cantidad de energía necesaria para restaurar el potencial de membrana, mantener el constante transporte axonal y para mantener en buen funcionamiento mecanismos relacionados con la señalización. Debido a estos exigentes requerimientos energéticos las neuronas son altamente dependientes del estado óptimo de sus mitocondrias (Youle & Narendra, 2011).

Además de ser los principales generadores de energía en la célula, las mitocondrias también tienen otras funciones celulares importantes como el control de la muerte celular programada (apoptosis) (Nagley et al, 2010) y la regulación de los niveles de calcio intracelular (Gleichmann & Mattson, 2011), por lo que el mantenimiento adecuado de las mitocondrias es necesario para la homeostasis celular y particularmente importante para la viabilidad neuronal. Debido al estado post-mitótico de las neuronas y a la alta actividad oxidativa que se lleva a cabo en las mitocondrias, la división celular no puede actuar como un factor de dilución para la constante generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) que se producen como subproducto de la fosforilación oxidativa, provocando que se acumulen dentro de la célula, generando a la larga daño y disfunción mitocondrial (Martinez-Vicente, 2017). Es por este motivo que las neuronas requieren un "sistema de limpieza" adecuado para eliminar cualquier mitocondria dañada o no deseada que pueda ser una fuente de ROS o un inductor de muerte celular.

2. Autofagia

Uno de los procesos por el cual las células logran degradar y reciclar componentes es mediante la macroautofagia (autofagia), la cual es un proceso catabólico intracelular que se caracteriza por el secuestro de proteínas y organelos dañados en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas formadas de diversos organelos como el retículo endoplásmico. Los autofagosomas vaciarán su contenido al fusionarse con lisosomas para su descomposición en biomoléculas básicas que después serán recicladas en el citosol o secretadas por la célula (Mizushima &

Komatsu, 2011). Diversos estímulos extracelulares e intracelulares son capaces de inducir la autofagia, la cual representa un mecanismo de adaptación ante condiciones de estrés como la falta de nutrientes. Sin embargo, la autofagia también ocurre en condiciones basales en todos los tipos celulares y en especial en las neuronas para mantener la homeostasis celular, la homeostasis proteica o proteostasis y el adecuado balance energético (Ravikumar et al, 2010).

La autofagia es un mecanismo de degradación que está finamente controlado por dos cinasas centrales que regulan el anabolismo y el catabolismo celular, los cuales son mTOR (*mammalian target of rapamycin*) y AMPK (*AMP-activated protein kinase*) respectivamente. La disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento son censados por mTOR y la detección en los niveles de AMP/ATP recae en la proteína AMPK (Egan et al, 2011). Juntos regulan de manera opuesta al complejo de iniciación de la autofagia ULK1/2 (*Unc-51 like autophagy activating kinase*) a través de fosforilaciones. Cuando existe presencia de suficientes aminoácidos y factores de crecimiento, mTOR está activado e inhibe la autofagia al secuestrar y fosforilar al complejo ULK1/2. Por otro lado, cuando hay niveles bajos de glucosa o un aumento en los niveles de AMP la cinasa AMPK se activa y promueve la autofagia al activar al complejo ULK1/2 a través de fosforilación directa (Kim et al, 2011).

Una vez iniciada la señalización que promueve la autofagia, el complejo ULK1/2 es activado y recluta las proteínas del complejo PI3K de clase III (*Class 3 Phosphoinositide 3-kinase*). Este complejo tiene la capacidad de fosforilar fosfoinosítidos que se encuentran en la membrana de algunos organelos como el retículo endoplásmico o la mitocondria, promoviendo la producción de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P, *Phosphatidylinositol-3-phosphato*). Este paso inicial propicia la formación de una estructura de aislamiento rica en PI3P denominada fagóforo. La presencia de este fosfoinosítido permite que se anclen proteínas con dominio de interacción a PI3P como WIP2, el cual sirve de andamiaje para el reclutamiento del complejo ATG12-ATG5-ATG16, un complejo que va regular el crecimiento del fagóforo mediante la incorporación de la proteína que recubre todo el autofagosoma denominada LC3 (*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*). Para ser incorporado a la membrana del fagóforo la proteína LC3 sufre una serie de modificaciones post-traduccionales. Primero es procesada por la cisteína proteasa ATG4 (*Autophagy related 4A cysteine peptidase*) formando así LC3-I, esta escisión permite la conjugación de LC3-I con una fosfatidiletanolamina (PE) presente en la membrana del fagóforo y a esta forma lipidada se le denomina LC3-II. El proceso de lipidación de LC3 es mediado por una serie de reacciones de tipo ubiquitinación en donde la proteína ATG7 (*Autophagy related 7*) traspassa a LC3-I a la proteína ATG3, para que finalmente pueda ser lipidada por el complejo ATG12-ATG5-ATG16 y así ser incorporado a la membrana del fagóforo. Esta cascada de reacciones se mantiene en el borde del fagóforo permitiendo que crezca y engulla todo el cargo a ser degradado (Bento et al, 2016; Dikic & Elazar, 2018). Una vez que se cierra el fagóforo se convierte en una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma (Fig.1).

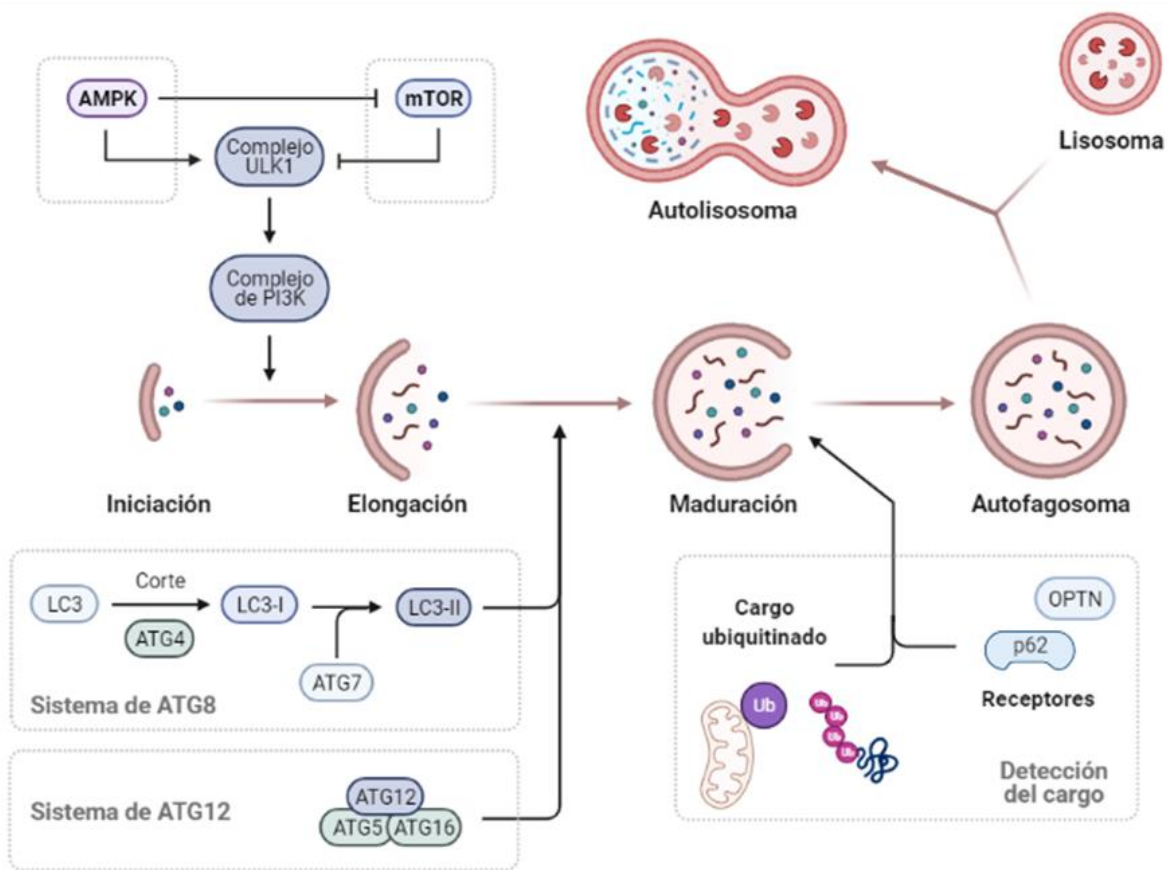


Figura 1 Diagrama de la Vía de Autofagia. Las células degradan y reciclan componentes mediante la autofagia, la cual es un proceso catabólico intracelular que se caracteriza por el secuestro de proteínas y organelos en vesículas de doble membrana formadas del retículo endoplásmico llamadas autofagosomas, y que finalmente vaciarán su contenido al fusionarse con lisosomas para su descomposición y eventual reciclado. Esquema realizado en Biorender.

Estos autofagosomas finalmente son movilizados hacia los lisosomas donde la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma. El pH ácido que caracteriza a los lisosomas junto con las lipasas, glucosidasas e hidrolasas tales como las catepsinas que habitan dentro de ellas, llevan a la degradación de la vesícula interna, el cargo e incluso parte de los componentes que forman el autofagosoma como es la proteína LC3-II (He & Klionsky, 2009). Sin embargo, no cualquier componente celular es llevado a degradación vía autofágica. El cargo a ser degradado es previamente marcado mediante un tipo poli-ubiquitinación. Es conocido que la poli-ubiquitinación de proteínas está asociado como una marca de degradación vía proteosoma, pero se sabe que entre la degradación autofágica y proteosomal la unión de la proteína ubiquitina al blanco a ser degradado es diferente para cada vía. Proteínas que serán degradadas vía proteosoma tienen cadenas de ubiquitina unidas en la lisina 48 (K48) de la ubiquitina, mientras que las proteínas que serán degradadas por autofagia tienen cadenas de ubiquitina unidas en su lisina 63 (K63) (Kocaturk &

Gozuacik, 2018). Estas cadenas de ubiquitina en la posición K63 son reconocidas por proteínas adaptadoras como OPTN (*Optineurin*), NBR1 (*Neighbor Of BRCA1 gene 1 protein*) o p62/SQSTM1 (*Sequestosome-1*) los cuales comparten sitios de reconocimiento a ubiquitina y dominios de interacción con LC3 (Johansen & Lamark, 2011), permitiendo que sean capturados junto con su cargo al interior del autofagosoma y finalmente degradados por el lisosoma (Fig. 1).

2.1. Regulación transcripcional de la autofagia

Con los años se ha encontrado que mTOR y AMPK además de regular la iniciación de la autofagia también son capaces de regular la localización núcleo/citoplasma de factores de transcripción importantes para la expresión de una gran batería de genes involucrados en la autofagia.

2.1.1. FOXO

Entre estos factores de transcripción se encuentra una familia evolutivamente conservada de factores de transcripción llamada FOXO (*Forkhead box O*). En mamíferos esta familia está constituida por los integrantes FOXO1, FOXO3, FOXO4 y FOXO6. En respuesta a diversos tipos de estrés celular como estrés oxidante, cambios en los niveles de nutrientes o alteraciones en la señalización de factores de crecimiento, esta familia de factores de transcripción sufren modificaciones post-traduccionales que regulan su translocación del citoplasma al núcleo o viceversa, permitiendo así que regulen la expresión de genes. La familia FOXO se ha encontrado relacionada con la regulación de la homeostasis metabólica, el estrés oxidante, la autofagia, endocitosis, la neurogénesis, neuroprotección y homeostasis de células troncales (Cheng, 2019; Martins et al, 2016).

De entre esta familia de factores de transcripción sobresalen dos integrantes que se han visto altamente relacionados con la inducción de la autofagia, FOXO1 y FOXO3. Estos dos integrantes y su actividad transcripcional son principalmente contralados por la cinasa AKT (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*). En presencia de factores de crecimiento, AKT está activo y fosforila a estos factores de transcripción reteniéndolos en el citoplasma (Di Malta et al, 2019). Por otra parte, en condiciones de estrés energético o estrés oxidante cinasas como AMPK o JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) fosforilan y promueven la translocación de FOXO1 y FOXO3 al núcleo y por lo tanto la expresión de genes contra el estrés oxidante como *Sod2* (*Superoxide dismutase 2*) y de autofagia como *Atg5*, *Atg12* y *Lc3* (Chi et al, 2016; Xu et al, 2011). Esto indica que la regulación de la autofagia mediada por la localización de los factores de transcripción FOXOs proporciona un importante mecanismo de adaptación al estrés ambiental, el estrés oxidativo, la hipoxia y el estrés nutricional.

2.1.2. TFEB

La autofagia además de recurrir de maquinaria para la formación de autofagosomas, requiere de la colaboración y un buen funcionamiento de los lisosomas. En los últimos años se ha descubierto que existe un regulador maestro de la biogénesis y función lisosomal denominado TFEB (*Transcription Factor EB*). La actividad de TFEB está estrictamente regulada a través de modificaciones post-traduccionales, interacción proteína-proteína y localización celular (Napolitano & Ballabio, 2016). En condiciones de homeostasis TFEB se encuentra fosforilado por mTOR, ocasionando su interacción con la proteína 14-3-3 y retención en el citosol (Roczniak-Ferguson et al, 2012). Cuando la célula se encuentra con falta de nutrientes, disfunción lisosomal o la inactivación de mTOR, TFEB ya no es fosforilado y se transloca al núcleo donde coordina la expresión de sus genes blanco (Martina et al, 2012). Además, TFEB también es regulado por calcio. En condiciones de estrés energético o daño lisosomal, se libera calcio del lisosoma, lo que conduce a la activación de la fosfatasa Calcineurina, que desfosforila a TFEB y promueve la translocación de TFEB al núcleo (Medina et al, 2015).

Desde su descubrimiento TFEB se le vio relacionado con su capacidad de aumentar el número y capacidad degradativa de los lisosomas al coordinar la expresión de genes relacionados con la biogénesis y función lisosomal entre los cuales se encuentran hidrolasas lisosomales como *CTSA (Cathepsin A)*, *CTSB (Cathepsin B)* y *GBA (β -glucosidase)*, proteínas que acidifican el lisosoma como *ATP6AP1 (ATPase H⁺ Transporting Accessory Protein 1)*, proteínas que recubren la membrana lisosomal como *LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1)*, *LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein 2)* y *MCOLN1 (Mucolipin-1)*(Palmieri et al, 2011), sin embargo, trabajos posteriores han demostrado TFEB también orquesta la expresión de un número más amplio de genes y la regulación de diversos procesos celulares como la autofagia, mitofagia, la endocitosis, la exocitosis y la función mitocondrial (Napolitano & Ballabio, 2016; Wang et al, 2020). Es más, se ha observado que TFEB es capaz de regular la degradación específica de diversos componentes celulares como la eliminación de gotas de lípidos (Settembre et al, 2013) y mitocondrias dañadas (Nezich et al, 2015), lo que sugiere que este factor de transcripción podría ser un regulador central de la homeostasis metabólica de la célula.

3. Mitofagia

La autofagia es un proceso conservado entre todos los eucariontes, sin embargo, en organismos pluricelulares se ha encontrado que la autofagia se vuelve altamente selectiva con lo que degrada, llegando a regular el recambio específico de ciertos organelos o componentes celulares de manera tejido específico (Ravikumar et al, 2010; Zhang et al, 2021). Esta especialización se ha vuelto de suma importancia para el correcto funcionamiento de algunos tejidos. Con el avance en la investigación se ha

observado que las neuronas degradan y recambian constantemente un organelo en específico como son las mitocondrias, además la desregulación de este proceso en las neuronas está altamente relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Martínez-Vicente, 2017).

La degradación selectiva de mitocondrias recibe el nombre de mitofagia. En términos generales el proceso de iniciación y degradación es el mismo que el de la autofagia, sin embargo, las mitocondrias tienen sistemas de marcaje específicos para su degradación como son el sistema BNIP3/NIX y el sistema PINK1/Parkin. Una adecuada ejecución de estos sistemas conlleva a un óptimo estado de las mitocondrias y a la sobrevivencia de la neurona ante diversas condiciones metabólicas.

3.1. BNIP3/NIX

BNIP3 (*Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3*) y NIX (*NIP3-Like Protein X*) son proteínas homólogas que comparten una gran similitud en su secuencia de aminoácidos (aproximadamente 50% de identidad). Son proteínas transmembrana de un solo pase que se insertan en la membrana mitocondrial externa a través de sus dominios transmembrana C-terminales, los cuales contienen dominios de cremalleras de glicina, confiriéndoles la habilidad de formar homodímeros resistentes a los detergentes, mientras que sus extremos N-terminales los cuales están expuestos al citoplasma, contienen un dominio atípico de homología BCL2 de tipo 3 (BH3, *Bcl-2 homology 3*), lo que les provee características pro-apoptóticas (Ney, 2015) interactuando con proteínas de esta misma familia como son BAX y BAK.

El mecanismo por el cual inducen mitofagia es aún bastante controversial, ambas proteínas son capaces de inducir la autofagia al disociar el complejo de iniciación de la autofagia Bcl-2-Beclin1 mediante la unión competitiva a Bcl-2 por medio de su dominio BH3 (Bellot et al, 2009). Además, ambas proteínas contienen sitio de unión a LC3 (Hanna et al, 2012; Novak et al, 2010) lo que permite que la mitocondria que tenga en su membrana externa la presencia de BNIP3 y NIX será envuelta por el autofagosoma y finalmente degradada vía autofágica.

En el caso específico de BNIP3, éste se ha relacionado también con la necrosis y la muerte celular autofágica (Azad et al, 2008; Vande Velde et al, 2000). BNIP3 es capaz de inducir la despolarización de las mitocondrias a través de la interacción con BAX y BAK, formando poros en la membrana externa mitocondrial y liberando citocromo C, el cual es capaz de inducir apoptosis mediada por caspasas (Kubli et al, 2007). Sin embargo, la despolarización de las mitocondrias se considera también un inductor de mitofagia (Chen et al, 2020; Elmore et al, 2001), es por esto que aún no se comprende del todo la dualidad de efectos que tiene BNIP3 y la manera en que su regulación permite la inducción de la apoptosis o la activación de la mitofagia.

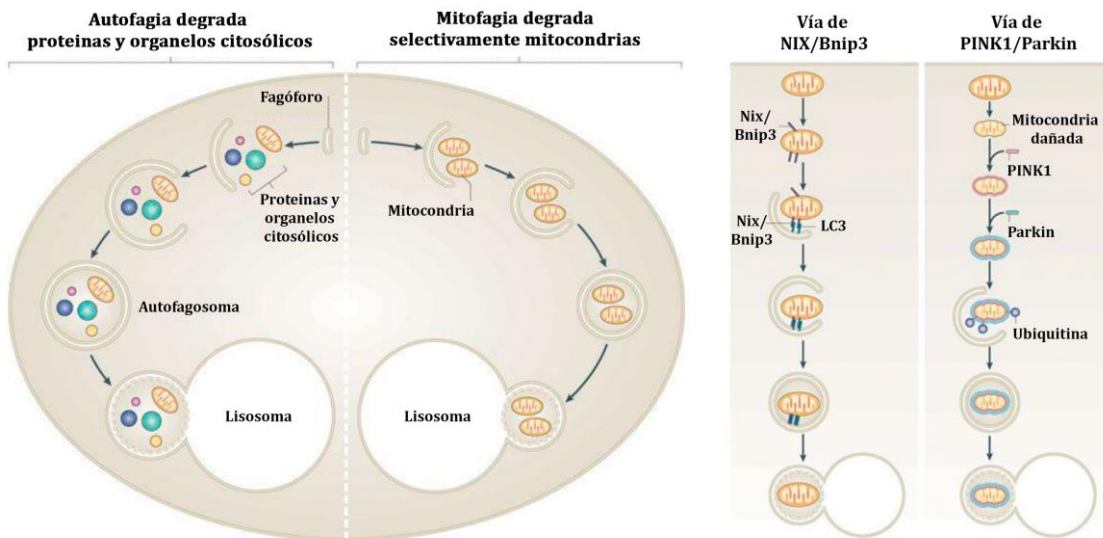


Figura 2 Esquema de las vías de mitofagia. Las células degradan proteínas y organelos citosólicos mediante la autofagia pero la degradación selectiva de mitocondrias se le denomina Mitofagia. Existen al menos dos vías que regulan y etiquetan mitocondrias para su degradación. La vía de NIX/Bnip3 y la vía de PINK1/Parkin. Modificado de (Youle & Narendra, 2011).

Cabe señalar que BNIP3 y NIX no se expresan de forma ubicua en condiciones normales. Son proteínas altamente inducibles en condiciones de estrés como es la hipoxia, estrés oxidativo y en condiciones específicas como es la diferenciación eritroide (Ding & Yin, 2012). En condiciones de hipoxia, tanto Bnip3 como Nix son regulados transcripcionalmente por el factor inducido por hipoxia HIF-1 induciendo mitofagia y la eliminación de las mitocondrias dañadas, mitigando la muerte celular (Zhang et al, 2008). Además de HIF-1, la expresión de Bnip3 también está regulada por el factor de transcripción Foxo3a (Mammucari et al, 2007). Sin embargo, no se ha determinado el papel ni las condiciones por las cuales Foxo3 induce mitofagia.

3.2. PINK1/Parkin

PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) y Parkin son dos genes conocidos por ser la mayor causa de la enfermedad autosómica recesiva de Parkinson, cuando se encuentran mutados. Gracias a su relación con esta enfermedad se ha descubierto que son componentes esenciales para el marcaje y degradación selectiva de mitocondrias dañadas (Son et al, 2012).

PINK1 contiene una secuencia de localización mitocondrial permitiéndole que se una al complejo translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM, *translocase of the outer membrane*) (Okatsu et al, 2015). Cuando la secuencia de orientación mitocondrial y el segmento transmembrana de PINK1 alcanzan la translocasa del complejo de

membrana interna (TIM, *translocase of the inner membrane*) el segmento transmembrana se escinde proteolíticamente por la proteasa PARL (*presenilins-associated rhomboid-like protein, mitochondrial*). La escisión da como resultado un fragmento de proteína de 52 kDa que contiene el dominio de quinasa (Jin et al, 2010).

Cuando las mitocondrias se encuentran sanas, este fragmento PINK1 de 52 kDa se libera en el citosol y se ubiquitina rápidamente para su degradación por el proteosoma (Yamano & Youle, 2013). Sin embargo, cuando las mitocondrias se despolarizan o son dañadas, la translocación y el procesamiento de PINK1 se bloquean, lo que lleva a la acumulación de PINK1 activo en la membrana externa mitocondrial, es ahí donde puede activar y reclutar mediante fosforilación directa a la ubiquitin ligasa citosólica Parkin (Narendra et al, 2008). Una vez reclutado a la mitocondria, Parkin induce la ubiquitinación de numerosas proteínas de la membrana externa mitocondrial. Estas cadenas de ubiquitina son reconocidos por la proteína p62/SQSTM1, proteína esencial en el reconocimiento de proteínas que serán degradadas vía autofágica. Una vez reconocido por p62/SQSTM1 la mitocondria es llevada a degradación (Geisler et al, 2010). De manera simple se puede describir que la mitofagia mediada por el sistema PINK1/parkin está compuesto por tres elementos importantes: un sensor de daño mitocondrial (PINK1), un amplificador de señal (Parkin) y un efector de señal (cadenas de ubiquitina), que determina qué mitocondria debe capturarse para su degradación vía mitofagia.

El deterioro en el mecanismo de mitofagia se ha visto relacionado con el envejecimiento acompañado con un decremento en la función mitocondrial, desbalance en el metabolismo energético de la célula, disminución en los niveles de metabolitos importantes como ATP y NADH, además de manera específica en las neuronas, una inadecuada ejecución de la mitofagia se relaciona con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Palikaras et al, 2018). Es por tal motivo que la búsqueda y el entendimiento de los mecanismos que llevan a la regulación de la mitofagia se han vuelto de gran importancia en el área de las neurociencias.

4. Sirtuinas

Uno de los mecanismos por los cuales las células censan cambios en su estado metabólico es a través de los cambios en los niveles de NAD⁺/NADH, moléculas importantes del metabolismo energético y cofactores clave para varias enzimas. Entre estas enzimas, existe un grupo en particular de proteínas por las que ha aumentado su interés en los últimos años al estar relacionadas con la regulación del metabolismo y el envejecimiento. Estas proteínas denominadas sirtuinas, pertenecen a la familia de las desacetilasas de histonas de clase III (HDAC III, *Class III Histone deacetylases*) debido a que usan NAD⁺ para su actividad enzimática y no Zn²⁺ como las demás familias de desacetilasas (HDAC I, II y IV). Al ser dependientes de NAD⁺ para poder llevar a cabo su reacción enzimática la actividad de las sirtuinas está estrictamente ligada al estado

metabólico de la célula y por lo tanto son sensores importantes a los cambios intracelulares de este metabolito (Nakagawa & Guarente, 2011).

En los mamíferos existen 7 homólogos de sirtuinas que presentan diferencias en su distribución dentro de la célula lo que les permite tener una gran variedad de blancos y funciones biológicas como son la regulación de la cromatina, el ciclo celular, el daño al DNA y la función mitocondrial (Bosch-Presegue & Vaquero, 2014).

4.1. Sirtuinas, reguladores indispensables de la autofagia y mitofagia

Las sirtuinas que se han encontrado en el citoplasma como son la sirtuina 1 y 2 se han visto íntimamente ligadas a la desacetilación de diversas proteínas como componentes del citoesqueleto, cinasas o factores de transcripción regulando la activación de mecanismos y vías de señalización. En específico estas dos sirtuinas se encuentran altamente expresadas en el sistema nervioso y se ha ligado su participación a la prevención del envejecimiento y mejoría de enfermedades neurodegenerativas.

La sirtuina 1 (SIRT1) se expresa en gran medida en el cerebro adulto, con niveles altos en la corteza, el hipocampo, el cerebelo y el hipotálamo. Subcelularmente, SIRT1 se conoce como una proteína nuclear. Sin embargo, SIRT1 tiene secuencias de importación y exportación nuclear y está presente también en la fracción citosólica del cerebro del ratón (Donmez & Outeiro, 2013). Estudios indican que la elevación del cociente $NAD^+/NADH$ o la activación farmacológica de SIRT1 es capaz de estimular la autofagia. En específico SIRT1 desacetila y regula la función transcripcional de las proteínas FOXOs (Lin et al, 2018). Estudios previos han demostrado que SIRT1 es capaz de desacetilar al factor de transcripción FOXO1, induciendo su translocación al núcleo y aumentando la expresión de proteínas involucradas en la inducción de la autofagia como es BNIP3 (Lin et al, 2014) y en la fusión autofagosoma-lisosoma como es Rab7 (Hariharan et al, 2010). SIRT1 también desacetila a FOXO3a, el cual regula varios genes de autofagia como es *Lc3*, *Bnip3* y *Atg12* (Mammucari et al, 2007) y recientemente se ha descubierto que induce la expresión de *Pink1* (Mei et al, 2009) promoviendo la mitofagia. Otro factor de transcripción esencial que regula el proceso de autofagia y biogénesis lisosomal es el factor de transcripción TFEB. Este factor es desacetilado por la SIRT1, lo que induce su translocación al núcleo y la expresión de genes relacionados con la función y la biogénesis lisosomal como son las hidrolasas *Ctsb*, *Ctsd* y las proteínas *Lamp1* y *Lamp2* (Bao et al, 2016).

En el caso de la sirtuina 2 (SIRT2), este integrante se encuentra altamente expresado en la corteza, el lóbulo frontal, el hipocampo, el cuerpo estriado y el cerebelo, teniendo una localización predominantemente citoplasmática (Maxwell et al, 2011). SIRT2 se ha encontrado estrechamente ligado con la desacetilación de tubulina, regulando así la dinámica de microtúbulos en neuronas. Al igual que con SIRT1, también SIRT2 es capaz de desacetilar a FOXO1 y FOXO3a promoviendo la autofagia y reduciendo el estrés oxidante (Lee, 2019; Wang et al, 2007). Sin embargo, SIRT2 también se le ha encontrado

una estrecha relación con la regulación de la homeostasis de mitocondrias. Se ha encontrado que SIRT2 regula la acetilación del factor PGC1 α (Krishnan et al, 2012), un importante regulador transcripcional de la biogénesis y función mitocondrial. Además, esta sirtuina es importante para el proceso de mitofagia ya que la eliminación génica de *Sirt2* en neuronas con lleva a una desregulación en la función mitocondrial, aumento en el estrés oxidante y falla en el proceso de autofagia/mitofagia (Liu et al, 2017).

Es evidente el constante aumento de información donde se relaciona la actividad de las sirtuinas con la regulación de la autofagia y un mayor número de estudios indican que la regulación de estos procesos es de suma importancia en la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Donmez, 2012; Donmez & Outeiro, 2013; Lee, 2019). Con esta información en mente, la búsqueda de compuestos que aumenten los niveles de NAD⁺ o promuevan la actividad de las sirtuinas es de gran interés. Uno de los posibles candidatos podrían ser los cuerpos cetónicos ya que se ha relacionado a las sirtuinas como un posible mecanismo de la acción benéfica de la restricción calórica y las dietas cetogénicas, condiciones en donde se induce un aumento en los niveles de cuerpos cetónicos (Newman & Verdin, 2014; Pasinetti et al, 2013).

5. Los cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos son sustratos energéticos alternativos a la glucosa, producto de la oxidación de ácidos grasos en el hígado. Son producidos en condiciones específicas como el ayuno prolongado, el ejercicio exhaustivo, dietas altas en grasa y en la fase de la lactancia. Las moléculas que se forman de este proceso son el acetoacetato, el D- β -hidroxiacetato (D-BHB) y la acetona. La acetona al ser un compuesto volátil es exhalada por los pulmones mientras que los otros dos entran al torrente sanguíneo y pueden proveer de energía a tejidos extra hepáticos como el cerebro.

Estados metabólicos donde se induce un aumento en los niveles de cuerpos cetónicos en el cuerpo como la restricción calórica, el ayuno intermitente, el uso de dietas cetogénicas o la administración exógena de D-BHB han ganado atención en los últimos años al tener efectos benéficos contra el envejecimiento, desórdenes neurológicos y fungir como posible tratamiento contra enfermedades neurodegenerativas (Camberos-Luna & Massieu, 2020). Desde hace tiempo el ayuno se ha utilizado como terapia anticonvulsiva y la dieta cetogénica se ha utilizado clínicamente desde hace un siglo como terapia para algunas epilepsias infantiles (Hartman & Vining, 2007). Con el paso del tiempo, el número de investigaciones han aumentado y la gran mayoría indican que el uso de dietas cetogénicas es benéfico en diversos modelos de ratón que presenta enfermedades neurodegenerativas (Newman & Verdin, 2014), sin embargo aún no se clarifican bien los mecanismos por los cuales los cuerpos cetónicos podrían tener estos efectos benéficos.

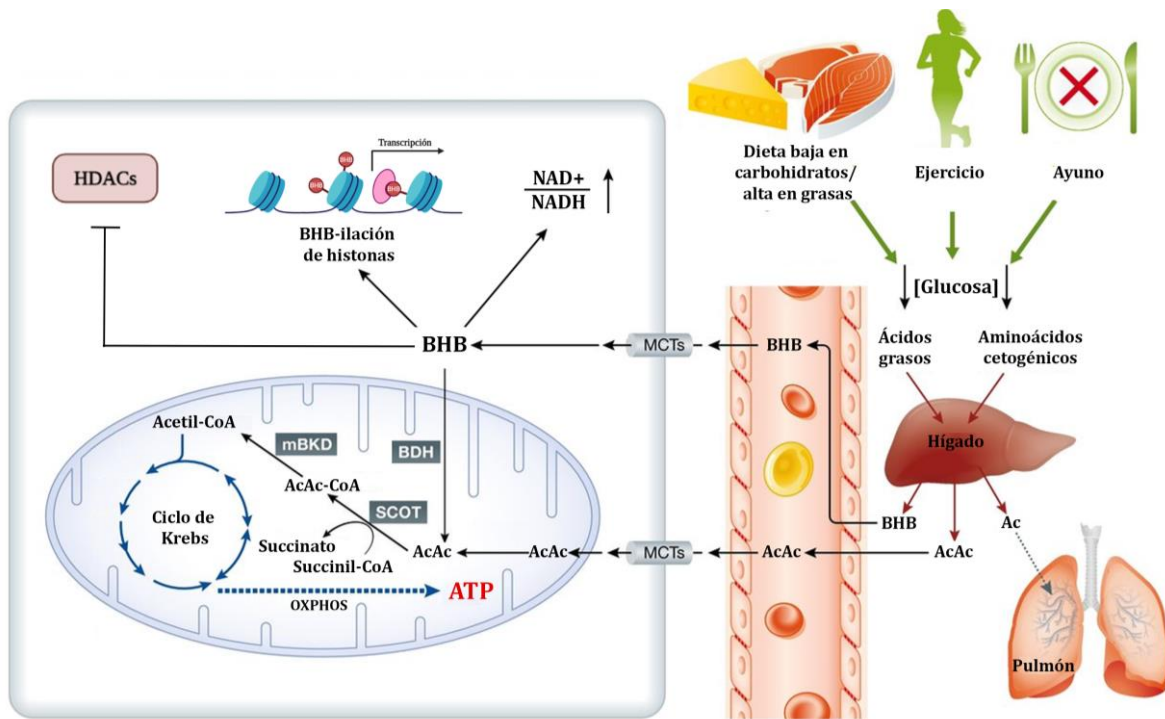


Figura 3 Esquema de la producción de cuerpo cetónicos en el cuerpo y sus efectos dentro de las células. Durante ayuno prolongado, ejercicio extenuante o dietas baja en carbohidratos/altas en grasa los niveles de glucosa en sangre disminuyen y se promueve la degradación de ácidos grasos en el hígado para formar tres cuerpos cetónicos, la acetona (Ac), el acetoacetato (AcAc) y el 3-β-hidroxiacetato (BHB). La acetona al ser volátil es exhalado por los pulmones mientras que el AcAc y el BHB entran al torrente sanguíneo y son captados por los demás tejidos extra hepáticos. El BHB y el AcAc ingresan a las células mediante transportadores de monocarboxilatos (MCTs, *Monocarboxylate transporters*) y dentro de la mitocondria ambos pueden ser metabolizados para producir energía. También se conocen otros efectos del BHB como la inhibición de las HDACs (*Histone Deacetylase*), modificar postraduccionalmente las histonas lo que se asocia con transcripción (BHB-ilación de histonas) y aumentar los niveles de NAD⁺/NADH en el citoplasma. BDH (*D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase*), SCOT (*Succinyl-CoA-Ketoacid-CoA transferase*), mBKD (*mitochondrial β-ketothiolase*), OXPHOS (*Oxidative Phosphorylation System*). Modificado de (Camandola & Mattson, 2017).

El cuerpo cetónico mas estudiado ha sido el D-BHB ya que se le han encontrado varias propiedades además del de funcionar como sustrato energético. Se ha descubierto que puede inhibir a las HDACs dependientes de Zinc (clase I, II y IV), ser neuroprotector en modelos de isquemia, fungir como antioxidante, estimular la función mitocondrial (Newman & Verdin, 2017). Además, metabolitos intermediarios que se producen de su metabolismo tienen un gran impacto en diversos mecanismos de señalización. Un aspecto en particular del D-BHB es su metabolismo dentro de la célula. A diferencia de la glucosa el D-BHB solo gasta una molécula NAD⁺ para formar 2 moléculas de acetil-CoA mientras que la glucosa necesita 4 moléculas de NAD⁺ (Elamin et al, 2017). Esto sugiere que puede mantener la producción de ATP sin reducir los niveles de NAD⁺ intracelulares. En estudios recientes se demostró que en neuronas tratadas con D-BHB aumentan los niveles de NAD⁺, la respiración mitocondrial e incluso se estimula la

producción de ATP (Marosi et al, 2016). En otro estudio se observó que los cuerpos cetónicos tienen una función neuroprotectora en un modelo de isquemia debido a la estimulación de la sirtuina 3 mitocondrial promoviendo la defensa antioxidante a través de regular al factor transcripcional FOXO3a (Yin et al, 2015), sin embargo se desconoce si el D-BHB es capaz de regular factores de transcripción importantes en los procesos de mitofagia y biogénesis lisosomal a través de estimular la actividad de sirtuinas. Por lo que en este proyecto se planteó resolver esta pregunta.

Pregunta experimental

¿Puede el D-β-hidroxibutirato estimular la mitofagia y la biogénesis lisosomal a través de la activación de factores de transcripción dependiente de las sirtuinas en neuronas corticales?

Objetivo

Valorar los cambios en la autofagia, mitofagia y biogénesis lisosomal inducidos por la exposición a D-β-hidroxibutirato en neuronas corticales de rata en cultivo y determinar si están mediados por la activación de factores de transcripción (FOXO1, FOXO3a y TFEB) y la actividad de las sirtuinas

Objetivos particulares

- Analizar la translocación al núcleo de factores de transcripción que regulan la mitofagia y biogénesis lisosomal en neuronas tratadas con D-BHB
- Evaluar los cambios en la autofagia y contenido de lisosomas en neuronas tratadas con D-BHB
- Evaluar cambios en la mitofagia en neuronas tratadas con D-BHB
- Analizar el efecto protector de la pre incubación del BHB ante diferentes tipos de estrés celular en neuronas corticales
- Analizar la participación de las sirtuinas en la activación de los factores de transcripción en neuronas tratadas con D-BHB

Metodología

- *Cultivo celular*

Cultivos primarios de neuronas de corteza fueron preparados a partir de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación. Después de la disección, el tejido obtenido de la corteza cerebral de 10-12 embriones, fue cortado en un rebanador e incubado en una solución de tripsina al 0.5 %. Los trozos de tejido fueron disgregados pasándolos por una malla en una solución con DNAsa e inhibidor de tripsina al 0.08 % y 0.52 %, respectivamente. Las células se resuspendieron en medio Neurobasal con 25 mM de glucosa (Gibco) suplementado con 1% de B27, 1% de B27 Minus AO, 0.5 mM de L-glutamina y 20 µg/ml de gentamicina (Sigma).

Las células se sembraron en cajas pre-cubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml) a una densidad de $2.2 \times 10^5/cm^2$. Las células se mantuvieron durante 8 días *in vitro* (DIV) a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ / 95% de aire. Cuatro días después de sembrar las células se añadió citosina arabinosa a una concentración final de 0.82 µM para inhibir la proliferación de las células gliales.

- *Tratamientos*

A los 8 DIV las neuronas fueron tratadas por diferentes tiempos (6, 12, 24 y 48 h) y con diferentes concentraciones de los siguientes compuestos: D-β-hidroxibutirato (5 mM; Sigma-Aldrich, 298360-1G), L-β-hidroxibutirato (5 mM; Sigma-Aldrich, H3145-1G), β-NAD (5 mM; Sigma, N-7004), cloroquina (20 µM; Sigma, C6628-25G), AGK2 (inhibidor de SIRT2, 5 µM; Merk Millipore, 566324-5MG)

- *qRT-PCR*

El RNA total se extrajo con el reactivo TRIZOL (Invitrogen). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de ARN con el uso del kit de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un termociclador de la siguiente manera: 25 °C durante 10 min, 37 °C durante 120 min y 85 °C durante 5 min. Se utilizaron 50 ng de cDNA para cada reacción y se usó el termociclador de tiempo real Rotor-Gene Q Thermocycler (Qiagen; Hilden, Germany). Las secuencias de los oligos utilizados fueron:

Nombre del gen	# de referencia en NCBI	Oligos 5'-3' (sitio de inicio del oligo en la secuencia de referencia)
<i>Lamp1</i>	NM_012857.2	(1022) CCACGTTTCAGCACCTCCA (1185) GACCCAAACCTGTCACCTTTCTAC
<i>Lamp2</i>	XM_006257486.4	(2499) AGCCCAATGCCTAACACATC (2655) CTGCCCTCCCAATAACAAGA
<i>Ctsb</i>	NM_022597.2	(257) AGGCTGGACGCAACTTCTAC (400) ACTGTTCCCGTGCATCAAA
<i>Ctsd</i>	NM_134334.3	(1248) CCTGGGGGATGTCTTTATTG (1316) GCAAAGCCGACCCTATT

<i>Atg5</i>	NM_001014250.2	(513) ATATGAAGGCACACCCCTGA (672) GTGAGCCTCAACTGCATCCT
<i>Rab7</i>	NM_023950.4	(393) GGCCTTCTACAGAGGTGCAG (580) TCTTTGTGGCCACTTGTCTG
<i>Map1lc3a</i>	NM_199500.2	(185) GACCGGCCTTTCAAGCAG (293) CCTTGTAGCGCTCGATGAT
<i>Sqstm1</i>	NM_175843.5	(98) CGCTTCAGCTTCTGCTTCAG (286) GGCCATTGTCAGTTCCTCAT
<i>Tuba1a</i>	NM_022298.1	(1252) GATCTGATGTATGCCAAGCG (1388) TCCACAGAATCCACACCAAC

La expresión de *Tuba1a* fue utilizada como gen normalizador.

- *Fraccionamiento subcelular*

Las células se cultivaron en cajas de 60 mm. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS 0.1 M frío, se recolectaron en buffer A (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, HEPES 20 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 al 0.1%, DTT 1 mM y 2 mg/ml de inhibidor de proteasas), se transfirieron a un tubo eppendorf, se agitaron suavemente en un agitador de balanceo durante 10 min a 4 °C y se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó a un nuevo tubo, esta fracción se tomó como el extracto citoplasmático. El sedimento se lavó y se resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, SDS al 1% y 2 mg/ml de inhibidor de proteasas), esta porción se tomó como la fracción nuclear.

- *Análisis mediante Inmunoblot*

Después de los diferentes tratamientos, células cultivadas en cajas de 35 mm se lavaron con PBS 0.1 M enfriado con hielo y se lisaron con un buffer de lisis que contenía: Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato sódico 0.5%, SDS 1% y 2 mg/ml de inhibidor de proteasas (Complete, Roche); se centrifugaron a 1500 g a 4 °C durante 5 min. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y se separaron 30 µg de proteína en geles de SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF de 0.45 µm (Merck Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5 % en buffer TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1 %) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 24 h a 4 °C. Los siguientes anticuerpos primarios usados y sus diluciones fueron: FOXO1 (1:3000, Cell Signaling, 2880S), FOXO3a (1:1000, Cell Signaling, 2497S), TFEB (1:1000, Abcam, ab2636), PGC-1α (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-5816), ATG5 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, sc-133158), LC3 (1:6000, MBL, PD014), p62/SQSTM1 (1:2000, Cell Signaling, 5114S), TOM20 (1:8000, Cell Signaling, D8T4N), COX IV (1:3000, Cell Signaling, 11967S), CTSB (1:3000, Sigma, C6243), LAMP2 (1:7000, Sigma, L0668), SIRT2 (1:1000, Sigma, S5313), H1.0 (1:10000, Abcam, ab11079), GAPDH (1:16000, Cell Signaling, 2118), Actina (1:8000, Merck Millipore, MAB1501). Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón de

cabra acoplados a la enzima peroxidasa y se detectó la inmunoreactividad mediante el sustrato HRP quimioluminiscente (Merck Millipore). Las membranas se revelaron en el equipo C-DiGit Scanner (LI-COR) y las imágenes se analizaron con el programa ImageJ.

- *Viabilidad celular*

Ensayo de MTT

Como índice de sobrevivencia celular se evaluó la formación de la sal de formazán a partir de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es un indicativo de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. Después de los correspondientes tratamientos las células se incubaron con MTT 150 μ M durante 1 h a 37 °C; terminado la incubación se retiró el medio y se añadió isopropanol-HCL para solubilizar las sales de formazán precipitadas. La absorbancia del formazán se midió con un espectrómetro de luz visible a 570 nm. La viabilidad celular se expresa como porcentaje de la reducción del MTT con respecto al control.

Liberación de LDH

Como indicativo de muerte celular se cuantificó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberado al medio de cultivo. Después de la exposición de las células a los correspondientes tratamientos, se colectó medio de cultivo de las células tratadas y se añadió a un buffer de K_2HPO_4/KH_2PO_4 (50 mM, pH 7,5) con NADH (9.4 mM). Para iniciar la reacción se añadió piruvato (20 mM) a la mezcla y se cuantificó la disminución de la fluorescencia del NADH a 340 nm después de 5 min en un espectrofotómetro. Los datos se expresan como porcentaje de actividad LDH en el medio respecto al control. La actividad de LDH en cultivos control no expuestos a los tratamientos se normalizó a 0%.

- *Transfección de neuronas*

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos y al día *in vitro* 4 se transfectaron con 2 μ g de ADN plasmídico por pozo utilizando como reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (ThermoFisher, 11668-019). Se usó una relación de 1:3 de μ g de ADN plasmídico y μ l de lipofectamina. Las neuronas se incubaron con la mezcla de transfección por 24 horas. Se transfectó el plásmido pmRFP-LC3 (Addgene, #21075) proveído amablemente por la Dr. Susana Castro Obregón.

- *Inmunofluorescencia*

Las células previamente transfectadas se expusieron a 5 mM de D-BHB por 24 horas. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS frío 0,1 M y se fijaron con paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se bloquearon con PBS-Albumina al 5%, Triton X-100 al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó las células con un anticuerpo contra TOM20 (1:250,

Cell Signaling) durante toda la noche a 4 °C y después se usó un anticuerpo anti-conejo Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Por último, los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst al 0,001% (Sigma-Aldrich, 33258) en PBS y se cubrieron con Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, 17984).

- *Análisis de Mitofagia*

Por cada cubreobjetos con neuronas transfectadas con RFP-LC3 e inmunofluorescencia contra TOM20, se tomaron 7 campos con distintas neuronas identificadas como transfectadas por la presencia de puntos fluorescentes rojos utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 invertido y un objetivo de 63x/1.4 NA. De cada imagen se obtuvo la máxima proyección a partir de un z-stack y se analizaron con el programa CellProfiler. Se delimitaron las células y se cuantificó el número y área de partículas RFP-LC3 positivas por célula. Después de haber detectado las partículas RFP-LC3 se cuantificó la colocalización de cada partícula con inmunoreactividad a TOM20 (en color verde) utilizando el coeficiente de Pearson. Aquellas partículas con un coeficiente mayor a 0.5 se tomaron como partículas colocalizantes positivas. De estas partículas se midió su área y se sumó el área total de partículas colocalizantes por célula.

- *Detección de autofagosomas y lisosomas*

Antes y después de los correspondientes tratamientos, a células sembradas en cajas de 35 mm se les agregó 1 µL de Cyto-ID (Enzo life sciences) por mililitro de medio o 200 nM de LysoTracker red (Thermo scientific) directamente al medio neurobasal. Ambos compuestos se pre-incubaron por 5 minutos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio vertical de excitación de dos fotones (LSM 710, Carl Zeiss, Alemania) equipado con un láser infrarrojo pulsado Chameleon Ultra II, se usó un objetivo de 63x/1.0 M27. El Cyto-ID y el LysoTracker se excitaron a 860 nm y se detectaron a 516 y 590 nm, respectivamente. De cada imagen se obtuvo la máxima proyección a partir de un z-stack de 5 µm de grosor y se analizaron con el programa CellProfiler. Se usó la fluorescencia de NADH para delimitar las células y se cuantificó el número de partículas LysoTracker o Cyto-ID positivas por célula.

- *Auto fluorescencia de NADH*

El NADH de células sembradas en cajas de 35 mm se excitó usando un microscopio vertical de excitación de dos fotones (LSM 710, Carl Zeiss, Alemania) equipado con un láser infrarrojo pulsado Chameleon Ultra II, se usó un objetivo de 63x/1.0 M27. El NADH se excitó a 730 nm y se detectó a 460 nm. De cada imagen se obtuvo la máxima proyección a partir de z-stack de 5 µm de grosor y se analizaron con el programa Cellprofiler. Se delimitaron las células y se cuantifico la fluorescencia del NADH por célula.

- *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se presentan como la media +/- el error estándar de al menos tres experimentos independientes. Posteriormente se analizaron estadísticamente usando ANOVA de una vía o seguido de la prueba de Fisher con significancia estadística de $p < 0.05$ en el software GraphPad Prisma 6.

Resultados

El BHB estimula la translocación al núcleo de factores de transcripción esenciales para la autofagia y la biogénesis lisosomal

Como modelo experimental se utilizaron cultivos primarios de neuronas corticales. Estudios previos han demostrado que una concentración de 5 mM de D-β-hidroxi-butarato (D-BHB) es capaz de inducir la expresión de *Bdnf* y aumentar la expresión de proteínas antioxidantes como SOD2 (Marosi et al, 2016), proteínas que son conocidas por ser reguladas por los factores de transcripción FOXO1 y FOXO3a, es por tal motivo que se decidió utilizar 5 mM de D-BHB para los siguientes experimentos.

Para determinar si el D-BHB induce la translocación al núcleo de factores de transcripción importantes en la regulación de la autofagia y la biogénesis lisosomal se realizaron fraccionamientos subcelulares de neuronas corticales tratadas con D-BHB a diferentes tiempos usando la dosis de 5 mM de D-BHB. Se observó mediante western blot que la incubación de D-BHB en neuronas corticales aumentó la translocación al núcleo de los factores de transcripción FOXO1 (**Fig. 4A**) y FOXO3a (**Fig. 4B**) desde las 12 horas y 6 horas, respectivamente, y en ambas proteínas se mantuvo significativo hasta las 48 horas. Estos resultados indican que el D-BHB no solo induce la expresión de estos factores de transcripción como se había visto previamente (Kim et al, 2019; Shimazu et al, 2013), también estimula su presencia en el núcleo en neuronas corticales y posiblemente regular la expresión de genes río abajo.

De igual manera se analizó si la incubación de D-BHB en neuronas corticales regula la translocación de otro importante regulador de la autofagia y de la biogénesis lisosomal como es TFEB. Neuronas tratadas con D-BHB presentaron un aumento progresivo con respecto al tiempo de los niveles de TFEB en el núcleo (**Fig. 5A**) indicando que el D-BHB aumenta la presencia en el núcleo de otros factores de transcripción además de los FOXOs.

Al observar que los factores de transcripción TFEB y FOXO aumentan su presencia en el núcleo en neuronas tratadas con D-BHB, se decidió evaluar la expresión de genes río abajo de estos factores de transcripción. TFEB y FOXO expresan genes relacionados con la maquinaria de degradación lisosomal y la autofagia. Mediante qRT-PCR se observó un aumento en genes de proteasas lisosomales llamados catepsinas (*Ctsb* y *Ctsd*) y proteínas de importación lisosomal (*Lamp1* y *Lamp2*) en neuronas tratadas por 24h o 48h con D-BHB (**Fig. 5B**). Además también se observó un aumento significativo en la expresión de genes de autofagia como *Atg5*, *Rab7*, *Map1lc3a* (*gen de la proteína LC3*) y *Sqstm1* (*gen de la proteína p62/SQSTM1*) (**Fig. 5B**). Estos resultados sugieren que el D-BHB es capaz de promover la expresión de genes importantes para la autofagia y la biogénesis lisosomal a través de aumentar la translocación al núcleo de factores de transcripción como son los FOXOs y TFEB.

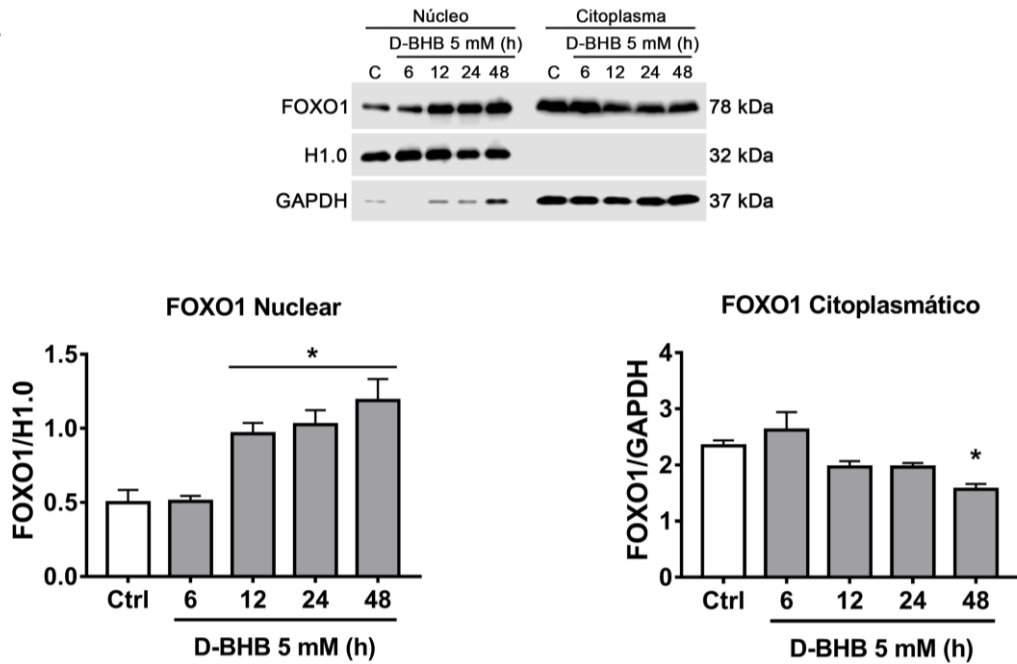
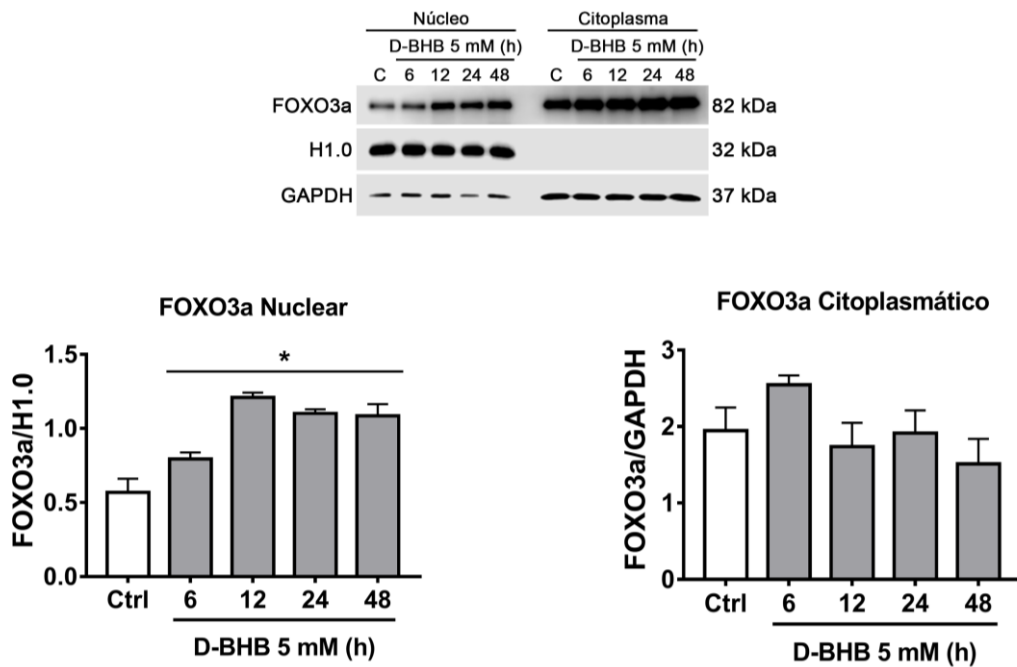
A**B**

Figura 4 Translocación nuclear de FOXO1 y FOXO3a en neuronas corticales tratadas con D-BHB. **A)** Análisis de la localización de FOXO1 mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de FOXO1 en el núcleo y citoplasma. **B)** Análisis de la localización de FOXO3a mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de FOXO3a en el núcleo y citoplasma. La histona H1.0 fue usada como control de carga de núcleo y GAPDH como control de citoplasma. Datos representados como promedio y \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba pos-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control. h=horas.

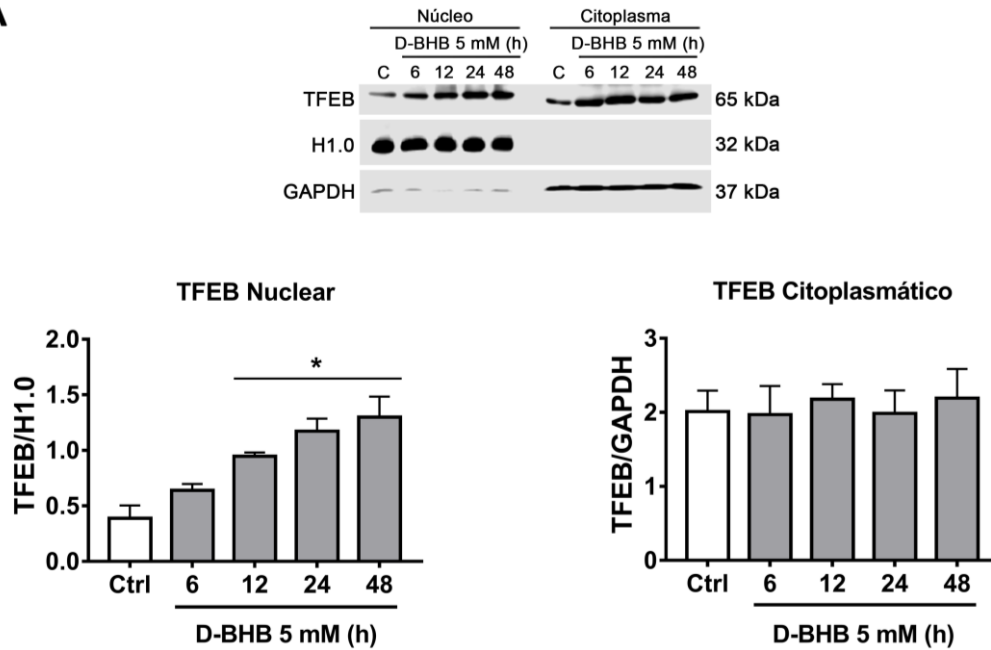
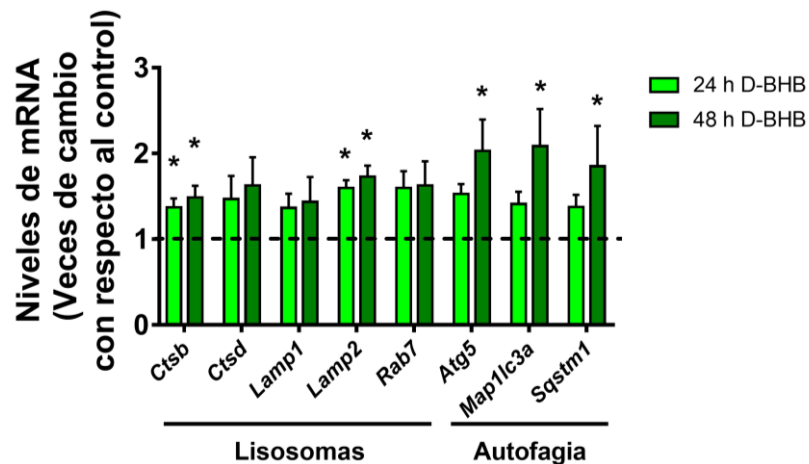
A**B**

Figura 5 Translocación de TFEB en neuronas corticales tratadas con D-BHB. **A)** Análisis de la localización de TFEB mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de TFEB en el núcleo y citoplasma. **B)** Expresión de genes regulados por TFEB y los factores de transcripción FOXO1 y FOXO3a detectados por qRT-PCR en neuronas corticales expuesto a 5 mM de D-BHB por 24 o 48 horas; n=3, * p<0.05 vs control. Datos representados como promedio y \pm error estándar de 3 **(A)** o 4 **(B)** experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba pos-hoc de Fisher. * p<0.05 vs control. h=horas.

El D-BHB activa la autofagia y la biogénesis lisosomal en neuronas corticales

Al observar que se regulan positivamente genes de autofagia en neuronas tratadas con D-BHB, se evaluó si en estas células realmente se estaba activando el mecanismo de autofagia. Para ello se evaluó los niveles de proteínas iniciadoras de la autofagia como es el caso del complejo ATG5-ATG12. La unión covalente de ATG5 con ATG12 es requerida para que se activen y puedan lipidar a la proteína LC3-I. Mediante Western blot se observó que los niveles del complejo ATG5-ATG12 aumentaron significativamente desde las 12 horas (**Fig. 6A**). Esto sugiere que la maquinaria para la iniciación de la autofagia se está activando.

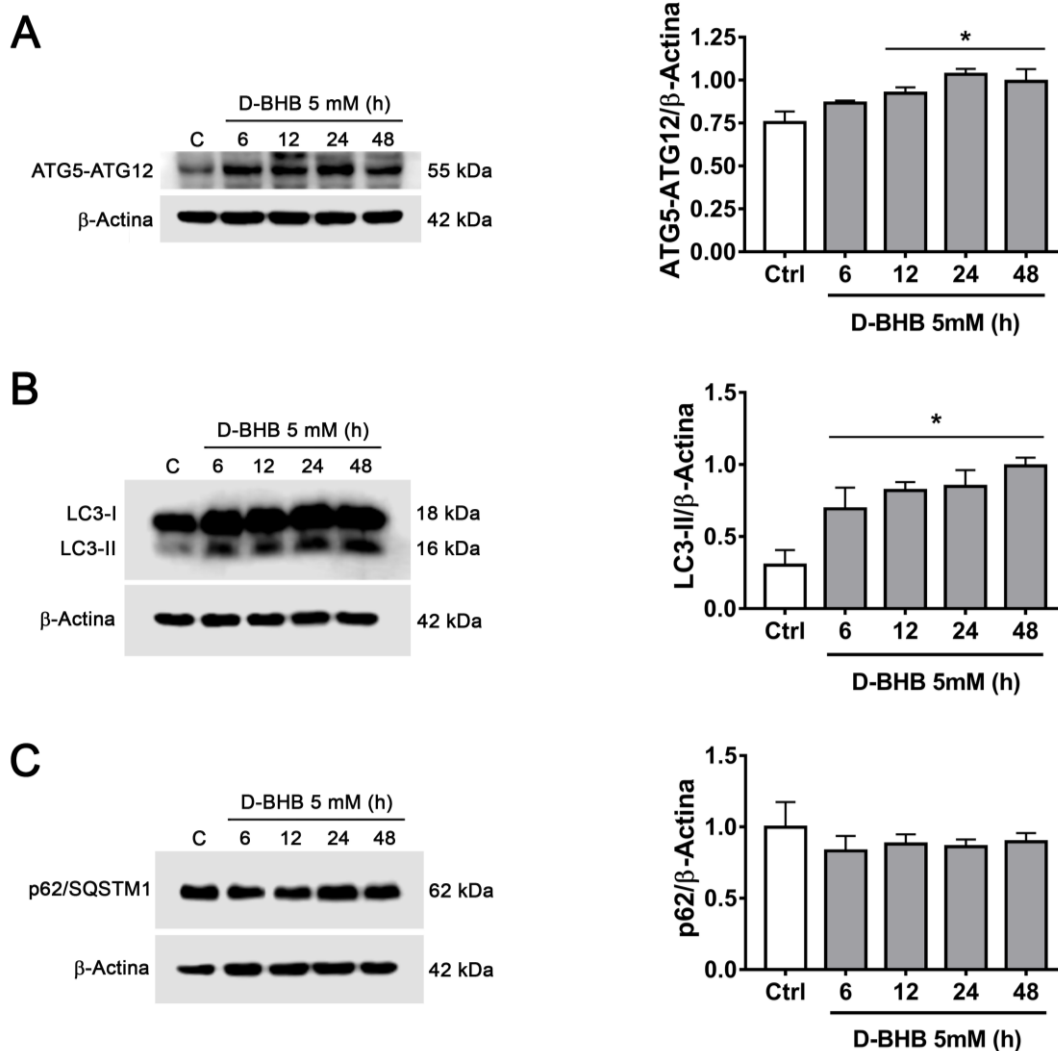


Figura 6 El D-BHB induce autofagia en neuronas corticales. **A)** Western blot representativo y cuantificación de ATG5-ATG12/ β -actina. **B)** Western blot representativo y cuantificación de LC3-II/ β -actina. **C)** Western blot representativo y cuantificación de p62/ β -actina. Datos representados como

promedio y \pm error estándar de 3 **(A)** o 4 **(B, C)** experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba pos-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control. h=horas.

Después se evaluó la lipidación de LC3-I en LC3-II, marca característica de la formación de autofagosomas y los niveles de la proteína p62/SQSTM1 el cual es un indicativo de que hay degradación autofágica. Se observó que la formación de LC3-II aumentó rápidamente siendo significativo con respecto al control desde las 6 horas de tratamiento con D-BHB **(Fig. 6B)**, mientras que los niveles de p62/SQSTM1 no cambiaron con la incubación de D-BHB **(Fig. 6C)** por lo que estos resultados sugieren que el D-BHB promueve la formación de autofagosomas.

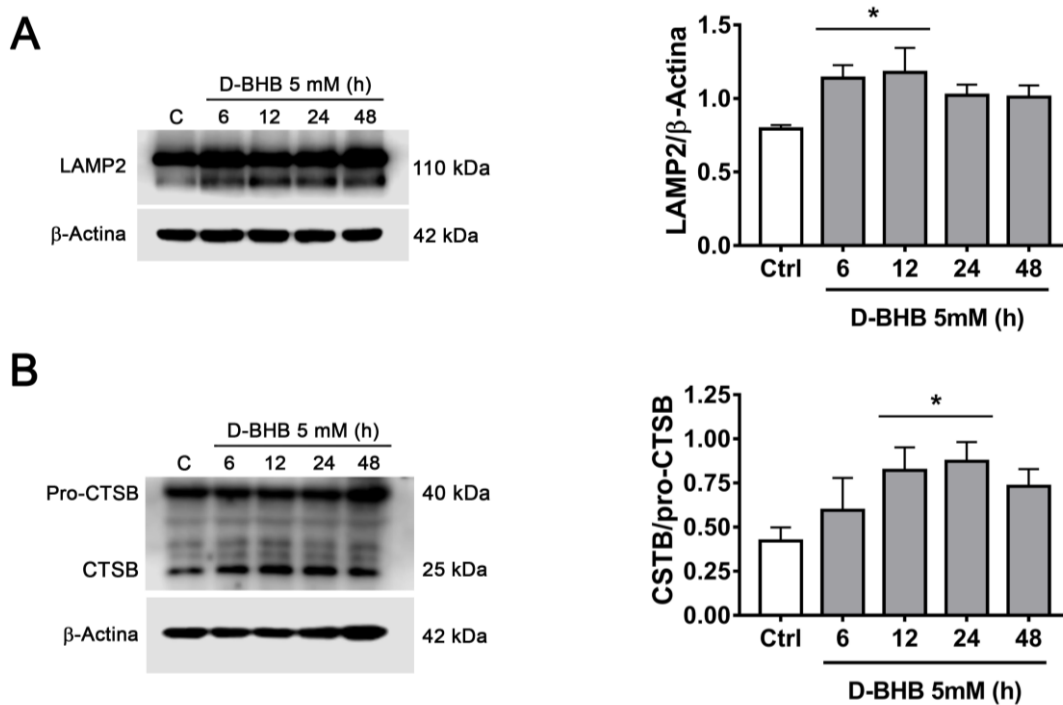


Figura 7 El D-BHB induce un aumento en proteínas lisosomales. **A)** Western blot representativo y cuantificación de LAMP2/ β -actina. **B)** Western blot representativo y cuantificación de CTSB/pro-CTSB. Datos representados con promedio y \pm error estándar de 5 **(A)** o 4 **(B)** experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba pos-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control. h=horas.

TFEB es el regulador maestro de la biogénesis lisosomal, es por tal motivo que se evaluó mediante Western blot la abundancia de proteínas lisosomales. LAMP2 es una proteína transmembranal que recubre los lisosomas, en neuronas tratadas con D-BHB se observó que los niveles de esta proteína incrementaron ligeramente en las primeras

horas de tratamiento (**Fig. 7A**). Por otro lado se evaluó también el nivel de CTSB. Esta proteasa que habita en los lisosomas, como cualquier otro zimógeno se encuentra de forma inactiva como pro-CTSB pero cuando es activada por la acidificación del lisosoma sufre autoproteólisis formando la forma CTSB activa. Mediante Western blot se puede observar la activación de esta proteasa como indicativo de la actividad lisosomal. Se observó que la incubación de D-BHB en neuronas corticales aumenta la forma activa de CTSB (**Fig. 7B**) sugiriendo que este cuerpo cetónico aumenta los niveles y la activación de proteínas lisosomales.

El D-BHB estimula el flujo autofágico y la degradación de mitocondrias en neuronas corticales.

El incremento en genes y proteínas relacionados con la biogénesis lisosomal y la autofagia en neuronas tratadas con BHB indica que hay una regulación positiva de procesos degradativos, sin embargo, aún se desconoce si este cuerpo cetónico es capaz de aumentar el flujo autofágico y la degradación de mitocondrias (mitofagia) en neuronas sanas. Para tratar de contestar esta hipótesis se bloqueó la degradación lisosomal tratando las neuronas con cloroquina (CQ), un compuesto que aumenta el pH de los lisosomas previniendo así la función de las enzimas líticas. Primero se evaluó de manera general si el D-BHB aumenta la degradación autofágica mediante la detección de los niveles de LC3 y p62/SQSTM1 en presencia o ausencia de CQ. Mediante inmunoblot se observó que en condiciones control bloquear la degradación lisosomal por 4 horas con CQ aumenta los niveles de LC3-II (**Fig. 8A**) indicando que hay un constante flujo autofágico de manera basal en las neuronas. Cuando las neuronas fueron incubadas con D-BHB por 24h se observa un claro incremento en los niveles LC3-II los cuales aumentan aún más con el tratamiento de CQ (**Fig. 8A**), indicando que el D-BHB no sólo aumenta la formación de autofagosomas, también promueve su degradación. Igualmente se midió el cambio en los niveles de p62/SQSTM1, sin embargo, sólo se observó una acumulación significativa de esta proteína en presencia de D-BHB y cloroquina (**Fig. 8B**), sugiriendo que en condiciones basales la degradación de esta proteína no es alta pero se estimula en presencia de D-BHB.

Hasta el momento nuestros resultados indican que el D-BHB aumenta la degradación de autofagosomas, sin embargo, se desconoce si podría estar aumentado la degradación de componentes u organelos específicos como mitocondrias (mitofagia). Para ello, utilizando la misma estrategia se investigó la degradación de proteínas mitocondriales como indicativo de mitofagia. Se investigaron dos proteínas mitocondriales, TOM20 y COX IV. TOM20 es una proteína transmembranal que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y COX IV es una proteína que forma parte la cadena transportadora de electrones localizada en la membrana interna mitocondrial.

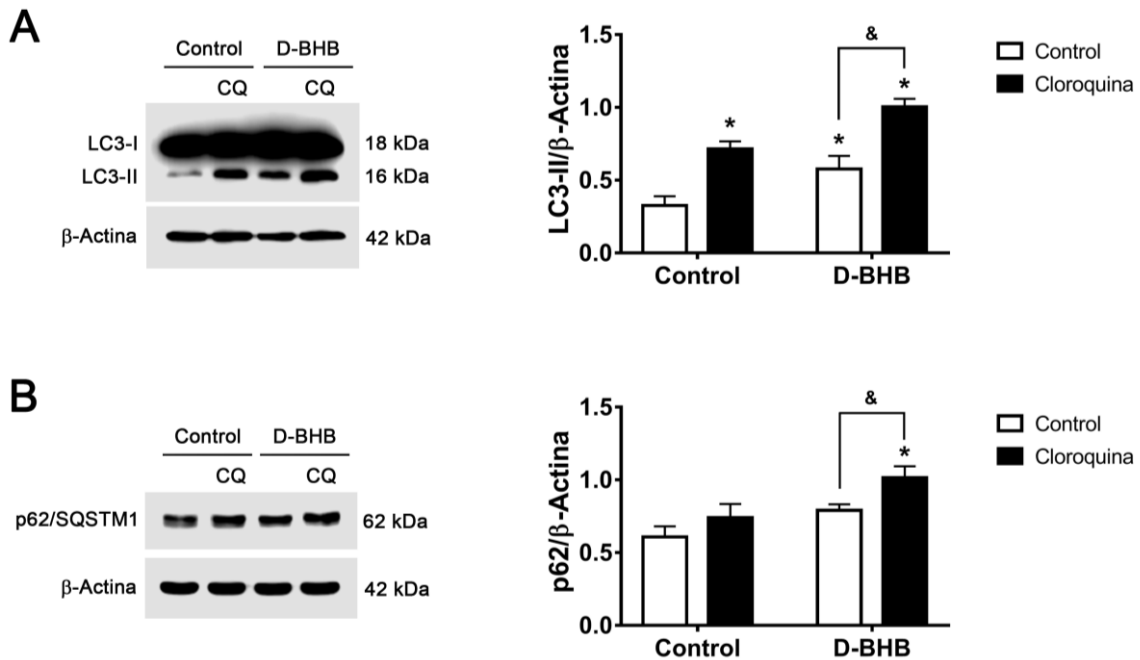


Figura 8 Aumento de la degradación de LC3-II y p62 en neuronas corticales tratadas con D-BHB. Western blot representativo y cuantificación de **A**) LC3-II/β-actina y **B**) p62/β-actina de neuronas corticales tratadas o no con D-BHB (5 mM) por 24h y con o sin CQ (20 μM) por 4h. Datos expresados como promedio y ± error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de dos vías seguido por una prueba post hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control; & $p < 0.05$ vs D-BHB sin CQ. h=horas.

En condiciones control se observó que el tratamiento con CQ no aumenta los niveles de TOM20 ni de COX IV (**Fig. 9A, B**) sugiriendo que estas proteínas no se degradan en gran medida vía lisosomal de manera basal. Cuando las neuronas fueron tratadas con D-BHB se observa un claro incremento en los niveles de TOM20 (*Translocase of outer mitochondrial membrane 20*) y COX IV (*Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1*), sin embargo, cuando se inhibió la degradación lisosomal con CQ se observa una mayor abundancia de estas proteínas con respecto al tratamiento de D-BHB solo (**Fig. 9A, B**), por lo que estos resultados sugieren que de manera basal la degradación vía lisosomal de proteínas mitocondriales es muy baja pero el tratamiento con D-BHB estimula la expresión y la degradación de estas proteínas, o de las mitocondrias completas.

Para corroborar si efectivamente el D-BHB está estimulando la mitofagia se usó otra estrategia experimental. Se transfetaron neuronas con un plásmido que codifica para la proteína RFP-LC3 (*Red fluorescent protein - LC3*), lo que permite observar la formación de autofagosomas y para observar las mitocondrias se fijaron las neuronas y se les realizó una inmunofluorescencia contra TOM20. Usando microscopia confocal, esta estrategia nos permite observar el número de autofagosomas y cuales colocalizan con mitocondrias en neuronas tratadas con D-BHB.

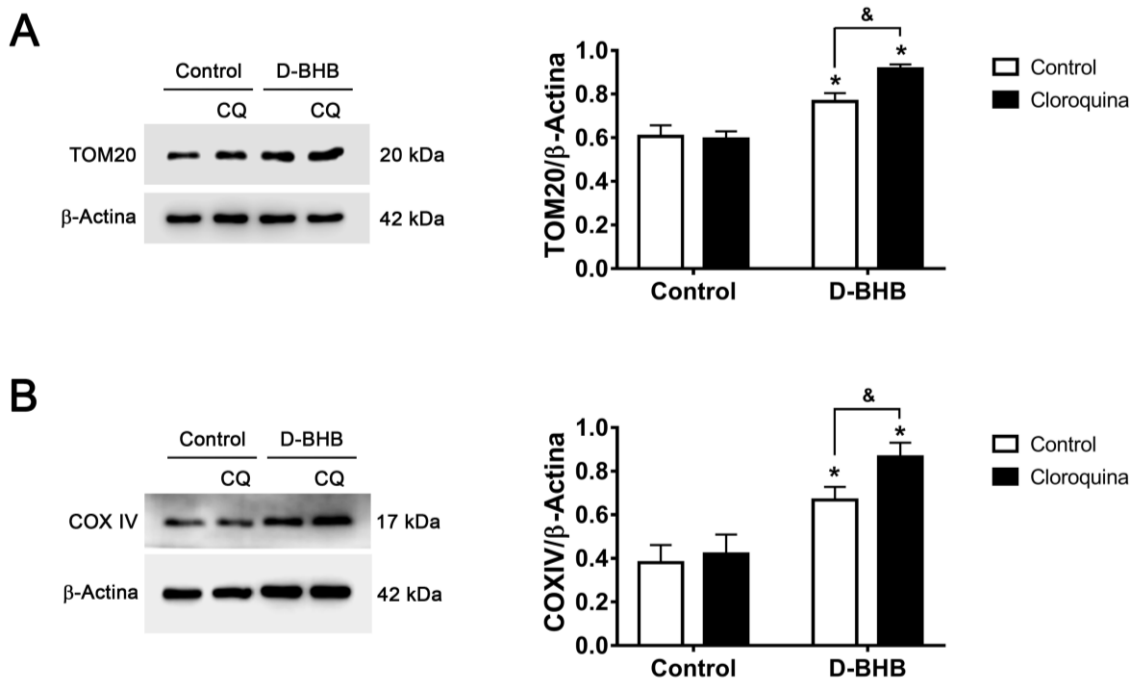


Figura 9 Aumento de la degradación de TOM20 y COX IV en neuronas corticales tratadas con D-BHB. Western blot representativo y cuantificación de **A)** TOM20/ β -actina y **B)** COXIV/ β -actina de neuronas corticales tratadas o no con D-BHB (5 mM) por 24h y con o sin CQ (20 μ M) por 4h. Datos expresados como promedio y \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control; & $p < 0.05$ vs D-BHB sin CQ. h=horas.

De manera basal se observó que las neuronas control muestran un bajo número de partículas positivas a RFP-LC3 (autofagosomas), utilizando nuevamente la CQ como bloqueador de la degradación lisosomal se observó que el número de autofagosomas por célula aumenta significativamente en neuronas tratadas con CQ, esto está en concordancia con el resultado previo de Western blot donde se observa que hay mayores niveles de LC3-II cuando se bloque el flujo autofágico. Sin embargo, este mayor número de autofagosomas no correlaciona con un aumento en el número o área total de partículas positivas a TOM20-LC3 (**Fig. 10A-D**) indicando que de manera basal la mitofagia en neuronas es baja. Cuando las neuronas fueron incubadas con D-BHB se vuelve a observar un claro aumento en el número de autofagosomas con respecto al control pero cuando se bloquea el flujo autofágico con CQ, el número de autofagosomas por célula aumenta aún más en neuronas incubadas con D-BHB. De manera interesante en esta condición, bloquear el flujo autofágico con CQ no solo aumentó el número de autofagosomas, también indujo un aumento significativo en el número y área total de partículas TOM20-LC3 colocalizando por célula con respecto a la condición control (**Fig. 10A-D**), por lo que en conjunto estos resultados indican que la incubación de D-BHB en neuronas corticales estimula la mitofagia.

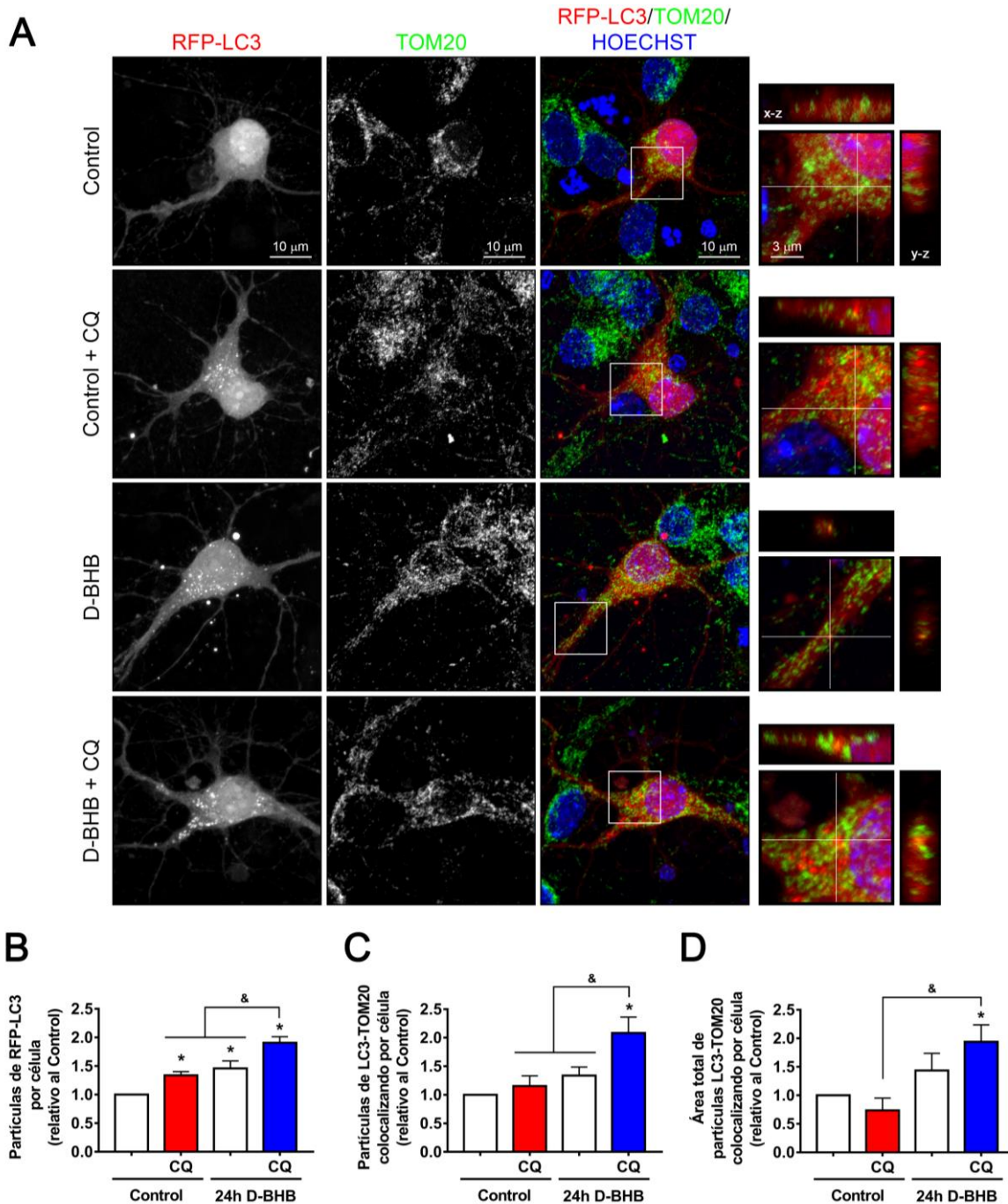


Figura 10 Análisis del efecto del D-BHB sobre la mitofagia en neuronas corticales mediante la colocalización de RFP-LC3 y TOM20. **A)** Imágenes representativas de neuronas transfectadas con RFP-LC3 (rojo) y con inmunofluorescencia contra TOM20 (verde), incubadas o no con D-BHB (5mM) por 24 h y tratadas con cloroquina (CQ, 20 μ M) por 4 horas para bloquear el flujo autofágico. Se muestran imágenes de zoom óptico de partículas RFP-LC3 colocalizando con partículas TOM20 positivas junto con imágenes ortogonales y-z (derecha) y x-z (arriba). Se usó Hoechst (azul) como marcador para los núcleos. **B)** Número de partículas RFP-LC3 por célula. **C)** Número de partículas LC3-TOM20 colocalizando por célula. **D)** Área total de partículas LC3-TOM20 colocalizando por célula. Datos expresados como promedio y \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos

mediante ANOVA de dos vías seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * p<0.05 vs control; & p<0.05 vs condición. h=horas.

Por otro lado, al observar que el D-BHB estimuló los niveles de TOM20 en neuronas, se decidió investigar más sobre la participación de BHB en la biogénesis mitocondrial. Existe un coactivador transcripcional que regula la expresión de genes relacionados con la biogénesis y función lisosomal llamado PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*). Este coactivador es estimulado por dietas cetogénicas o condiciones de ayuno en el hígado de ratones (Jornayvaz et al, 2010; Olivares & Henkel, 2017), pero aún se desconoce con exactitud si el D-BHB regula a este factor de transcripción en neuronas sanas. Primero mediante qRT-PCR se observó que la incubación de D-BHB en neuronas aumenta la expresión a las 24 horas de *Pgc1 α* (**Fig. 11A**) y de un gen regulado por este coactivador transcripcional que regula la síntesis de DNA mitocondrial llamado *Tfam* (*Mitochondrial transcription factor A*) (**Fig. 11B**). Además mediante fraccionamiento subcelular se observó que los niveles de PGC1 α aumentan en el núcleo de neuronas tratadas con D-BHB (**Fig. 11C**), indicando que este coactivador transcripcional podría estar aumentando los niveles de proteínas mitocondriales. Para acercarnos a responder esta hipótesis se evaluó los niveles de la proteína mitocondrial TOM20 en el curso temporal de incubación con D-BHB (**Fig. 11D**). Se observó un claro aumento de esta proteína mitocondrial con la incubación del cuerpo cetónico en las neuronas sugiriendo que PGC1 α está aumentando la biogénesis de nuevas mitocondrias.

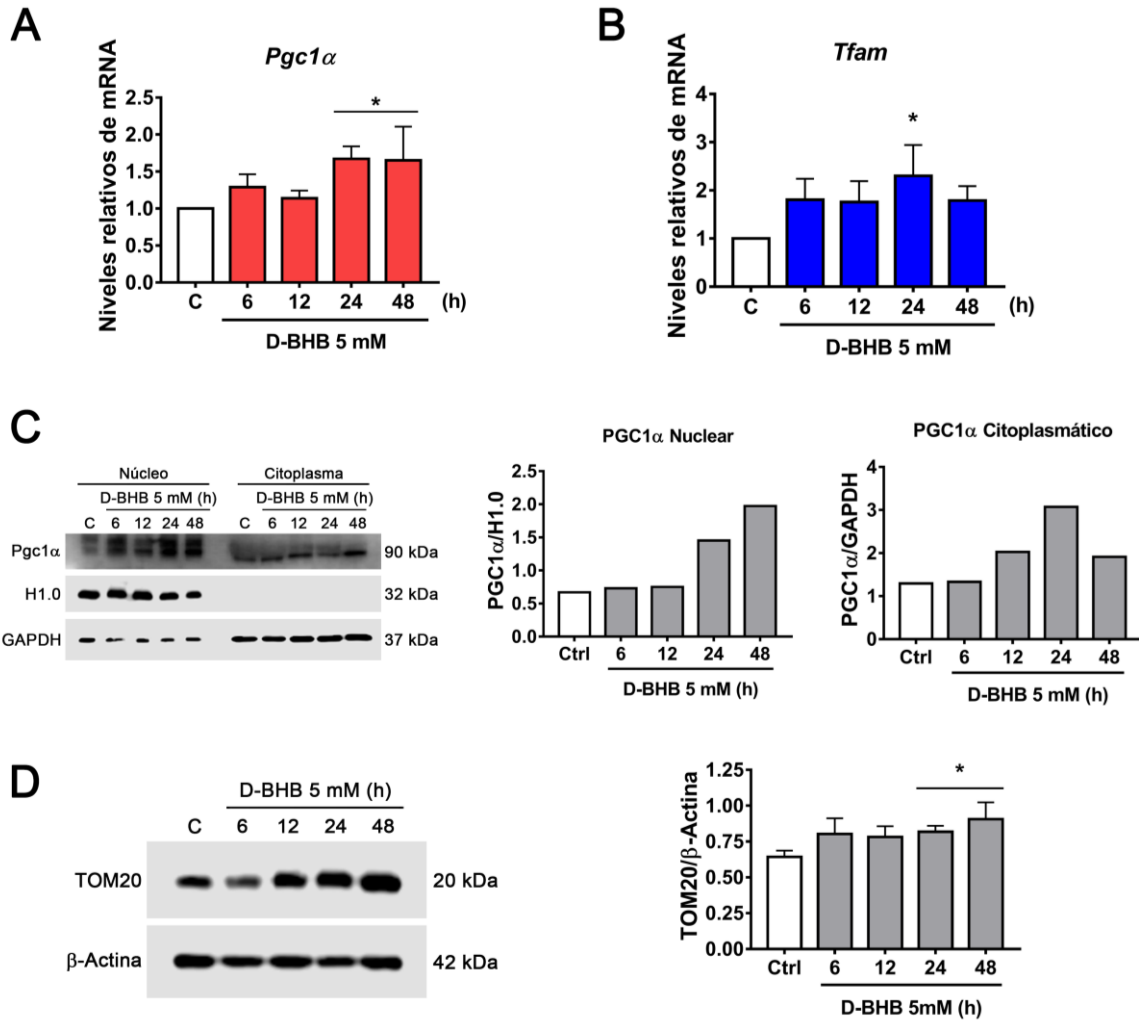


Figura 11 Análisis del efecto del D-BHB sobre la biogénesis mitocondrial en neuronas corticales. Expresión de **A)** *Pgc1α* y **B)** *Tfam* detectados por qRT-PCR en neuronas corticales expuesto a 5 mM de D-BHB por diferentes tiempos. **C)** Análisis de la localización de PGC1α mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de PGC1α en el núcleo y citoplasma. **D)** Western blot representativo y cuantificación de TOM20/β-actina. Datos expresados como promedio y ± error estándar de 1 (**C**) o 4 (**A, B y D**) experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control. h=horas.

La exposición continua a D-BHB confiere efectos neuroprotectores a neuronas corticales ante estrés mitocondrial y energético

Hasta el momento, los resultados descritos previamente indican que el tratamiento de D-BHB en neuronas corticales estimula la biogénesis lisosomal y la autofagia posiblemente a través de la translocación de FOXO y TFEB al núcleo. Sin embargo, se desconoce si la estimulación de estos procesos por el tratamiento del D-BHB confiere un efecto neuroprotector o sensibiliza a las neuronas ante diferentes

estímulos nocivos. Para ello se decidió evaluar la muerte celular y la viabilidad neuronal ante diversos tipos de estrés celular. Como primer objetivo se decidió evaluar si el tratamiento de BHB en neuronas corticales confiere protección ante un estresor mitocondrial como es el compuesto CCCP (*Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*). Este compuesto despolariza las mitocondrias gracias a su capacidad de disipar el gradiente de protones, inhibiendo así la función mitocondrial. Además para estos experimentos se decidió incluir al isómero no metabolizable del BHB, el L-β-hidroxitirato (L-BHB) para determinar si el efecto del D-BHB es debido a que está siendo metabolizado por la célula.

Mimetizando una dieta cetogénica, las neuronas fueron pre incubadas 24 o 48 horas con D-BHB o L-BHB, posteriormente se les retó a 24 horas de CCCP y se les evaluó la muerte neuronal (liberación de LDH al medio) y la viabilidad neuronal (Reducción de MTT) (**Fig. 12A**). El ensayo de MTT es un indicativo de la actividad enzimática de deshidrogenasas mitocondriales, cuando se sometieron las neuronas a CCCP se observó un decremento significativo de la viabilidad neuronal el cual es recuperado cuando las neuronas fueron pre incubadas con D-BHB pero no así con L-BHB (**Fig. 12B**). Esta concentración de CCCP induce un ligero aumento en la actividad de LDH en el medio pero de igual manera se observa que en las neuronas tratadas con D-BHB se reduce la muerte neuronal (**Fig. 12C**). Curiosamente el tratamiento de 48 horas con el isómero L también disminuyó la muerte neuronal. Estos resultados indican que el D-BHB confiere un efecto neuroprotector ante un daño mitocondrial.

Siguiendo con la evaluación del efecto neuroprotector del D-BHB, se sometieron las neuronas a una condición de estrés energético generada por la ausencia y reintroducción de glucosa (AG/RG) (**Fig. 12D**). De manera consistente se observó que el tratamiento de 24 o 48 horas con D-BHB recupera significativamente la viabilidad celular y disminuye la muerte neuronal ante la AG/RG (**Fig. 12E, F**), lo cual no ocurrió con el L-BHB, sin embargo, nuevamente de manera interesante la incubación prolongada del isómero L por 48 horas redujo la muerte neuronal ante la AG/RG sugiriendo que también es capaz de inducir un efecto protector pero probablemente por un mecanismo diferente al isómero D ya que no es metabolizable. En general estos resultados indican que el D-BHB confiere un efecto neuroprotector ante una condición de estrés energético.

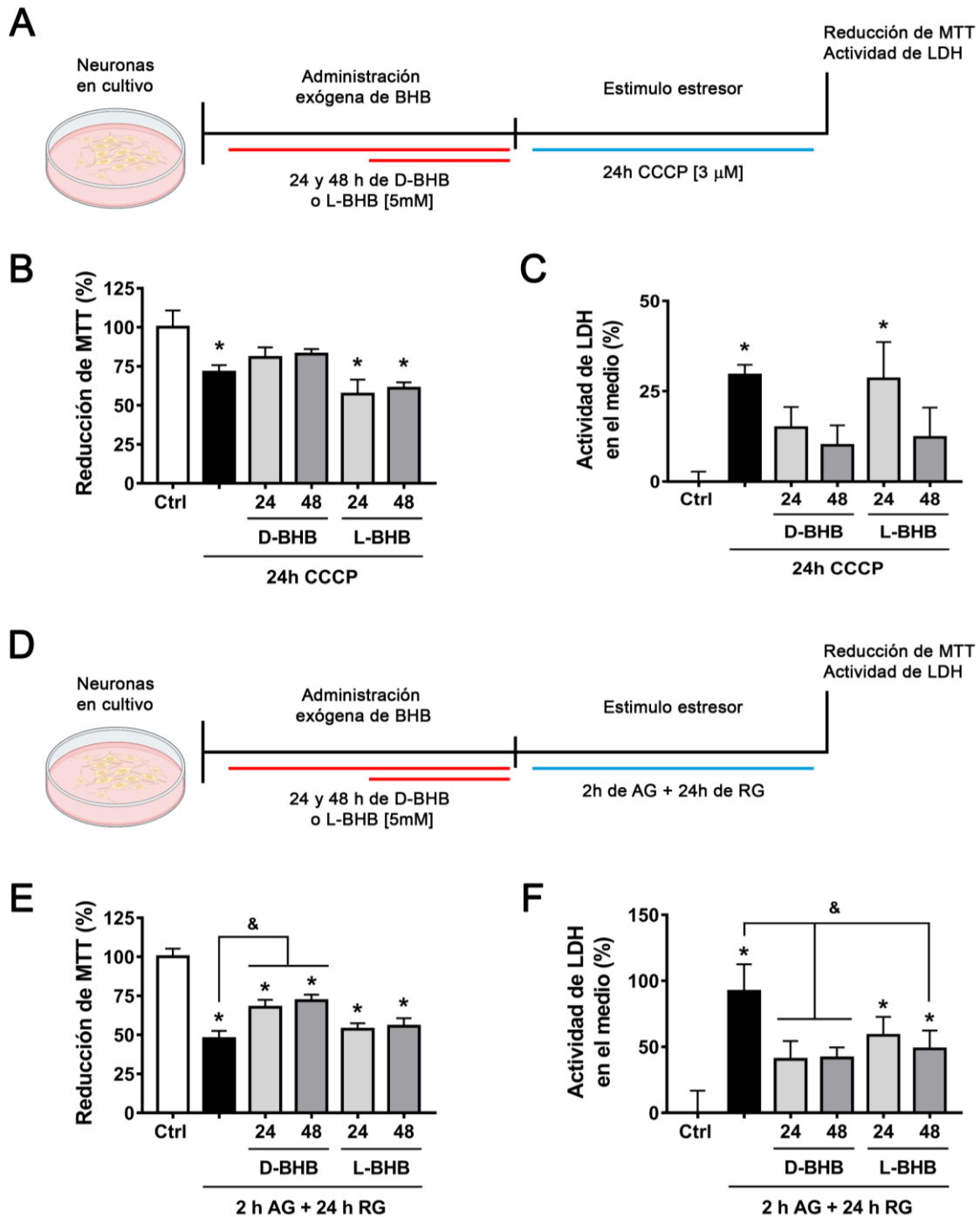


Figura 12 La pre incubación de D-BHB es neuroprotector ante la exposición a CCCP y estrés energético. **A)** Esquema del diseño experimental para probar el efecto neuroprotector de la pre incubación del BHB ante un desacoplador mitocondrial (CCCP) en neuronas corticales. **B)** Reducción de MTT y **C)** actividad de LDH de neuronas corticales pre incubadas 24 o 48 horas con 5 mM de D-BHB o L-BHB seguido de la exposición de 24h de CCCP 3 μ M; n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 24h CCCP 3 μ M. h = horas. **D)** Esquema del diseño experimental para probar el efecto neuroprotector de la pre incubación del BHB ante un estrés energético (AG/RG) en neuronas corticales. **E)** Reducción de MTT y **F)** actividad de LDH de neuronas corticales preincubadas 24 o 48 horas con 5 mM de D-BHB o L-BHB seguido de la exposición de 2h de AG y 24h de RG. Datos expresados como promedio \pm error estándar de 4 experimentos

independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control, & $p < 0.05$ vs 2h AG + 24h RG. h = horas.

El aumento en el número de autofagosomas y lisosomas correlaciona con una disminución en los niveles de NADH en neuronas tratadas con D-BHB

Hasta el momento hemos mostrado que el D-BHB induce la translocación de factores de transcripción importantes para la autofagia, mitofagia y biogénesis lisosomal, sin embargo el D-BHB también es una fuente de energía alterna para las neuronas, ya que estimula la producción de ATP y aumenta el cociente de NAD^+/NADH (Marosi et al, 2016). Para comprobar si existe un aumento en los niveles de autofagia y biogénesis lisosomal que correlacionen con un aumento en el cociente NAD^+/NADH después del tratamiento con D-BHB, se realizaron ensayos de microscopia de 2 fotones.

Gracias a la capacidad de autofluorescencia del NADH cuando es excitado a 760 nm en un microscopio de 2 fotones, se puede observar el nivel de NADH intracelular sin la necesidad de algún sensor fluorescente. Como primer paso se evaluó si el D-BHB efectivamente cambia los niveles de NADH intracelular. En un estado control se muestra la autofluorescencia característica del NADH en donde la mayor intensidad de señal se encuentra en el citoplasma mientras que las bajas intensidades se presentan en el núcleo (**Fig. 13A**). Cuando las células fueron incubadas con D-BHB por 24 horas se observa un decremento en la intensidad de fluorescencia del NADH de las neuronas en comparación con el estado control, sin embargo, cuando las células son tratadas con el isómero L-BHB, ésta disminución en la intensidad de fluorescencia ya no ocurre (**Fig. 13A**), sugiriendo que el D-BHB puede estar aumentando el cociente NAD^+/NADH ya que se está metabolizando.

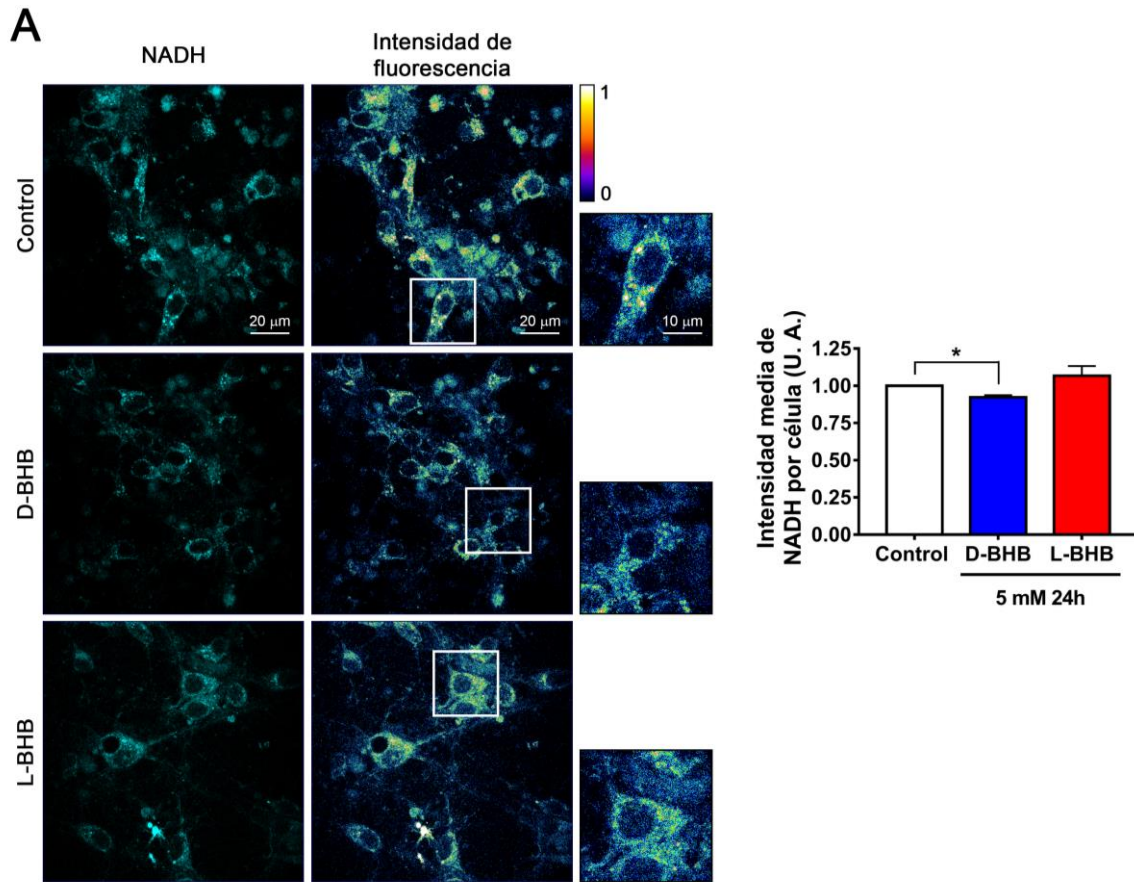


Figura 13 El D-BHB induce una disminución en la autofluorescencia de NADH. **A)** Imágenes representativas de la auto fluorescencia de NADH (cian), espectro de intensidad (azul-menor intensidad y amarillo-mayor intensidad) y gráfica de la intensidad media de NADH por célula de neuronas corticales tratadas con 5 mM de D-BHB o L-BHB por 24 horas. Datos expresados como promedio \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control.

Al observar que el factor de transcripción TFEB aumenta sus niveles en el núcleo con el tratamiento de D-BHB, se investigó si efectivamente hay un aumento en el número lisosomas correlacionado con la disminución de NADH. Usando el compuesto lysotracker para teñir vesículas ácidas, se observó que el número de lisosomas por célula aumenta con el tratamiento de D-BHB (**Fig. 14A**) pero no así con el isómero L-BHB. Además, el aumento en el número de lisosomas en la condición tratada con D-BHB correlaciona con una disminución en la intensidad de fluorescencia de NADH, lo cual no ocurre en la condición con el isómero L-BHB. (**Fig. 14A**). En conjunto estos resultados indican que el D-BHB estimula la biogénesis lisosomal y disminuye los niveles de NADH.

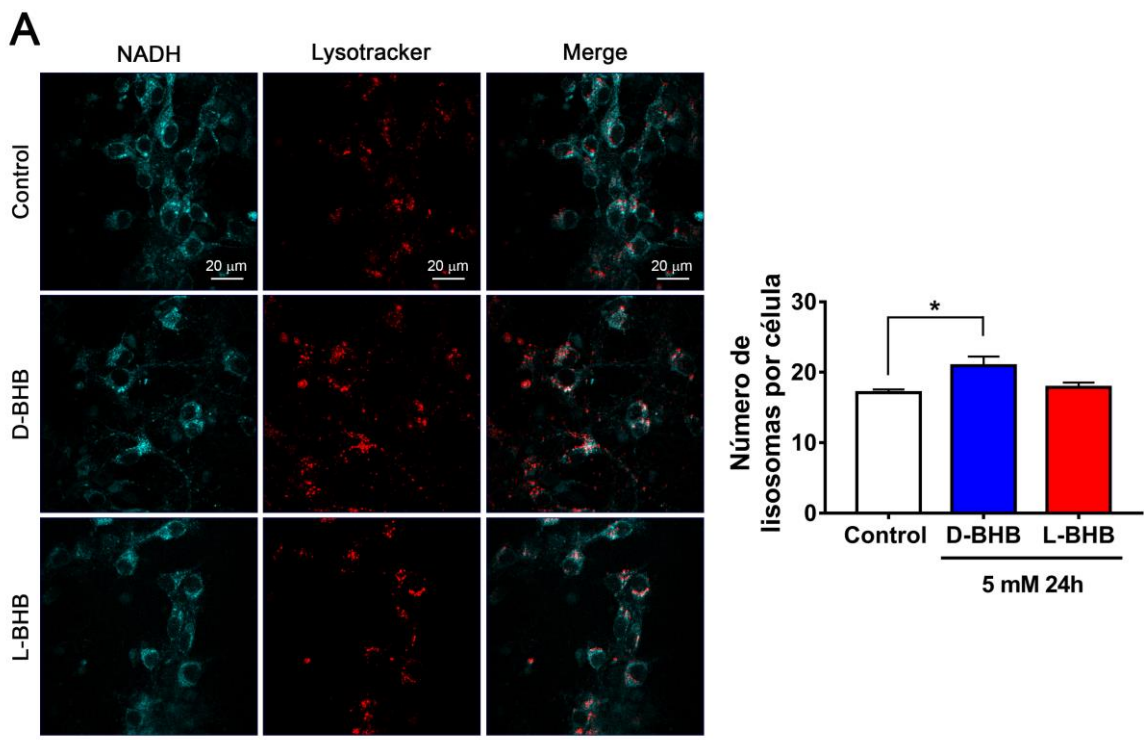


Figura 14 El D-BHB induce un aumento en el número de lisosomas en neuronas corticales. **A)** Imágenes representativas de LysoTracker (rojo) y auto fluorescencia de NADH (cian) en neuronas corticales tratadas con 5 mM de D-BHB o L-BHB por 24 horas. Cuantificación del número de lisosomas por célula en cultivos de neuronas corticales tratadas con 5 mM de D-BHB o L-BHB por 24 horas. Datos expresados como promedio \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control.

De igual manera, al observar que hay un aumento en la formación de LC3-II el cual es un indicativo de que se están formando autofagosomas, se realizaron ensayos de microscopia para visualizar número de autofagosomas positivas a Cyto-ID y simultáneamente los niveles de NADH en células tratadas con D-BHB. Se observó que en presencia de D-BHB disminuyen los niveles de autofluorescencia de NADH y de manera preliminar parece haber un aumento en el número de autofagosomas en neuronas tratadas con el isómero D-BHB pero esto no ocurre con el isómero L-BHB (**Fig. 15A**).

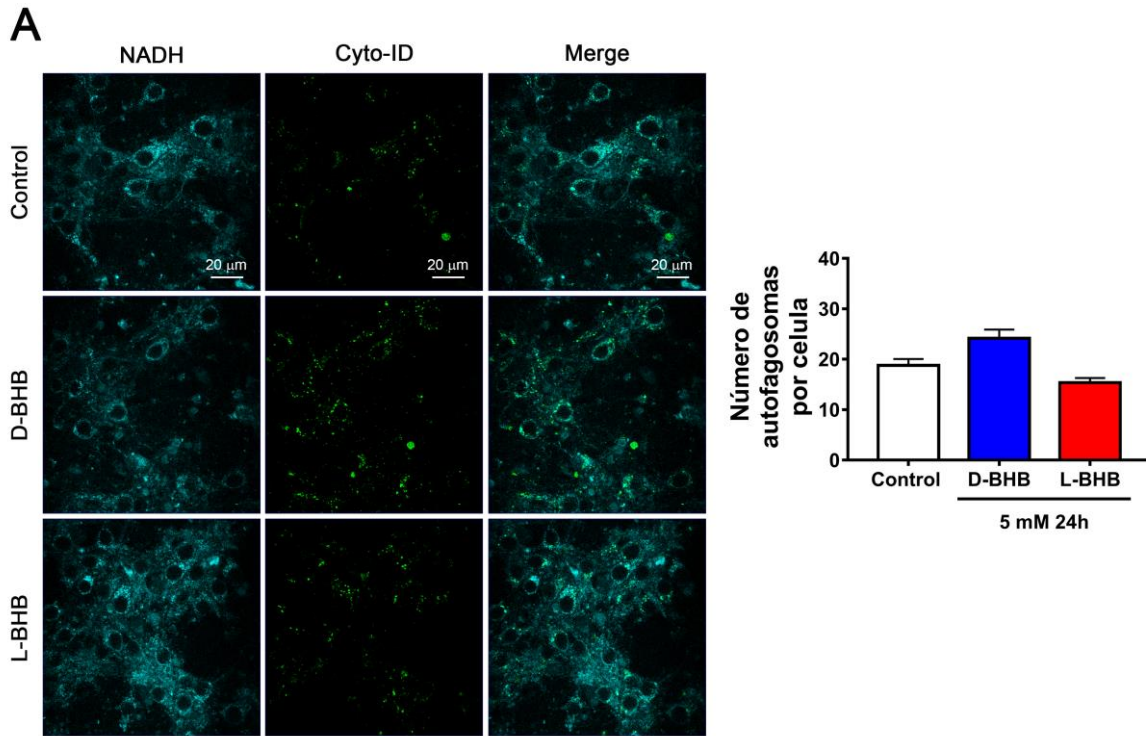


Figura 15 Efecto del D-BHB en el número de autofagosomas en neuronas corticales. Imágenes representativas de autofluorescencia de NADH (cian) y Cyto-ID (verde) en neuronas corticales tratadas con 5 mM de D-BHB o L-BHB por 24 horas. Cuantificación de número de autofagosomas por célula en neuronas corticales tratadas con 5 mM de D-BHB o L-BHB por 24 horas. Datos expresados como promedio y error estándar del número de partículas positivas a Cyto-ID contadas en >50 células por condición de un solo experimento.

En conjunto estos resultados sugieren que el efecto neuroprotector del D-BHB es debido a que se está metabolizando y posiblemente aumentando los niveles de NAD^+ . Para aproximarnos a contestar esta hipótesis se incubaron las neuronas con NAD por 24 horas y posteriormente se les reto a un estrés energético como la AG/RG (**Fig. 16A**). Al igual que el D-BHB, la pre incubación con NAD induce un aumento en la reducción de MTT y una disminución en la actividad de LDH en células expuestas a la condición de AG/RG (**Fig. 16B, C**) sugiriendo que el aumento en los niveles de NAD^+ en las neuronas confiere un efecto neuroprotector ante un estrés energético.

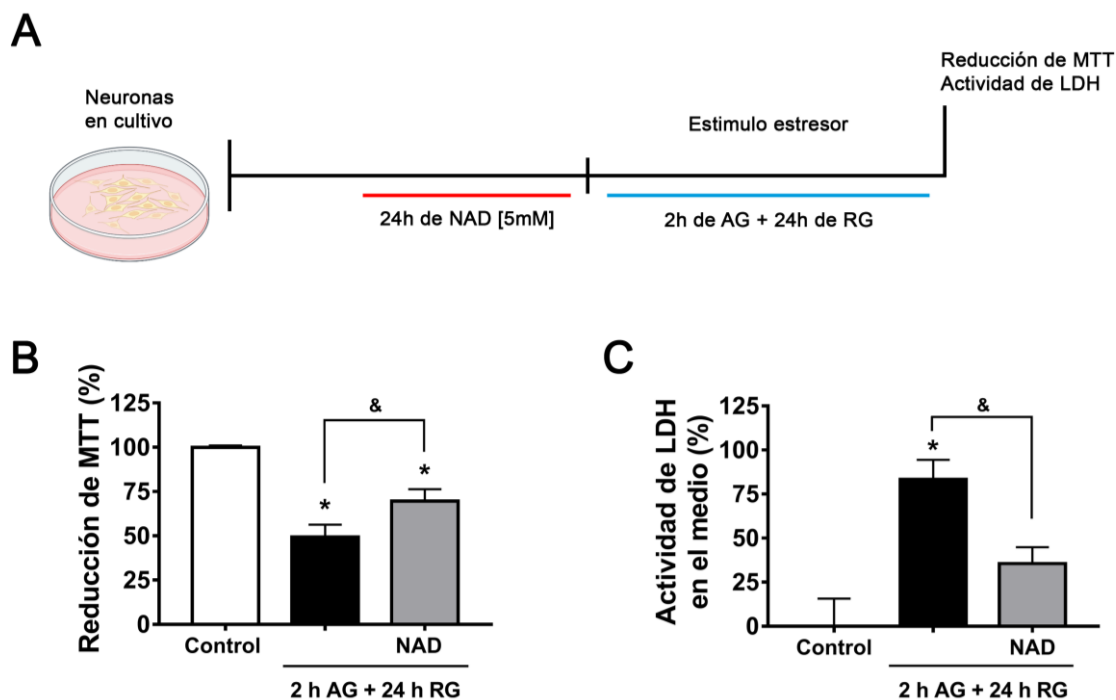


Figura 16 La pre incubación de NAD reduce la muerte neuronal inducida por la ausencia y reintroducción de glucosa (AG/RG). **A)** Esquema del diseño experimental para probar el efecto neuroprotector de la pre incubación del NAD ante un estrés energético (AG/RG) en neuronas corticales. **B)** Reducción de MTT y **C)** actividad de LDH de neuronas corticales preincubadas 24 horas con 5 mM de NAD seguido de la exposición de 2h de AG y 24h de RG. Datos expresados como promedio y \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control, & $p < 0.05$ vs 2h AG + 24h RG. h = horas.

El D-BHB aumenta los niveles de la sirtuina 2

Hasta el momento, todos estos resultados indican que el D-BHB induce la translocación al núcleo de factores de transcripción y modifica el cociente $NAD^+/NADH$. Cambios en el cociente $NAD^+/NADH$ regula la actividad de las sirtuinas, es por eso que se evaluó si el D-BHB es capaz de modificar la actividad de estas enzimas. Primero se investigó si el D-BHB induce un cambio en los niveles de alguna sirtuina. Entre las principales responsables de regular y estimular la autofagia están la sirtuina 1 y 2. En el caso de la sirtuina 2 (SIRT2), esta proteína se encuentra altamente expresada en el sistema nervioso (Maxwell et al, 2011). SIRT2 presenta 3 isoformas que son producto de splicing alternativo y se observó que el tratamiento de D-BHB en neuronas corticales induce un aumento en dos de las tres variantes de sirtuina 2 (SIRT2.1 y SIRT2.2) (**Fig. 17A**).

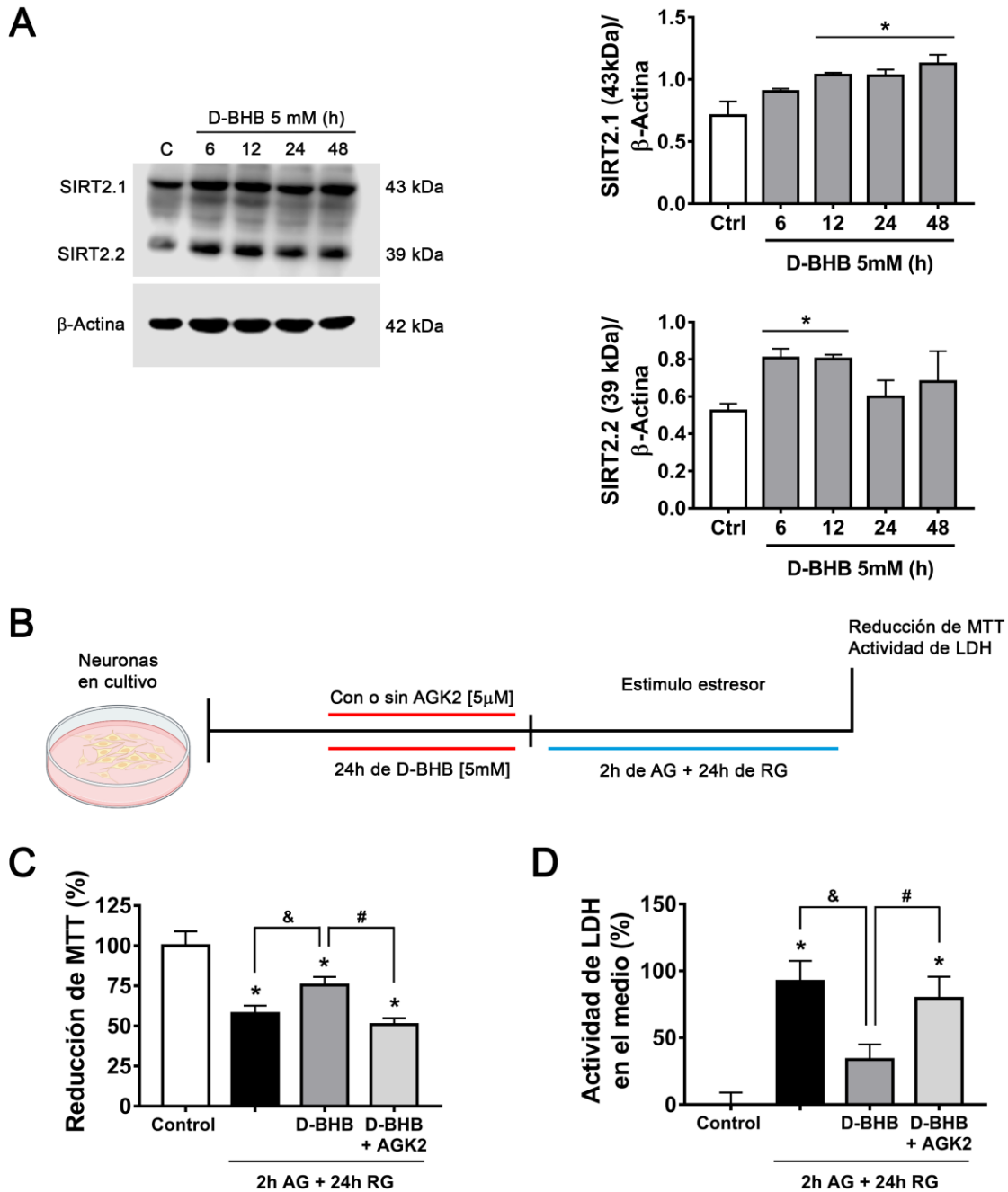


Figura 17 El D-BHB aumenta los niveles de la sirtuina 2. **A)** Western blot representativo y cuantificación de SIRT2.1/ β-actina y SIRT2.2/β-actina; n=3, * p<0.05 vs control. **B)** Esquema del diseño experimental para probar el efecto de la inhibición de la sirtuina 2 mediante el inhibidor AGK2 sobre la neuroprotección conferida por el D-BHB ante un estrés energético (AG/RG) en neuronas corticales. **C)** Reducción de MTT y **D)** actividad de LDH de neuronas corticales pre incubadas 24 horas con 5 mM de D-BHB con o sin AGK2 (5 μM) seguido de la exposición de 2h de AG y 24h de RG. Datos expresados como promedio ± error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Fisher. * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG + 24h RG, # p<0.05 vs D-BHB + 2h AG + 24h RG. h = horas.

El aumento en los niveles de SIRT2 y los cambios en los niveles de NADH producidos por la incubación de D-BHB en las neuronas sugiere la posibilidad de que esta enzima sea la responsable de regular los efectos benéficos del D-BHB. Investigaciones previas han demostrado que SIRT2 es un importante regulador de la autofagia y mitofagia en neuronas (Liu et al, 2017) y la sobre expresión de esta sirtuina en neuronas se ha observado que confiere protección ante daño oxidativo (Singh et al, 2017). En conjunto estos datos sugieren que la estimulación de la mitofagia y el efecto neuroprotector observado por la incubación de D-BHB en neuronas sean mediados por un aumento en la actividad de la sirtuina 2. Para contestar esta posibilidad se usó un inhibidor específico para la SIRT2 denominado AGK2 y se evaluó si la inhibición de esta sirtuina abatía el efecto neuroprotector del D-BHB ante un estrés energético (**Fig. 17B**). Nuevamente cuando el D-BHB es pre incubado aumenta la sobrevivencia y disminuye la muerte neuronal ante el reto de ausencia de glucosa, pero cuando las neuronas son pre incubadas con el cuerpo cetónico y el inhibidor de la SIRT2 se abate este efecto benéfico del D-BHB (**Fig. 17C, D**) sugiriendo que la sirtuina 2 es importante en la neuroprotección conferida por el D-BHB en las neuronas.

Al observar que la SIRT2 es importante para el efecto neuroprotector del D-BHB en neuronas se decidió investigar el posible mecanismo. Estudios previos han observado que SIRT2 desacetila diversos factores de transcripción y regula así su translocación al núcleo (Jing et al, 2007; Wang et al, 2007). Es por este motivo que se evaluó si el AGK2 inhibe la translocación de TFEB y FOXO inducida por el D-BHB. Para ello se realizaron fraccionamientos nucleares de neuronas tratadas con D-BHB y se evaluó si el inhibidor AGK2 inhibe la translocación de estos factores de transcripción. De manera interesante se observó que el inhibidor de la SIRT2 no revirtió la translocación de TFEB al núcleo en neuronas tratadas con D-BHB (**Fig. 18A**), sin embargo, los niveles de FOXO1 y FOXO3a en el núcleo disminuyen con el inhibidor AGK2 (**Fig. 18B, C**) sugiriendo el D-BHB regula la translocación de los FOXOs por la estimulación de la sirtuina 2 pero el mecanismo por el cual promueve la translocación de TFEB posiblemente esta mediado por una sirtuina o un mecanismo diferente.

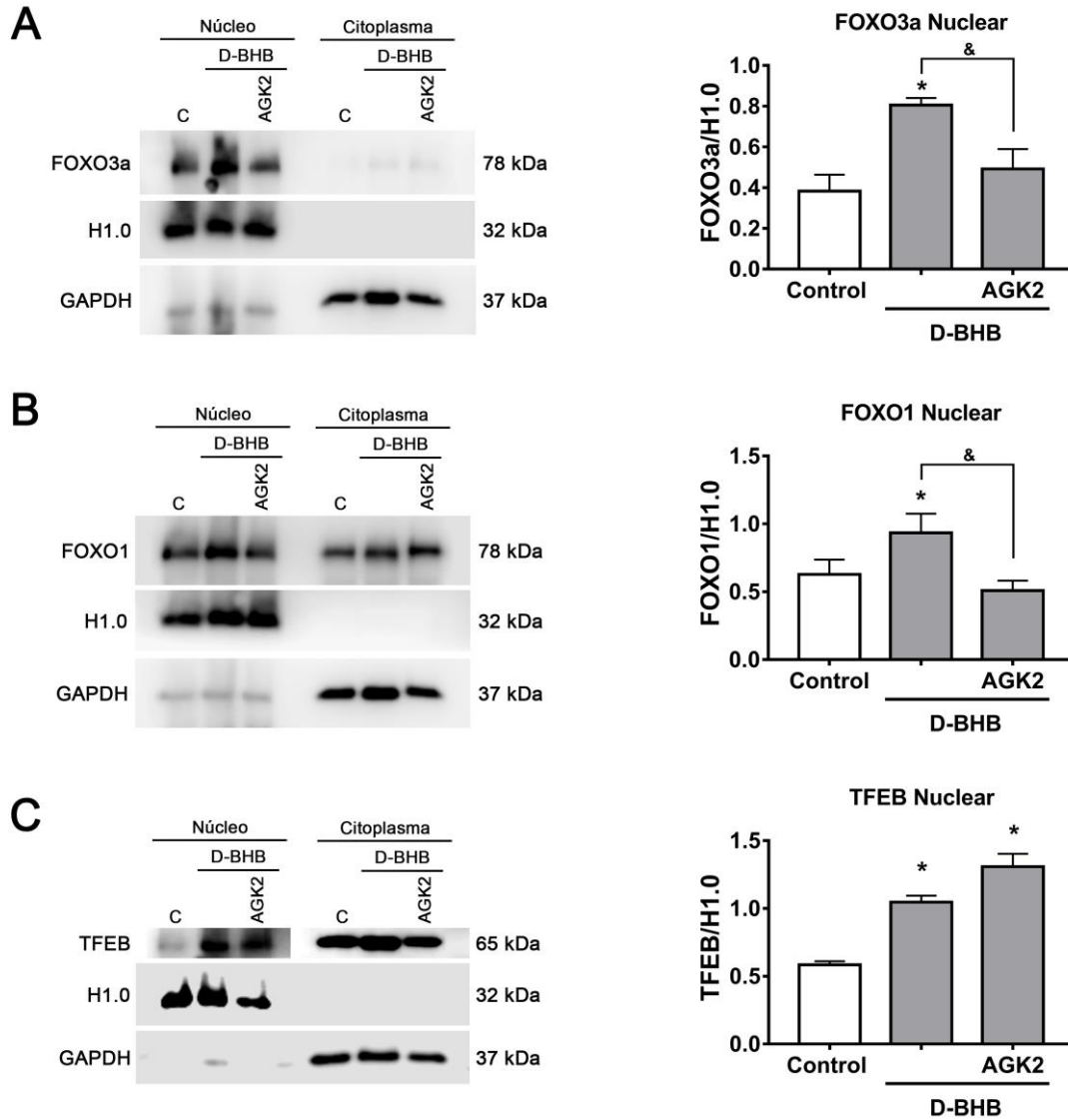


Figura 18 Efecto de la inhibición de SIRT2 en la translocación de FOXO3a, FOXO1 y TFEB en neuronas corticales tratadas con D-BHB. **A)** Análisis de la localización de FOXO3a mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de FOXO3a en el núcleo. **B)** Análisis de la localización de FOXO1 mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de FOXO1 en el núcleo. **C)** Análisis de la localización de TFEB mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de TFEB en el núcleo. Neuronas incubadas por 24 horas con 5 mM de D-BHB con o sin AGK2 (5 μ M). Datos expresados como promedio \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Fisher. * $p < 0.05$ vs control; & $p < 0.05$ vs D-BHB.

Discusión

El cuerpo cetónico D-BHB es un metabolito proveniente de la degradación de ácidos grasos en el hígado capaz de suministrar energía a los tejidos periféricos durante ejercicio exacerbado o ayunos prolongados. Sin embargo, con el aumento en el uso de dietas cetogénicas se han descubierto nuevas funciones biológicas relacionadas con el D-BHB como activar receptores de membrana y actuar como inhibidor endógeno de desacetilasas de histonas (HDACs). Además, este cuerpo cetónico presenta diversas acciones biológicas en el sistema nervioso como promover la expresión de *Bdnf* (Hu et al, 2018; Marosi et al, 2016), fungir como neuroprotector en modelos de isquemia (Suzuki et al, 2002) a través de diversos mecanismo que incluyen el aumento en los niveles de ATP, la reducción de estrés oxidante, inhibición del estrés del retículo endoplásmico e inhibición del inflamosoma NLRP3. Recientemente en estudios en neuronas corticales sometidas a la privación de glucosa y en modelos *in vivo* de hipoglucemia y daño cerebral inducido por excitotoxicidad, hemos encontrado que la administración del D-BHB estimula la autofagia y previene la muerte neuronal (Camberos-Luna et al, 2016). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el D-BHB estimula la autofagia no se conocen del todo. En este trabajo se identificó que el D-BHB estimula la autofagia, la biogénesis lisosomal y el recambio de mitocondrias en neuronas sanas a través de la activación de factores de transcripción que regulan estos procesos, proporcionando a las neuronas una mayor capacidad de adaptación ante estrés energético y estrés mitocondrial, posiblemente mediado en parte por la estimulación de un importante regulador del metabolismo y expresión génica como son las sirtuinas.

El BHB es capaz de promover la translocación al núcleo de reguladores maestros de la autofagia.

Reportes previos han identificado que el D-BHB y las dietas cetogénicas regulan la expresión génica a través de la modificación de marcas de histonas y la regulación positiva de algunos factores de trascrición (Hasan-Olive et al, 2019; Xie et al, 2016). El más reconocido factor de transcripción que es estimulado por el D-BHB es FOXO3a. Mediante nuestros experimentos de fraccionamiento subcelular se confirmó esta asociación al observar que la incubación con D-BHB estimuló la translocación de FOXO3a al núcleo. Sin embargo, nuestros datos demostraron que el D-BHB estimuló otro integrante de esta misma familia de factores de trascrición como es el caso de FOXO1.

La familia de los FOXOs ha cobrado gran relevancia en el ámbito de las neurociencias al estar íntimamente relacionado con un gran número de procesos y mecanismos fisiológicos relevantes para el sistema nervioso, como el mantenimiento de células troncales neurales del cerebro, la eliminación de especies reactivas de oxígeno y la autofagia (Santo & Paik, 2018). Estudios previos indican que la estimulación de FOXO3a por el tratamiento de D-BHB conlleva a la regulación positiva de genes antioxidantes

(Shimazu et al, 2013) lo cual podría explicar el efecto antioxidante del BHB en diversos modelos murinos de daño neuronal como son el daño isquémico (Li et al, 2021), traumatismo de medula espinal (Seira et al, 2021) o daño hipoglucémico (Julio-Amilpas et al, 2015).

Con respecto a FOXO1, existe al menos un estudio previo donde se observó que el D-BHB y la restricción calórica aumentan los niveles de FOXO1 en el núcleo de tejido renal, promoviendo el incremento de genes antiinflamatorios (Kim et al, 2019). Sin embargo, a FOXO1 en el cerebro se le ha encontrado mayor relación con la regulación de genes de autofagia (Maiese, 2015) y el mantenimiento de nichos donde ocurre neurogénesis en cerebros adultos (Schaffner et al, 2018). Los resultados del presente trabajo indican que el aumento en los niveles de FOXO1 en el núcleo correlacionan con un aumento en la expresión de genes de autofagia, incremento en los niveles de proteínas importantes en la iniciación de la autofagia y mayor número de autofagosomas, lo que indica que el D-BHB podría estar regulando positivamente la autofagia mediante la estimulación de FOXO1 al núcleo. Adicionalmente, de manera muy interesante un estudio previo encontró que tanto FOXO1 como FOXO3a son necesarios para el mantenimiento de un correcto funcionamiento de la autofagia y la maduración de neuronas en desarrollo (Schaffner et al, 2018). Esto sugiere que la acción de D-BHB de estimular esta familia de factores de transcripción puede ser de gran importancia para el sistema nervioso al promover la autofagia y la maduración de neuronas.

Además de promover la translocación al núcleo de la familia de los FOXOs, un importante hallazgo de este trabajo fue la capacidad del D-BHB de aumentar los niveles de un factor de transcripción perteneciente a una familia completamente diferente como fue el caso de TFEB, un regulador maestro de la autofagia y biogénesis lisosomal. Nuestros resultados indican que el aumento en los niveles de TFEB en el núcleo correlaciona con un aumento en la expresión de genes lisosomales y de autofagia, además de un incremento en el número de lisosomas y autofagosomas en neuronas.

A diferencia de los FOXOs, TFEB se le ha visto más relacionado con la regulación de la función lisosomal (Napolitano & Ballabio, 2016), organelos primordiales en la capacidad catabólica y de reciclado de las células. La autofagia requiere de un correcto funcionamiento de los lisosomas y deficiencia en la actividad catabólica de estos organelos se ha relacionado con la acumulación anómala de proteínas mal plegadas y material intracelular no degradado. Esta condición patológica de los lisosomas promueve la inducción de la senescencia celular (Park et al, 2018), muerte neuronal (Tessitore et al, 2004) y se ha asociado con varias enfermedades neurodegenerativas (Komatsu & Ichimura, 2008; Komatsu et al, 2006). Más aún, estudios previos indican que la sobreexpresión o la estimulación de la biogénesis lisosomal por TFEB disminuye los efectos adversos de diversas neuropatologías (Moruno-Manchon et al, 2016; Polito et al, 2014) incluida la isquemia cerebral (Liu et al, 2019) y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Tsunemi et al, 2012) por lo que es evidente que la estimulación y mantenimiento de un correcto funcionamiento de los lisosomas es de suma importancia para el sistema nervioso.

El hecho de haber encontrado en nuestros experimentos que TFEB y los FOXOs son estimulados por el D-BHB proporciona nueva información acerca de los mecanismos que participan en los efectos benéficos que se le han encontrado a los cuerpos cetónicos y a las dietas cetogénicas, sobre diversas neuropatologías que están relacionadas con afectaciones en vías como la autofagia y la degradación lisosomal (Guerra et al, 2019; Okarmus et al, 2020). En conjunto, nuestros resultados indican que el D-BHB es capaz de promover un aumento en la expresión génica de mecanismos específicos como son la autofagia y la biogénesis lisosomal a través de la translocación al núcleo de TFEB y FOXO.

El BHB estimula el flujo autofágico en neuronas

La autofagia es un importante mecanismo de adaptación para las células y especialmente tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis neuronal ya que se ha observado que la desregulación de este proceso en neuronas está relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Nixon, 2013). Sabemos que la autofagia es un proceso dinámico que inicia con la formación de autofagosomas pero culmina en la degradación del cargo en los lisosomas, es decir, hay un flujo de componentes celulares a ser degradados vía lisosomal lo cual se denomina flujo autofágico (Zhang et al, 2013). Por lo tanto, un aumento en los niveles de la maquinaria autofágica no necesariamente conlleva a que haya más flujo autofágico.

En este trabajo se encontró que el D-BHB estimuló los niveles de proteínas involucradas en la autofagia y función lisosomal, además mediante microscopia se observó un mayor número de autofagosomas y lisosomas en neuronas. Mediante la utilización de la cloroquina como inhibidor de la degradación lisosomal (Klionsky et al, 2016; Mauthe et al, 2018) se observó que el D-BHB no solo induce formación de autofagosomas y lisosomas, también indujo un aumento en la degradación vía lisosomal de LC3-II y p62/SQSTM1 lo que indica que este cuerpo cetónico es capaz de estimular el flujo autofágico.

Tomando esto en cuenta, ¿qué implicaciones tendría estimular el flujo autofágico? Estudios previos han demostrado que el D-BHB estimula el flujo autofágico promoviendo la sobrevivencia neuronal en condiciones de estrés energético (Camberos-Luna et al, 2016). Además promover la autofagia se ha relacionado con efectos benéficos en diversas enfermedades neurodegenerativas que se caracterizan por presentar acumulación de componentes celulares que no fueron apropiadamente degradados como proteínas mal plegadas (Williams et al, 2006; Zhang et al, 2013). Incluso el tratamiento con cuerpos cetónicos en diversas enfermedades neurodegenerativas ha sido ampliamente utilizado mostrando efectos benéficos (Paoli et al, 2014; Zhu et al, 2022) por lo que existe la posibilidad de que entre los mecanismos por el cual los cuerpos cetónicos podrían ejercer un beneficio en estas neuropatologías sería por la estimulación del flujo autofágico.

Es más, la relación entre el flujo autofágico y los cuerpos cetónicos puede ser más importante para preservar la salud celular de lo que se creía. Estudios previos indican que aumentar la actividad autofágica en neuronas en modelos de *Caenorhabditis elegans* (Hars et al, 2007) y *Drosophila* (Simonsen et al, 2008) aumenta la esperanza de vida de estos organismos y esto concuerda con estudios recientes en donde la dieta cetogénica aumenta la sobrevivencia de diversos organismos como *Caenorhabditis elegans* (Edwards et al, 2014) y ratones (Roberts et al, 2018). Esto sugiere que estimular una mayor actividad autofágica en las neuronas puede ser de gran importancia para mantener saludables a estas células. En resumen, el BHB no solo es capaz de estimular la expresión de genes importantes para la autofagia a través de la translocación de factores de transcripción, también es capaz de estimular el flujo autofágico y promover un mejor estado de salud de las neuronas.

El recambio de mitocondrias como un nuevo mecanismo de acción del BHB.

Es conocido que las mitocondrias requieren de un estricto control de calidad para mantener un correcto balance energético dentro de las células y de manera muy particular para las neuronas. Entre los mecanismos involucrados para este control de calidad esta la mitofagia, la biogénesis mitocondrial, la captación de ROS y la dinámica mitocondrial. Si se interrumpe alguno de estos mecanismos, las mitocondrias no pueden realizar sus funciones vitales, lo que en última instancia puede conducir a la muerte neuronal (Wang et al, 2020). Con respecto a esta información, desde hace tiempo se sabe que existe una conexión entre la neuroprotección mediada por los cuerpos cetónicos y la función mitocondrial. Se ha observado que los cuerpos cetónicos reducen el estrés oxidante mitocondrial (Maalouf et al, 2007), mejoran la respiración mitocondrial (Tieu et al, 2003) y estimulan la generación de ATP (Julio-Amilpas et al, 2015; Marosi et al, 2016), sin embargo, los mecanismos por los cuales podría promover una mejor salud de las mitocondrias, no se conocen del todo.

Un posible mecanismo podría ser la estimulación de la mitofagia. Nuestros resultados demostraron que el D-BHB estimuló el flujo autofágico pero se desconocía si era capaz de estimular la degradación específica de algunos organelos como son las mitocondrias en neuronas que no han sido sometidos a algún estrés celular. Al inhibir la degradación lisosomal mediante cloroquina se observó que el D-BHB aumentó los niveles de proteínas mitocondriales (TOM20 y COX IV), sugiriendo un aumento en la mitofagia. Estos datos fueron apoyados mediante experimentos de microscopia confocal, en donde se encontró un mayor número de mitocondrias colocalizando con autofagosomas en neuronas tratadas con el cuerpo cetónico, lo que indica que el D-BHB es capaz de estimular no solo la autofagia global, sino también de inducir la degradación selectiva de mitocondrias. Estos resultados en relación a los factores de transcripción previamente discutidos, concuerdan con estudios previos en donde se confirmó que TFEB es esencial para la eliminación de mitocondrias dañadas (Kim et al, 2018; Nezich et al, 2015). Adicionalmente, se ha encontrado también que el factor FOXO3a induce la mitofagia al promover la expresión de *Bnip3* (Kume et al, 2010), una de las proteínas

que etiquetan mitocondrias para ser degradados vía autofágica. Por lo que la inducción de ambas familias de factores de transcripción por el BHB podría promover la mitofagia y un mejor control de calidad de las mitocondrias. Esto abre la posibilidad de que los cuerpos cetónicos sean capaces de promover una mejor salud de las mitocondrias aumentando la degradación de estos organelos en las neuronas.

Existe bastante evidencia acerca de que la degradación de mitocondrias es un proceso importante para la homeostasis de las neuronas y las alteraciones en este mecanismo se relaciona fuertemente con neuropatologías (Lou et al, 2020). Más aún, se ha observado que la regulación positiva de la mitofagia promueve la neuroprotección contra algunas enfermedades neurodegenerativas (Fang et al, 2019; Schondorf et al, 2018). Sin embargo, no hay que olvidar que una alta tasa de degradación mitocondrial se ha correlacionado con muerte neuronal (Shi et al, 2014; Subramaniam, 2020). Por lo que el balance entre síntesis de nuevas mitocondrias y degradación de mitocondrias viejas es importante para mantener un correcto equilibrio energético de la célula.

Tomando esto en cuenta, además de promover la mitofagia, nuestros resultados también mostraron que la sola incubación de D-BHB aumentó los niveles de proteínas mitocondriales indicando que no solo promueve la degradación de mitocondrias sino también induce la expresión de proteínas mitocondriales. Estudios previos han demostrado que el D-BHB regula la función mitocondrial en neuronas a través de estimular el coactivador transcripcional PGC1 α (Hasan-Olive et al, 2019), un importante regulador de la biogénesis y función mitocondrial. Esta información concuerda con nuestros datos en donde la incubación con el D-BHB indujo un aumento en los niveles transcripcionales y de proteína en el núcleo de PGC1 α . Además, también se observó un aumento en un gen y proteína regulados por este coactivador transcripcional como son *Tfam* y TOM20 respectivamente, lo que podría indicar que este cuerpo cetónico es capaz de promover un aumento en la masa mitocondrial en las neuronas. Adicionalmente, en concordancia con lo anterior, experimentos previos han demostrado que la sobreexpresión de TFEB además de promover la degradación de mitocondrias también correlaciona con un aumento en el contenido de proteínas mitocondriales en neuronas (Ivankovic et al, 2016) y otro estudio confirmó que TFEB regula transcripcionalmente a PGC1 α (Settembre et al, 2013). Por lo que el descubrimiento de que el D-BHB estimula la presencia de TFEB en el núcleo convierte a este factor de transcripción como un posible regulador de la homeostasis mitocondrial.

Finalmente, mediante experimentos de sobrevivencia se observó que la pre incubación del D-BHB confirmó neuroprotección ante estrés energético y mitocondrial apoyando la idea de que aumentar estos mecanismos de control de calidad mitocondrial es benéfico para la viabilidad y el balance energético de las neuronas. En conclusión, el D-BHB es capaz de promover un mejor estado energético de las neuronas al estimular el recambio de mitocondrias, tanto induciendo la formación de nuevas mitocondrias y al mismo tiempo la degradación específica de estos organelos.

El BHB como potenciador de sirtuinas.

Previamente se ha demostrado que el BHB aumenta el cociente NAD^+/NADH (Marosi et al, 2016). Mediante experimentos de microscopia de 2 fotones se observó una disminución de la auto fluorescencia de NADH en neuronas tratadas con D-BHB sugiriendo que el cociente NAD^+/NADH aumentó. Al usar el isómero no metabolizable L-BHB, no se observó algún cambio en los niveles de NADH como tampoco se observó neuroprotección mediada por este isómero. Existe información previa que demuestra que ambos isómeros son capaces de activar receptores membranales como el receptor HCAR2 cuando esta sobre expresado en células de hámster de ovario (Taggart et al, 2005), sin embargo aún es controversial el papel que podría tener el isómero L-BHB en la neuroprotección y si realmente ambos isómeros podrían influir en los mismos mecanismos ya que, aunque ambos isómeros son capaces de activar el receptor HCAR2, este receptor no se expresa en las neuronas por lo que en nuestras condiciones, al parecer los efectos del BHB son isómero dependientes y muy probablemente es mediante el metabolismo del D-BHB regulando así los niveles de NAD intracelular.

Con respecto al papel que podría tener el NAD, cuando las neuronas fueron pre incubadas con NAD se observó un aumento en la sobrevivencia ante la ausencia de glucosa, de manera muy similar a lo observado con la pre incubación del D-BHB, lo que indica que los mecanismos descritos en este trabajo son probablemente mediados por el metabolismo del D-BHB y el cambio en el cociente NAD^+/NADH . Se sabe que los niveles de NAD se reducen en muchas enfermedades neurodegenerativas y el aumento de NAD previene patologías en modelos murinos de enfermedad de Alzheimer (Liu et al, 2013). Algo a recalcar es que algunos de los principales mecanismos que regulan este efecto protector del NAD en estas neuropatologías es la inducción de la autofagia/mitofagia (Fang, 2019; Lautrup et al, 2019).

Se sabe que cambios en los niveles del cociente NAD^+/NADH se relaciona con la activación de sirtuinas y las evidencias acerca de la participación de las sirtuinas en el contexto de envejecimiento y en el correcto funcionamiento del sistema nervioso han aumentado en los últimos años. Estudios han encontrado que la estimulación de las sirtuinas disminuye el envejecimiento en diversos modelos (Houtkooper et al, 2012), así como también la sobreexpresión o estimulación farmacológica de las sirtuinas confiere beneficios ante diversos tipos de neuropatologías (Donmez & Outeiro, 2013). Es por tales motivos que descubrir nuevas formas para estimular la actividad de las sirtuinas es de gran importancia para el ámbito de las neurociencias. De manera interesantemente cuando se investigó en nuestras condiciones si el BHB era capaz de estimular los niveles de alguna sirtuina, se encontró que este cuerpo cetónico aumentó los niveles de SIRT2. De entre la familia de las sirtuinas, SIRT2 se encuentra principalmente en el citoplasma de las células y se le ha relacionado con la regulación de los microtúbulos en las neuronas, la regulación post-traducciona de factores de transcripción y más recientemente la regulación de la homeostasis mitocondrial (Chen et al, 2021). Se ha observado que animales knockout de la SIRT2 se altera la mitofagia y se compromete la función mitocondrial en neuronas (Liu et al, 2017), además esta sirtuina desacetila y regula la activación de FOXO3a (Wang et al, 2007) y la

translocación al núcleo de FOXO1 (Jing et al, 2007). En concordancia con este último punto, usando un inhibidor específico de SIRT2 se encontró que en nuestras condiciones esta sirtuina regula la translocación al núcleo de FOXO1 y FOXO3a en las neuronas. Adicionalmente, la inhibición de esta sirtuina revirtió el efecto protector del D-BHB ante un estrés energético sugiriendo que esta sirtuina es clave para los efectos benéficos de este cuerpo cetónico y la estimulación de factores de transcripción importantes en la regulación de la autofagia y la homeostasis mitocondrial en las neuronas.

A pesar de haber encontrado que el cuerpo cetónico D-BHB estimula a la SIRT2, no hay que descartar la participación de otras posibles sirtuinas que pudiesen ser estimuladas por este cuerpo cetónico ya que estudios previos han mostrado que el D-BHB y las dietas cetogénicas son capaces de regular a la alza otras sirtuinas como la SIRT1 (Elamin et al, 2018) y la SIRT3 (Hasan-Olive et al, 2019). Es más, se ha observado que el incremento en los niveles de NAD⁺ estimula la activación de FOXO1 de manera dependiente de la SIRT1 (Yamamoto et al, 2014), además que esta misma sirtuina regula la autofagia mediante la desacetilación de proteínas importantes para la iniciación de la autofagia como ATG5, ATG7 y LC3 (Lee et al, 2008). Por lo tanto existe la posibilidad de que otras sirtuinas estén participando en la estimulación de la autofagia mediada por el D-BHB.

Concerniente a TFEB, estudios previos demostraron que la actividad de las sirtuinas regula la función y biogénesis lisosomal a través de la estimulación del factor de transcripción TFEB (Bao et al, 2016), sin embargo, de manera contrastante a esta información en nuestras condiciones TFEB no resultó ser regulado por SIRT2 por lo que el mecanismo por el cual este factor de transcripción es estimulado por el D-BHB es aún incierto. Se sabe que la localización intracelular y activación de TFEB está regulada por las cinasas mTOR y AMPK. Uno de los mecanismos más estudiados de regulación de TFEB es su fosforilación y retención en el citoplasma por mTOR y por lo tanto se trata de una fosforilación de inactivación (Martina et al, 2012). Por otro lado AMPK estimula la localización al núcleo de TFEB y aumenta el metabolismo energético en macrófagos (El-Houjeiri et al, 2019). Estudios recientes han demostrado que las dietas cetogénicas y el tratamiento con BHB promueven la activación de AMPK en el hígado y en el cerebro, mientras que la misma condición reduce la activación de mTOR (McDaniel et al, 2011) lo que podría explicar la regulación positiva de TFEB que se observa en nuestras condiciones.

Otra posibilidad es que TFEB sea regulado por los niveles calcio intracelular, un estudio previo ha demostrado que el BHB aumenta los niveles de calcio intracelular y activa vías de señalización mediadas por calcio en neuronas de hipocampo (Hu et al, 2020). TFEB es activado por calcio a través de su desfosforilación por calcineurina (Medina et al, 2015), lo que también convierte a esta vía como un posible mecanismo por el cual el BHB podría estimular a TFEB. Aún con esta información, no hay que descartar la posibilidad de que las sirtuinas podrían estar regulando la actividad de TFEB sin necesariamente regular su localización nuclear, por lo que faltaría investigar si SIRT2 podría regular la actividad transcripcional de TFEB en nuestras condiciones.

Por último, es evidente que la activación de las sirtuinas puede ser de gran beneficio para estimular una mejor salud celular al promover mecanismos como la autofagia y el recambio de mitocondrias, esto a través de la activación de factores de transcripción maestros que regulan estos procesos. Es importante recalcar que todos estos mecanismos fueron estimulados por la presencia de cuerpos cetónicos, metabolitos que se han relacionado con varios efectos benéficos en el sistema nervioso pero que al encontrarse una relación con las sirtuinas se abre la oportunidad de poder comprender mejor los efectos del D-BHB en la salud neuronal y en el envejecimiento. De manera esquemática se representa la vía de señalización que se encontró para el BHB y su impacto en la autofagia, biogénesis lisosomal y el recambio de mitocondrias posiblemente mediado por la activación de las sirtuinas (**Fig. 19**).

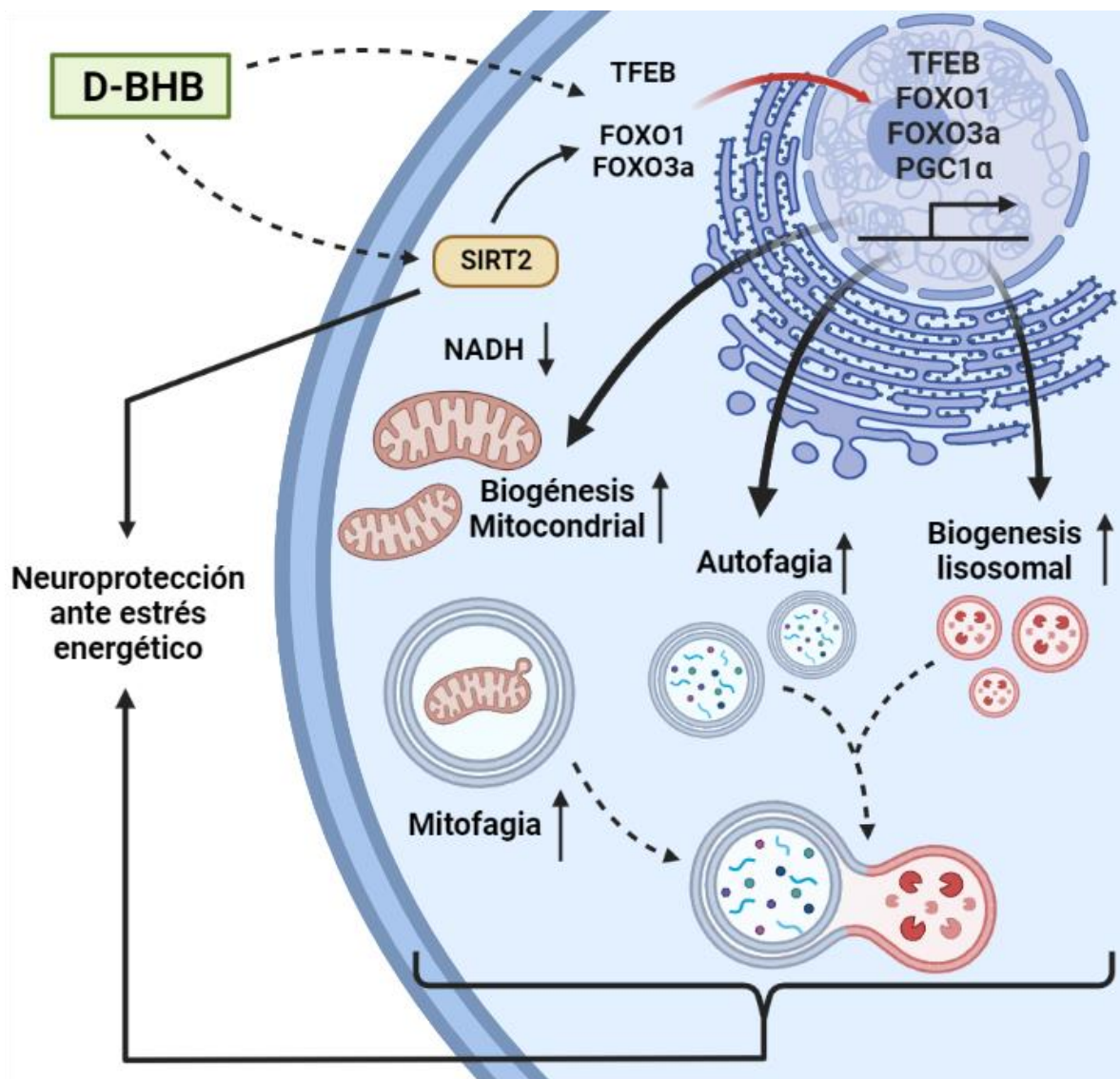


Figura 19 Modelo de la acción del D-BHB sobre la activación de la autofagia, mitofagia y biogénesis lisosomal mediado por la translocación al núcleo de la familia de los FOXOs y TFEB. Esquema realizado en Biorender.

Conclusión

En conclusión nuestros resultados sugieren que el D-BHB regula positivamente la autofagia, la biogénesis lisosomal y la mitofagia a través de los factores de transcripción TFEB y FOXOs, promoviendo el recambio de mitocondrias y confiriendo a las neuronas una resistencia ante diversos tipos de estrés celular. Todo esto regulado posiblemente por un aumento en la actividad de sirtuinas, sugiriendo un nuevo mecanismo mediado por el cuerpo cetónico D-BHB.

Perspectivas

- Investigar los mecanismos por el cual el D-BHB estimula la mitofagia
- Inhibir la sirtuina 2 farmacológicamente y ver su impacto en la autofagia y la mitofagia.
- Investigar los mecanismos de activación de TFEB en las neuronas tratadas con D-BHB.
- Silenciar TFEB y valorar su participación en la mitofagia y la protección mediada por el D-BHB.

Referencias

Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Gibson SB (2008) Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* **4**: 195-204

Bao J, Zheng L, Zhang Q, Li X, Zhang X, Li Z, Bai X, Zhang Z, Huo W, Zhao X, Shang S, Wang Q, Zhang C, Ji J (2016) Deacetylation of TFEB promotes fibrillar Abeta degradation by upregulating lysosomal biogenesis in microglia. *Protein & cell* **7**: 417-433

Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology* **29**: 2570-2581

Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC (2016) Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual review of biochemistry* **85**: 685-713

Bosch-Presegue L, Vaquero A (2014) Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene* **33**: 3764-3775

Camandola S, Mattson MP (2017) Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO journal* **36**: 1474-1492

Camberos-Luna L, Geronimo-Olvera C, Montiel T, Rincon-Heredia R, Massieu L (2016) The Ketone Body, beta-Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons. *Neurochemical research* **41**: 600-609

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* **133**: 104614

Chen G, Kroemer G, Kepp O (2020) Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Frontiers in cell and developmental biology* **8**: 200

Chen X, Lu W, Wu D (2021) Sirtuin 2 (SIRT2): Confusing Roles in the Pathophysiology of Neurological Disorders. *Frontiers in neuroscience* **15**: 614107

Cheng Z (2019) The FoxO-Autophagy Axis in Health and Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **30**: 658-671

Chi Y, Shi C, Zhao Y, Guo C (2016) Forkhead box O (FOXO) 3 modulates hypoxia-induced autophagy through AMPK signalling pathway in cardiomyocytes. *Bioscience reports* **36**

- Di Malta C, Cinque L, Settembre C (2019) Transcriptional Regulation of Autophagy: Mechanisms and Diseases. *Frontiers in cell and developmental biology* **7**: 114
- Dikic I, Elazar Z (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* **19**: 349-364
- Ding WX, Yin XM (2012) Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological chemistry* **393**: 547-564
- Donmez G (2012) The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends in pharmacological sciences* **33**: 494-501
- Donmez G, Outeiro TF (2013) SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO molecular medicine* **5**: 344-352
- Edwards C, Canfield J, Copes N, Rehan M, Lipps D, Bradshaw PC (2014) D-beta-hydroxybutyrate extends lifespan in *C. elegans*. *Aging* **6**: 621-644
- Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL (2011) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**: 643-644
- El-Houjeiri L, Possik E, Vijayaraghavan T, Paquette M, Martina JA, Kazan JM, Ma EH, Jones R, Blanchette P, Puertollano R, Pause A (2019) The Transcription Factors TFEB and TFE3 Link the FLCN-AMPK Signaling Axis to Innate Immune Response and Pathogen Resistance. *Cell reports* **26**: 3613-3628 e3616
- Elamin M, Ruskin DN, Masino SA, Sacchetti P (2017) Ketone-Based Metabolic Therapy: Is Increased NAD(+) a Primary Mechanism? *Frontiers in molecular neuroscience* **10**: 377
- Elamin M, Ruskin DN, Masino SA, Sacchetti P (2018) Ketogenic Diet Modulates NAD(+)-Dependent Enzymes and Reduces DNA Damage in Hippocampus. *Frontiers in cellular neuroscience* **12**: 263
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 2286-2287
- Fang EF (2019) Mitophagy and NAD(+) inhibit Alzheimer disease. *Autophagy* **15**: 1112-1114
- Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, Lautrup S, Hasan-Olive MM, Caponio D, Dan X, Rocktaschel P, Croteau DL, Akbari M, Greig NH, Fladby T, Nilsen H, Cader MZ, Mattson MP, Tavernarakis N, Bohr VA (2019) Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* **22**: 401-412
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* **12**: 119-131

- Gleichmann M, Mattson MP (2011) Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxidants & redox signaling* **14**: 1261-1273
- Guerra F, Girolimetti G, Beli R, Mitruccio M, Pacelli C, Ferretta A, Gasparre G, Cocco T, Bucci C (2019) Synergistic Effect of Mitochondrial and Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease. *Cells* **8**
- Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson AB (2012) Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *The Journal of biological chemistry* **287**: 19094-19104
- Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA, Sadoshima J (2010) Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. *Circulation research* **107**: 1470-1482
- Hars ES, Qi H, Ryazanov AG, Jin S, Cai L, Hu C, Liu LF (2007) Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy* **3**: 93-95
- Hartman AL, Vining EP (2007) Clinical aspects of the ketogenic diet. *Epilepsia* **48**: 31-42
- Hasan-Olive MM, Lauritzen KH, Ali M, Rasmussen LJ, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2019) A Ketogenic Diet Improves Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics via the PGC1alpha-SIRT3-UCP2 Axis. *Neurochemical research* **44**: 22-37
- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* **43**: 67-93
- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 225-238
- Hu E, Du H, Shang S, Zhang Y, Lu X (2020) Beta-Hydroxybutyrate Enhances BDNF Expression by Increasing H3K4me3 and Decreasing H2AK119ub in Hippocampal Neurons. *Frontiers in neuroscience* **14**: 591177
- Hu EL, Du H, Zhu XL, Wang LL, Shang S, Wu XJ, Lu HX, Lu XY (2018) Beta-hydroxybutyrate Promotes the Expression of BDNF in Hippocampal Neurons under Adequate Glucose Supply. *Neuroscience* **386**: 315-325
- Ivankovic D, Chau KY, Schapira AH, Gegg ME (2016) Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *Journal of neurochemistry* **136**: 388-402
- Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of cell biology* **191**: 933-942

Jing E, Gesta S, Kahn CR (2007) SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell metabolism* **6**: 105-114

Johansen T, Lamark T (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**: 279-296

Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Lee HY, Birkenfeld AL, Frederick DW, Zhang D, Zhang XM, Samuel VT, Shulman GI (2010) A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **299**: E808-815

Julio-Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, Geronimo-Olvera C, Massieu L (2015) Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by beta-hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **35**: 851-860

Kety SS, Schmidt CF (1948) The Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *The Journal of clinical investigation* **27**: 476-483

Kim DH, Park MH, Ha S, Bang EJ, Lee Y, Lee AK, Lee J, Yu BP, Chung HY (2019) Anti-inflammatory action of beta-hydroxybutyrate via modulation of PGC-1alpha and FoxO1, mimicking calorie restriction. *Aging* **11**: 1283-1304

Kim HJ, Joe Y, Rah SY, Kim SK, Park SU, Park J, Kim J, Ryu J, Cho GJ, Surh YJ, Ryter SW, Kim UH, Chung HT (2018) Carbon monoxide-induced TFEB nuclear translocation enhances mitophagy/mitochondrial biogenesis in hepatocytes and ameliorates inflammatory liver injury. *Cell death & disease* **9**: 1060

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* **13**: 132-141

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adihetty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akporiaye ET, Al-Rubeai M, Albaiceta GM, Albanese C, Albani D, Albert ML, Aldudo J, Algul H, Alirezaei M, Alloza I, Almasan A, Almonte-Beceril M, Alnemri ES, Alonso C, Altan-Bonnet N, Altieri DC, Alvarez S, Alvarez-Erviti L, Alves S, Amadoro G, Amano A, Amantini C, Ambrosio S, Amelio I, Amer AO, Amessou M, Amon A, An Z, Anania FA, Andersen SU, Andley UP, Andreadi CK, Andrieu-Abadie N, Anel A, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Antonioli M, Aoki H, Apostolova N, Aquila S, Aquilano K, Araki K, Arama E, Aranda A, Araya J, Arcaro A, Arias E, Arimoto H, Ariosa AR, Armstrong JL, Arnould T, Arsov I, Asanuma K, Askanas V, Asselin E, Atarashi R, Atherton SS, Atkin JD, Attardi LD, Auburger P, Auburger G, Aurelian L, Autelli R, Avagliano L, Avantaggiati ML, Avrahami L, Awale S, Azad N, Bachetti T, Backer JM, Bae DH, Bae JS, Bae ON, Bae SH, Baehrecke EH, Baek SH, Baghdiguian S, Bagniewska-Zadworna A, Bai H, Bai J, Bai XY, Bailly Y, Balaji KN, Balduini W, Ballabio A, Balzan R, Banerjee R, Banhegyi G, Bao H, Barbeau B, Barrachina MD, Barreiro E, Bartel B, Bartolome A, Bassham DC, Bassi MT, Bast RC, Jr., Basu A, Batista MT, Batoko H, Battino M, Bauckman K, Baumgarner BL, Bayer KU, Beale R, Beaulieu JF, Beck GR, Jr., Becker C, Beckham JD, Bedard PA,

Bednarski PJ, Begley TJ, Behl C, Behrends C, Behrens GM, Behrns KE, Bejarano E, Belaid A, Belleudi F, Benard G, Berchem G, Bergamaschi D, Bergami M, Berkhout B, Berliocchi L, Bernard A, Bernard M, Bernassola F, Bertolotti A, Bess AS, Besteiro S, Bettuzzi S, Bhalla S, Bhattacharyya S, Bhutia SK, Biagosch C, Bianchi MW, Biard-Piechaczyk M, Billes V, Bincoletto C, Bingol B, Bird SW, Bitoun M, Bjedov I, Blackstone C, Blanc L, Blanco GA, Blomhoff HK, Boada-Romero E, Bockler S, Boes M, Boesze-Battaglia K, Boise LH, Bolino A, Boman A, Bonaldo P, Bordi M, Bosch J, Botana LM, Botti J, Bou G, Bouche M, Bouchecareilh M, Boucher MJ, Boulton ME, Bouret SG, Boya P, Boyer-Guittaut M, Bozhkov PV, Brady N, Braga VM, Brancolini C, Braus GH, Bravo-San Pedro JM, Brennan LA, Bresnick EH, Brest P, Bridges D, Bringer MA, Brini M, Brito GC, Brodin B, Brookes PS, Brown EJ, Brown K, Broxmeyer HE, Bruhat A, Brum PC, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Bryson-Richardson RJ, Buch S, Buchan AM, Budak H, Bulavin DV, Bultman SJ, Bultynck G, Bumbasirevic V, Burelle Y, Burke RE, Burmeister M, Butikofer P, Caberlotto L, Cadwell K, Cahova M, Cai D, Cai J, Cai Q, Calatayud S, Camougrand N, Campanella M, Campbell GR, Campbell M, Campello S, Candau R, Caniggia I, Cantoni L, Cao L, Caplan AB, Caraglia M, Cardinali C, Cardoso SM, Carew JS, Carleton LA, Carlin CR, Carloni S, Carlsson SR, Carmona-Gutierrez D, Carneiro LA, Carnevali O, Carra S, Carrier A, Carroll B, Casas C, Casas J, Cassinelli G, Castets P, Castro-Obregon S, Cavallini G, Ceccherini I, Cecconi F, Cederbaum AI, Cena V, Cenci S, Cerella C, Cervia D, Cetrullo S, Chaachouay H, Chae HJ, Chagin AS, Chai CY, Chakrabarti G, Chamilos G, Chan EY, Chan MT, Chandra D, Chandra P, Chang CP, Chang RC, Chang TY, Chatham JC, Chatterjee S, Chauhan S, Che Y, Cheetham ME, Cheluvappa R, Chen CJ, Chen G, Chen GC, Chen G, Chen H, Chen JW, Chen JK, Chen M, Chen M, Chen P, Chen Q, Chen Q, Chen SD, Chen S, Chen SS, Chen W, Chen WJ, Chen WQ, Chen W, Chen X, Chen YH, Chen YG, Chen Y, Chen Y, Chen Y, Chen YJ, Chen YQ, Chen Y, Chen Z, Chen Z, Cheng A, Cheng CH, Cheng H, Cheong H, Cherry S, Chesney J, Cheung CH, Chevet E, Chi HC, Chi SG, Chiacchiera F, Chiang HL, Chiarelli R, Chiariello M, Chieppa M, Chin LS, Chiong M, Chiu GN, Cho DH, Cho SG, Cho WC, Cho YY, Cho YS, Choi AM, Choi EJ, Choi EK, Choi J, Choi ME, Choi SI, Chou TF, Chouaib S, Choubey D, Choubey V, Chow KC, Chowdhury K, Chu CT, Chuang TH, Chun T, Chung H, Chung T, Chung YL, Chwae YJ, Cianfanelli V, Ciarcia R, Ciechomska IA, Ciriolo MR, Cirone M, Claerhout S, Clague MJ, Claria J, Clarke PG, Clarke R, Clementi E, Cleyrat C, Cnop M, Coccia EM, Cocco T, Codogno P, Coers J, Cohen EE, Colecchia D, Coletto L, Coll NS, Colucci-Guyon E, Comincini S, Condello M, Cook KL, Coombs GH, Cooper CD, Cooper JM, Coppens I, Corasaniti MT, Corazzari M, Corbalan R, Corcelle-Termeau E, Cordero MD, Corral-Ramos C, Corti O, Cossarizza A, Costelli P, Costes S, Cotman SL, Coto-Montes A, Cottet S, Couve E, Covey LR, Cowart LA, Cox JS, Coxon FP, Coyne CB, Cragg MS, Craven RJ, Crepaldi T, Crespo JL, Criollo A, Crippa V, Cruz MT, Cuervo AM, Cuezva JM, Cui T, Cutillas PR, Czaja MJ, Czyzyk-Krzeska MF, Dagda RK, Dahmen U, Dai C, Dai W, Dai Y, Dalby KN, Dalla Valle L, Dalmasso G, D'Amelio M, Damme M, Darfeuille-Michaud A, Dargemont C, Darley-Usmar VM, Dasarathy S, Dasgupta B, Dash S, Dass CR, Davey HM, Davids LM, Davila D, Davis RJ, Dawson TM, Dawson VL, Daza P, de Belleruche J, de Figueiredo P, de Figueiredo RC, de la Fuente J, De Martino L, De Matteis A, De Meyer GR, De Milito A, De Santi M, de Souza W, De Tata V, De Zio D, Debnath J, Dechant R, Decuypere JP, Deegan S, Dehay B, Del Bello B, Del Re DP, Delage-Mourroux R, Delbridge LM, Deldicque L, Delorme-Axford E, Deng Y, Dengjel J, Denizot M, Dent P, Der CJ, Deretic V, Derrien B, Deutsch E, Devarenne TP, Devenish RJ, Di Bartolomeo S, Di Daniele N, Di Domenico F, Di Nardo A, Di Paola S, Di Pietro A, Di Renzo L, DiAntonio A, Diaz-Araya G, Diaz-Laviada I, Diaz-Meco MT, Diaz-Nido J, Dickey CA, Dickson RC, Diederich M, Digard P, Dikic I, Dinesh-Kumar SP, Ding C, Ding WX, Ding Z, Dini L, Distler JH, Diwan A, Djavaheri-Mergny M, Dmytruk K, Dobson RC, Doetsch V, Dokladny K, Dokudovskaya S, Donadelli M, Dong XC, Dong X, Dong Z, Donohue TM, Jr., Doran KS, D'Orazi G, Dorn GW, 2nd, Dosenko V, Dridi S, Drucker L, Du J, Du LL, Du L, du Toit A, Dua P, Duan L, Duann P, Dubey VK, Duchon MR, Duchosal MA, Duez H, Dugail I, Dumit VI, Duncan MC, Dunlop EA, Dunn WA, Jr., Dupont N, Dupuis L, Duran RV, Durcan TM, Duvezin-Caubet S, Duvvuri U, Eapen V, Ebrahimi-Fakhari D, Echard A, Eckhart L, Edelstein CL, Edinger AL, Eichinger L, Eisenberg T, Eisenberg-Lerner A, Eissa NT, El-Deiry WS, El-Khoury V, Elazar Z, Eldar-Finkelman H, Elliott CJ, Emanuele E, Emmenegger U, Engedal N, Engelbrecht AM, Engelender S, Enserink JM, Erdmann R, Erenpreisa J, Eri R, Eriksen JL, Erman A, Escalante R, Eskelinen EL, Espert L, Esteban-Martinez L, Evans TJ, Fabri M, Fabrias G, Fabrizi C, Facchiano A, Faergeman NJ, Faggioni A, Fairlie WD, Fan C, Fan D, Fan J, Fang S, Fanto M, Fanzani A, Farkas T, Faure M, Favier FB, Fearnhead H, Federici M, Fei E, Felizardo TC, Feng H, Feng Y, Feng Y, Ferguson TA, Fernandez AF, Fernandez-Barrena MG, Fernandez-Checa JC, Fernandez-Lopez A, Fernandez-Zapico ME, Feron O, Ferraro E, Ferreira-Halder CV, Fesus L, Feuer R, Fiesel FC, Filippi-Chiela EC, Filomeni G, Fimia GM, Fingert JH, Finkbeiner S, Finkel T, Fiorito F, Fisher PB, Flajolet M, Flamigni F,

Florey O, Florio S, Floto RA, Folini M, Follo C, Fon EA, Fornai F, Fortunato F, Fraldi A, Franco R, Francois A, Francois A, Frankel LB, Fraser ID, Frey N, Freyssenet DG, Frezza C, Friedman SL, Frigo DE, Fu D, Fuentes JM, Fueyo J, Fujitani Y, Fujiwara Y, Fujiya M, Fukuda M, Fulda S, Fusco C, Gabryel B, Gaestel M, Gailly P, Gajewska M, Galadari S, Galili G, Galindo I, Galindo MF, Galliciotti G, Galluzzi L, Galluzzi L, Galy V, Gammoh N, Gandy S, Ganesan AK, Ganesan S, Ganley IG, Gannage M, Gao FB, Gao F, Gao JX, Garcia Nannig L, Garcia Vescovi E, Garcia-Macia M, Garcia-Ruiz C, Garg AD, Garg PK, Gargini R, Gassen NC, Gatica D, Gatti E, Gavard J, Gavathiotis E, Ge L, Ge P, Ge S, Gean PW, Gelmetti V, Genazzani AA, Geng J, Genschik P, Gerner L, Gestwicki JE, Gewirtz DA, Ghavami S, Ghigo E, Ghosh D, Giammarioli AM, Giampieri F, Giampietri C, Giatromanolaki A, Gibbings DJ, Gibellini L, Gibson SB, Ginet V, Giordano A, Giorgini F, Giovannetti E, Girardin SE, Gispert S, Giuliano S, Gladson CL, Glavic A, Gleave M, Godefroy N, Gogal RM, Jr., Gokulan K, Goldman GH, Goletti D, Goligorsky MS, Gomes AV, Gomes LC, Gomez H, Gomez-Manzano C, Gomez-Sanchez R, Goncalves DA, Goncu E, Gong Q, Gongora C, Gonzalez CB, Gonzalez-Alegre P, Gonzalez-Cabo P, Gonzalez-Polo RA, Goping IS, Gorbea C, Gorbunov NV, Goring DR, Gorman AM, Gorski SM, Goruppi S, Goto-Yamada S, Gotor C, Gottlieb RA, Gozes I, Gozuacik D, Graba Y, Graef M, Granato GE, Grant GD, Grant S, Gravina GL, Green DR, Greenhough A, Greenwood MT, Grimaldi B, Gros F, Grose C, Groulx JF, Gruber F, Grumati P, Grune T, Guan JL, Guan KL, Guerra B, Guillen C, Gulshan K, Gunst J, Guo C, Guo L, Guo M, Guo W, Guo XG, Gust AA, Gustafsson AB, Gutierrez E, Gutierrez MG, Gwak HS, Haas A, Haber JE, Hadano S, Hagedorn M, Hahn DR, Halayko AJ, Hamacher-Brady A, Hamada K, Hamai A, Hamann A, Hamasaki M, Hamer I, Hamid Q, Hammond EM, Han F, Han W, Handa JT, Hanover JA, Hansen M, Harada M, Harhaji-Trajkovic L, Harper JW, Harrath AH, Harris AL, Harris J, Hasler U, Hasselblatt P, Hasui K, Hawley RG, Hawley TS, He C, He CY, He F, He G, He RR, He XH, He YW, He YY, Heath JK, Hebert MJ, Heinzen RA, Helgason GV, Hensel M, Henske EP, Her C, Herman PK, Hernandez A, Hernandez C, Hernandez-Tiedra S, Hetz C, Hiesinger PR, Higaki K, Hilfiker S, Hill BG, Hill JA, Hill WD, Hino K, Hofius D, Hofman P, Hoglinger GU, Hohfeld J, Holz MK, Hong Y, Hood DA, Hoozemans JJ, Hoppe T, Hsu C, Hsu CY, Hsu LC, Hu D, Hu G, Hu HM, Hu H, Hu MC, Hu YC, Hu ZW, Hua F, Hua Y, Huang C, Huang HL, Huang KH, Huang KY, Huang S, Huang S, Huang W, Huang YR, Huang Y, Huang Y, Huber TB, Huebbe P, Huh HK, Hulmi JJ, Hur GM, Hurley JH, Husak Z, Hussain SN, Hussain S, Hwang JJ, Hwang S, Hwang TI, Ichihara A, Imai Y, Imbriano C, Inomata M, Into T, Iovane V, Iovanna JL, Iozzo RV, Ip NY, Irazoqui JE, Iribarren P, Isaka Y, Isakovic AJ, Ischiropoulos H, Isenberg JS, Ishaq M, Ishida H, Ishii I, Ishmael JE, Isidoro C, Isobe K, Isono E, Issazadeh-Navikas S, Itahana K, Itakura E, Ivanov AI, Iyer AK, Izquierdo JM, Izumi Y, Izzo V, Jaattela M, Jaber N, Jackson DJ, Jackson WT, Jacob TG, Jacques TS, Jagannath C, Jain A, Jana NR, Jang BK, Jani A, Janji B, Jannig PR, Jansson PJ, Jean S, Jendrach M, Jeon JH, Jessen N, Jeung EB, Jia K, Jia L, Jiang H, Jiang H, Jiang L, Jiang T, Jiang X, Jiang X, Jiang X, Jiang Y, Jiang Y, Jimenez A, Jin C, Jin H, Jin L, Jin M, Jin S, Jinwal UK, Jo EK, Johansen T, Johnson DE, Johnson GV, Johnson JD, Jonasch E, Jones C, Joosten LA, Jordan J, Joseph AM, Joseph B, Joubert AM, Ju D, Ju J, Juan HF, Juenemann K, Juhasz G, Jung HS, Jung JU, Jung YK, Jungbluth H, Justice MJ, Jutten B, Kaakoush NO, Kaarniranta K, Kaasik A, Kabuta T, Kaeffler B, Kagedal K, Kahana A, Kajimura S, Kakhlon O, Kalia M, Kalvakolanu DV, Kamada Y, Kambas K, Kaminsky VO, Kampinga HH, Kandouz M, Kang C, Kang R, Kang TC, Kanki T, Kanneganti TD, Kanno H, Kanthasamy AG, Kantorow M, Kaparakis-Liaskos M, Kapuy O, Karantza V, Karim MR, Karmakar P, Kaser A, Kaushik S, Kawula T, Kaynar AM, Ke PY, Ke ZJ, Kehrl JH, Keller KE, Kemper JK, Kenworthy AK, Kepp O, Kern A, Kesari S, Kessel D, Ketteler R, Kettelhut Ido C, Khambu B, Khan MM, Khandelwal VK, Khare S, Kiang JG, Kiger AA, Kihara A, Kim AL, Kim CH, Kim DR, Kim DH, Kim EK, Kim HY, Kim HR, Kim JS, Kim JH, Kim JC, Kim JH, Kim KW, Kim MD, Kim MM, Kim PK, Kim SW, Kim SY, Kim YS, Kim Y, Kimchi A, Kimmelman AC, Kimura T, King JS, Kirkegaard K, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kishi S, Kitajima Y, Kitamoto K, Kitaoka Y, Kitazato K, Kley RA, Klimecki WT, Klinkenberg M, Klucken J, Knaevelsrud H, Knecht E, Knuppertz L, Ko JL, Kobayashi S, Koch JC, Koechlin-Ramonatxo C, Koenig U, Koh YH, Kohler K, Kohlwein SD, Koike M, Komatsu M, Kominami E, Kong D, Kong HJ, Konstantakou EG, Kopp BT, Korcsmaros T, Korhonen L, Korolchuk VI, Koshkina NV, Kou Y, Koukourakis MI, Koumenis C, Kovacs AL, Kovacs T, Kovacs WJ, Koya D, Kraft C, Krainc D, Kramer H, Kravic-Stevovic T, Krek W, Kretz-Remy C, Krick R, Krishnamurthy M, Kriston-Vizi J, Kroemer G, Kruger MC, Kruger R, Ktistakis NT, Kuchitsu K, Kuhn C, Kumar AP, Kumar A, Kumar A, Kumar D, Kumar D, Kumar R, Kumar S, Kundu M, Kung HJ, Kuno A, Kuo SH, Kuret J, Kurz T, Kwok T, Kwon TK, Kwon YT, Kyrmizi I, La Spada AR, Lafont F, Lahm T, Lakkaraju A, Lam T, Lamark T, Lancel S, Landowski TH, Lane DJ, Lane JD, Lanzi C, Lapaquette P, Lapierre LR, Laporte J, Laukkanen J, Laurie GW, Lavandero S, Lavie L, LaVoie MJ, Law BY, Law HK, Law KB, Layfield R, Lazo PA, Le Cam L, Le Roch KG, Le Stunff H,

Leardkamolkarn V, Lecuit M, Lee BH, Lee CH, Lee EF, Lee GM, Lee HJ, Lee H, Lee JK, Lee J, Lee JH, Lee JH, Lee M, Lee MS, Lee PJ, Lee SW, Lee SJ, Lee SJ, Lee SY, Lee SH, Lee SS, Lee SJ, Lee S, Lee YR, Lee YJ, Lee YH, Leeuwenburgh C, Lefort S, Legouis R, Lei J, Lei QY, Leib DA, Leibowitz G, Lekli I, Lemaire SD, Lemasters JJ, Lemberg MK, Lemoine A, Leng S, Lenz G, Lenzi P, Lerman LO, Lettieri Barbato D, Leu JI, Leung HY, Levine B, Lewis PA, Lezoualc'h F, Li C, Li F, Li FJ, Li J, Li K, Li L, Li M, Li M, Li Q, Li R, Li S, Li W, Li W, Li X, Li Y, Lian J, Liang C, Liang Q, Liao Y, Liberal J, Liberski PP, Lie P, Lieberman AP, Lim HJ, Lim KL, Lim K, Lima RT, Lin CS, Lin CF, Lin F, Lin F, Lin FC, Lin K, Lin KH, Lin PH, Lin T, Lin WW, Lin YS, Lin Y, Linden R, Lindholm D, Lindqvist LM, Lingor P, Linkermann A, Liotta LA, Lipinski MM, Lira VA, Lisanti MP, Liton PB, Liu B, Liu C, Liu CF, Liu F, Liu HJ, Liu J, Liu JJ, Liu JL, Liu K, Liu L, Liu L, Liu Q, Liu RY, Liu S, Liu S, Liu W, Liu XD, Liu X, Liu XH, Liu X, Liu X, Liu X, Liu Y, Liu Y, Liu Z, Liu Z, Liuzzi JP, Lizard G, Ljubic M, Lodhi JJ, Logue SE, Lokeshwar BL, Long YC, Lonial S, Loos B, Lopez-Otin C, Lopez-Vicario C, Lorente M, Lorenzi PL, Lorincz P, Los M, Lotze MT, Lovat PE, Lu B, Lu B, Lu J, Lu Q, Lu SM, Lu S, Lu Y, Luciano F, Luckhart S, Lucocq JM, Ludovico P, Lugea A, Lukacs NW, Lum JJ, Lund AH, Luo H, Luo J, Luo S, Luparello C, Lyons T, Ma J, Ma Y, Ma Y, Ma Z, Machado J, Machado-Santelli GM, Macian F, MacIntosh GC, MacKeigan JP, Macleod KF, MacMicking JD, MacMillan-Crow LA, Madeo F, Madesh M, Madrigal-Matute J, Maeda A, Maeda T, Maegawa G, Maellaro E, Maes H, Magarinos M, Maiese K, Maiti TK, Maiuri L, Maiuri MC, Maki CG, Malli R, Malorni W, Maloyan A, Mami-Chouaib F, Man N, Mancias JD, Mandelkow EM, Mandell MA, Manfredi AA, Manie SN, Manzoni C, Mao K, Mao Z, Mao ZW, Marambaud P, Marconi AM, Marelja Z, Marfe G, Margeta M, Margittai E, Mari M, Mariani FV, Marin C, Marinelli S, Marino G, Markovic I, Marquez R, Martelli AM, Martens S, Martin KR, Martin SJ, Martin S, Martin-Acebes MA, Martin-Sanz P, Martinand-Mari C, Martinet W, Martinez J, Martinez-Lopez N, Martinez-Outschoorn U, Martinez-Velazquez M, Martinez-Vicente M, Martins WK, Mashima H, Mastrianni JA, Matarese G, Matarrese P, Mateo R, Matoba S, Matsumoto N, Matsushita T, Matsuura A, Matsuzawa T, Mattson MP, Matus S, Maugeri N, Mauvezin C, Mayer A, Maysinger D, Mazzolini GD, McBrayer MK, McCall K, McCormick C, McInerney GM, McIver SC, McKenna S, McMahon JJ, McNeish IA, Mechta-Grigoriou F, Medema JP, Medina DL, Megyeri K, Mehrpour M, Mehta JL, Mei Y, Meier UC, Meijer AJ, Melendez A, Melino G, Melino S, de Melo EJ, Mena MA, Meneghini MD, Menendez JA, Menezes R, Meng L, Meng LH, Meng S, Menghini R, Menko AS, Menna-Barreto RF, Menon MB, Meraz-Rios MA, Merla G, Merlini L, Merlot AM, Meryk A, Meschini S, Meyer JN, Mi MT, Miao CY, Micale L, Michaeli S, Michiels C, Migliaccio AR, Mihailidou AS, Mijaljica D, Mikoshiba K, Milan E, Miller-Fleming L, Mills GB, Mills IG, Minakaki G, Minassian BA, Ming XF, Minibayeva F, Minina EA, Mintern JD, Minucci S, Miranda-Vizuete A, Mitchell CH, Miyamoto S, Miyazawa K, Mizushima N, Mnich K, Mograbi B, Mohseni S, Moita LF, Molinari M, Molinari M, Moller AB, Mollereau B, Mollinedo F, Mongillo M, Monick MM, Montagnaro S, Montell C, Moore DJ, Moore MN, Mora-Rodriguez R, Moreira PI, Morel E, Morelli MB, Moreno S, Morgan MJ, Moris A, Moriyasu Y, Morrison JL, Morrison LA, Morselli E, Moscat J, Moseley PL, Mostowy S, Motori E, Mottet D, Mottram JC, Moussa CE, Mpakou VE, Mukhtar H, Mulcahy Levy JM, Muller S, Munoz-Moreno R, Munoz-Pinedo C, Munz C, Murphy ME, Murray JT, Murthy A, Mysorekar IU, Nabi IR, Nabissi M, Nader GA, Nagahara Y, Nagai Y, Nagata K, Nagelkerke A, Nagy P, Naidu SR, Nair S, Nakano H, Nakatogawa H, Nanjundan M, Napolitano G, Naqvi NI, Nardacci R, Narendra DP, Narita M, Nascimbeni AC, Natarajan R, Navegantes LC, Nawrocki ST, Nazarko TY, Nazarko VY, Neill T, Neri LM, Netea MG, Netea-Maier RT, Neves BM, Ney PA, Nezis IP, Nguyen HT, Nguyen HP, Nicot AS, Nilsen H, Nilsson P, Nishimura M, Nishino I, Niso-Santano M, Niu H, Nixon RA, Njar VC, Noda T, Noegel AA, Nolte EM, Norberg E, Norga KK, Noureini SK, Notomi S, Notterpek L, Nowikovsky K, Nukina N, Nurnberger T, O'Donnell VB, O'Donovan T, O'Dwyer PJ, Oehme I, Oeste CL, Ogawa M, Ogretmen B, Ogura Y, Oh YJ, Ohmuraya M, Ohshima T, Ojha R, Okamoto K, Okazaki T, Oliver FJ, Ollinger K, Olsson S, Orban DP, Ordones P, Orhon I, Orosz L, O'Rourke EJ, Orozco H, Ortega AL, Ortona E, Osellame LD, Oshima J, Oshima S, Osiewacz HD, Otomo T, Otsu K, Ou JH, Outeiro TF, Ouyang DY, Ouyang H, Overholtzer M, Ozbun MA, Ozdinler PH, Ozpolat B, Pacelli C, Paganetti P, Page G, Pages G, Pagnini U, Pajak B, Pak SC, Pakos-Zebrucka K, Pakpour N, Palkova Z, Palladino F, Pallauf K, Pallet N, Palmieri M, Paludan SR, Palumbo C, Palumbo S, Pampliega O, Pan H, Pan W, Panaretakis T, Pandey A, Pantazopoulou A, Papackova Z, Papademetrio DL, Papassideri I, Papini A, Parajuli N, Pardo J, Parekh VV, Parenti G, Park JJ, Park J, Park OK, Parker R, Parlato R, Parys JB, Parzych KR, Pasquet JM, Pasquier B, Pasumarthi KB, Patschan D, Patterson C, Pattingre S, Pattison S, Pause A, Pavenstadt H, Pavone F, Pedrozo Z, Pena FJ, Penalva MA, Pende M, Peng J, Penna F, Penninger JM, Pensalfini A, Pepe S, Pereira GJ, Pereira PC, Perez-de la Cruz V, Perez-Perez ME, Perez-Rodriguez D, Perez-Sala D, Perier C, Perl A, Perlmutter DH, Perrotta I, Pervaiz S, Pesonen M, Pessin JE, Peters GJ, Petersen M, Petrache I, Petrof BJ, Petrovski G, Phang JM,

Piacentini M, Pierdominici M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pietrocola F, Pimentel-Muinos FX, Pinar M, Pineda B, Pinkas-Kramarski R, Pinti M, Pinton P, Piperdi B, Piret JM, Platanius LC, Platta HW, Plowey ED, Poggeler S, Poirot M, Polcic P, Poletti A, Poon AH, Popelka H, Popova B, Poprawa I, Poulouse SM, Poulton J, Powers SK, Powers T, Pozuelo-Rubio M, Prak K, Prange R, Prescott M, Priault M, Prince S, Proia RL, Proikas-Cezanne T, Prokisch H, Promponas VJ, Przyklenk K, Puertollano R, Pugazhenth S, Puglielli L, Pujol A, Puyal J, Pyeon D, Qi X, Qian WB, Qin ZH, Qiu Y, Qu Z, Cuadrilatero J, Quinn F, Raben N, Rabinowich H, Radogna F, Ragusa MJ, Rahmani M, Raina K, Ramanadham S, Ramesh R, Rami A, Randall-Demllo S, Randow F, Rao H, Rao VA, Rasmussen BB, Rasse TM, Ratovitski EA, Rautou PE, Ray SK, Razani B, Reed BH, Reggiori F, Rehm M, Reichert AS, Rein T, Reiner DJ, Reits E, Ren J, Ren X, Renna M, Reusch JE, Revuelta JL, Reyes L, Rezaie AR, Richards RI, Richardson DR, Richetta C, Riehle MA, Rihn BH, Rikihisa Y, Riley BE, Rimbach G, Rippo MR, Ritis K, Rizzi F, Rizzo E, Roach PJ, Robbins J, Roberge M, Roca G, Roccheri MC, Rocha S, Rodrigues CM, Rodriguez CI, de Cordoba SR, Rodriguez-Muela N, Roelofs J, Rogov VV, Rohn TT, Rohrer B, Romanelli D, Romani L, Romano PS, Roncero MI, Rosa JL, Rosello A, Rosen KV, Rosenstiel P, Rost-Roszkowska M, Roth KA, Roue G, Rouis M, Rouschop KM, Ruan DT, Ruano D, Rubinsztein DC, Rucker EB, 3rd, Rudich A, Rudolf E, Rudolf R, Ruegg MA, Ruiz-Roldan C, Ruparelia AA, Rusmini P, Russ DW, Russo GL, Russo G, Russo R, Rusten TE, Ryabovol V, Ryan KM, Ryter SW, Sabatini DM, Sacher M, Sachse C, Sack MN, Sadoshima J, Saftig P, Sagi-Eisenberg R, Sahni S, Saikumar P, Saito T, Saitoh T, Sakakura K, Sakoh-Nakatogawa M, Sakuraba Y, Salazar-Roa M, Salomoni P, Saluja AK, Salvaterra PM, Salvioli R, Samali A, Sanchez AM, Sanchez-Alcazar JA, Sanchez-Prieto R, Sandri M, Sanjuan MA, Santaguida S, Santambrogio L, Santoni G, Dos Santos CN, Saran S, Sardiello M, Sargent G, Sarkar P, Sarkar S, Sarrias MR, Sarwal MM, Sasakawa C, Sasaki M, Sass M, Sato K, Sato M, Satriano J, Savaraj N, Saveljeva S, Schaefer L, Schaible UE, Scharl M, Schatzl HM, Schekman R, Scheper W, Schiavi A, Schipper HM, Schmeisser H, Schmidt J, Schmitz I, Schneider BE, Schneider EM, Schneider JL, Schon EA, Schonenberger MJ, Schonthal AH, Schorderet DF, Schroder B, Schuck S, Schulze RJ, Schwarten M, Schwarz TL, Sciarretta S, Scotto K, Scovassi AI, Screenshot RA, Screen M, Seca H, Sedej S, Segatori L, Segev N, Seglen PO, Segui-Simarro JM, Segura-Aguilar J, Seki E, Sell C, Seiliez I, Semenkovich CF, Semenza GL, Sen U, Serra AL, Serrano-Puebla A, Sesaki H, Setoguchi T, Settembre C, Shacka JJ, Shajahan-Haq AN, Shapiro IM, Sharma S, She H, Shen CK, Shen CC, Shen HM, Shen S, Shen W, Sheng R, Sheng X, Sheng ZH, Shepherd TG, Shi J, Shi Q, Shi Q, Shi Y, Shibutani S, Shibuya K, Shidoji Y, Shieh JJ, Shih CM, Shimada Y, Shimizu S, Shin DW, Shinohara ML, Shintani M, Shintani T, Shioi T, Shirabe K, Shiri-Sverdlov R, Shirihai O, Shore GC, Shu CW, Shukla D, Sibirny AA, Sica V, Sigurdson CJ, Sigurdsson EM, Sijwali PS, Sikorska B, Silveira WA, Silvente-Poirot S, Silverman GA, Simak J, Simmet T, Simon AK, Simon HU, Simone C, Simons M, Simonsen A, Singh R, Singh SV, Singh SK, Sinha D, Sinha S, Sinicrope FA, Sirko A, Sirohi K, Sishi BJ, Sittler A, Siu PM, Sivridis E, Skwarska A, Slack R, Slaninova I, Slavov N, Smaili SS, Smalley KS, Smith DR, Soenen SJ, Soleimanpour SA, Solhaug A, Somasundaram K, Son JH, Sonawane A, Song C, Song F, Song HK, Song JX, Song W, Soo KY, Sood AK, Soong TW, Soontornniyomkij V, Sorice M, Sotgia F, Soto-Pantoja DR, Sotthibundhu A, Sousa MJ, Spaink HP, Span PN, Spang A, Sparks JD, Speck PG, Spector SA, Spies CD, Springer W, Clair DS, Stacchiotti A, Staels B, Stang MT, Starczynowski DT, Starokadomskyy P, Steegborn C, Steele JW, Stefanis L, Steffan J, Stellrecht CM, Stenmark H, Stepkowski TM, Stern ST, Stevens C, Stockwell BR, Stoka V, Storchova Z, Stork B, Stratoulis V, Stravopodis DJ, Strnad P, Strohecker AM, Strom AL, Stromhaug P, Stulik J, Su YX, Su Z, Subauste CS, Subramaniam S, Sue CM, Suh SW, Sui X, Sukseree S, Sulzer D, Sun FL, Sun J, Sun J, Sun SY, Sun Y, Sun Y, Sun Y, Sundaramoorthy V, Sung J, Suzuki H, Suzuki K, Suzuki N, Suzuki T, Suzuki YJ, Swanson MS, Swanton C, Sward K, Swarup G, Sweeney ST, Sylvester PW, Szatmari Z, Szegezdi E, Szlosarek PW, Taegtmeyer H, Tafani M, Taillebourg E, Tait SW, Takacs-Vellai K, Takahashi Y, Takats S, Takemura G, Takigawa N, Talbot NJ, Tamagno E, Tamburini J, Tan CP, Tan L, Tan ML, Tan M, Tan YJ, Tanaka K, Tanaka M, Tang D, Tang D, Tang G, Tanida I, Tanji K, Tannous BA, Tapia JA, Tasset-Cuevas I, Tatar M, Tavassoly I, Tavernarakis N, Taylor A, Taylor GS, Taylor GA, Taylor JP, Taylor MJ, Tchetina EV, Tee AR, Teixeira-Clerc F, Telang S, Tencomnao T, Teng BB, Teng RJ, Terro F, Tettamanti G, Theiss AL, Theron AE, Thomas KJ, Thome MP, Thomes PG, Thorburn A, Thorner J, Thum T, Thumm M, Thurston TL, Tian L, Till A, Ting JP, Titorenko VI, Toker L, Toldo S, Tooze SA, Topisirovic I, Torgersen ML, Torosantucci L, Torriglia A, Torrisi MR, Tournier C, Towns R, Trajkovic V, Travassos LH, Triola G, Tripathi DN, Trisciuglio D, Troncoso R, Trougakos IP, Truttmann AC, Tsai KJ, Tschan MP, Tseng YH, Tsukuba T, Tsung A, Tsvetkov AS, Tu S, Tuan HY, Tucci M, Tumbarello DA, Turk B, Turk V, Turner RF, Tveita AA, Tyagi SC, Ubukata M, Uchiyama Y, Udelnow A, Ueno T, Umekawa M, Umemiya-Shirafuji R, Underwood BR, Ungermann C, Ureshino RP, Ushioda R, Uversky VN, Uzcategui

NL, Vaccari T, Vaccaro MI, Vachova L, Vakifahmetoglu-Norberg H, Valdor R, Valente EM, Vallette F, Valverde AM, Van den Berghe G, Van Den Bosch L, van den Brink GR, van der Goot FG, van der Klei IJ, van der Laan LJ, van Doorn WG, van Egmond M, van Golen KL, Van Kaer L, van Lookeren Campagne M, Vandenabeele P, Vandenberghe W, Vanhorebeek I, Varela-Nieto I, Vasconcelos MH, Vasko R, Vavvas DG, Vega-Naredo I, Velasco G, Velentzas AD, Velentzas PD, Vellai T, Vellenga E, Vendelbo MH, Venkatachalam K, Ventura N, Ventura S, Veras PS, Verdier M, Vertessy BG, Viale A, Vidal M, Vieira HL, Vierstra RD, Vigneswaran N, Vij N, Vila M, Villar M, Villar VH, Villarroja J, Vindis C, Viola G, Viscomi MT, Vitale G, Vogl DT, Voitsekhovskaja OV, von Haefen C, von Schwarzenberg K, Voth DE, Vouret-Craviari V, Vuori K, Vyas JM, Waeber C, Walker CL, Walker MJ, Walter J, Wan L, Wan X, Wang B, Wang C, Wang CY, Wang C, Wang C, Wang C, Wang D, Wang F, Wang F, Wang G, Wang HJ, Wang H, Wang HG, Wang H, Wang HD, Wang J, Wang J, Wang M, Wang MQ, Wang PY, Wang P, Wang RC, Wang S, Wang TF, Wang X, Wang XJ, Wang XW, Wang X, Wang X, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Wang YJ, Wang Y, Wang Y, Wang YT, Wang Y, Wang ZN, Wappner P, Ward C, Ward DM, Warnes G, Watada H, Watanabe Y, Watase K, Weaver TE, Weekes CD, Wei J, Weide T, Weihl CC, Weindl G, Weis SN, Wen L, Wen X, Wen Y, Westermann B, Weyand CM, White AR, White E, Whitton JL, Whitworth AJ, Wiels J, Wild F, Wildenberg ME, Wileman T, Wilkinson DS, Wilkinson S, Willbold D, Williams C, Williams K, Williamson PR, Winklhofer KF, Witkin SS, Wohlgemuth SE, Wollert T, Wolvetang EJ, Wong E, Wong GW, Wong RW, Wong VK, Woodcock EA, Wright KL, Wu C, Wu D, Wu GS, Wu J, Wu J, Wu M, Wu M, Wu S, Wu WK, Wu Y, Wu Z, Xavier CP, Xavier RJ, Xia GX, Xia T, Xia W, Xia Y, Xiao H, Xiao J, Xiao S, Xiao W, Xie CM, Xie Z, Xie Z, Xilouri M, Xiong Y, Xu C, Xu C, Xu F, Xu H, Xu H, Xu J, Xu J, Xu J, Xu L, Xu X, Xu Y, Xu Y, Xu ZX, Xu Z, Xue Y, Yamada T, Yamamoto A, Yamanaka K, Yamashina S, Yamashiro S, Yan B, Yan B, Yan X, Yan Z, Yanagi Y, Yang DS, Yang JM, Yang L, Yang M, Yang PM, Yang P, Yang Q, Yang W, Yang WY, Yang X, Yang Y, Yang Y, Yang Z, Yang Z, Yao MC, Yao PJ, Yao X, Yao Z, Yao Z, Yasui LS, Ye M, Yedvobnick B, Yeganeh B, Yeh ES, Yeyati PL, Yi F, Yi L, Yin XM, Yip CK, Yoo YM, Yoo YH, Yoon SY, Yoshida K, Yoshimori T, Young KH, Yu H, Yu JJ, Yu JT, Yu J, Yu L, Yu WH, Yu XF, Yu Z, Yuan J, Yuan ZM, Yue BY, Yue J, Yue Z, Zacks DN, Zacksenhaus E, Zaffaroni N, Zaglia T, Zakeri Z, Zecchini V, Zeng J, Zeng M, Zeng Q, Zervos AS, Zhang DD, Zhang F, Zhang G, Zhang GC, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang JP, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang MY, Zhang X, Zhang XD, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhao M, Zhao WL, Zhao X, Zhao YG, Zhao Y, Zhao Y, Zhao YX, Zhao Z, Zhao ZJ, Zheng D, Zheng XL, Zheng X, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou GZ, Zhou G, Zhou H, Zhou SF, Zhou XJ, Zhu H, Zhu H, Zhu WG, Zhu W, Zhu XF, Zhu Y, Zhuang SM, Zhuang X, Ziparo E, Zois CE, Zoladek T, Zong WX, Zorzano A, Zughaier SM (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**: 1-222

Kocaturk NM, Gozuacik D (2018) Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Frontiers in cell and developmental biology* **6**: 128

Komatsu M, Ichimura Y (2008) [Neuronal autophagy, its defects and neurodegenerative diseases]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* **53**: 2175-2181

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880-884

Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, Mirtschink P, Ukropcova B, Gasperikova D, Pedrazzini T, Krek W (2012) Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. *Genes & development* **26**: 259-270

Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB (2007) Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *The Biochemical journal* **405**: 407-415

Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D (2010) Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *The Journal of clinical investigation* **120**: 1043-1055

Lautrup S, Sinclair DA, Mattson MP, Fang EF (2019) NAD(+) in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Cell metabolism* **30**: 630-655

Lee IH (2019) Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation. *Experimental & molecular medicine* **51**: 1-11

Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3374-3379

Li Y, Zhang X, Ma A, Kang Y (2021) Rational Application of beta-Hydroxybutyrate Attenuates Ischemic Stroke by Suppressing Oxidative Stress and Mitochondrial-Dependent Apoptosis via Activation of the Erk/CREB/eNOS Pathway. *ACS chemical neuroscience* **12**: 1219-1227

Lin A, Yao J, Zhuang L, Wang D, Han J, Lam EW, Network TR, Gan B (2014) The FoxO-BNIP3 axis exerts a unique regulation of mTORC1 and cell survival under energy stress. *Oncogene* **33**: 3183-3194

Lin SZ, Xing HP, Zang TT, Ruan X, Wo LL, He M (2018) Sirtuins in mitochondrial stress: Indispensable helpers behind the scenes. *Ageing Res Rev* **44**: 22-32

Liu D, Pitta M, Jiang H, Lee JH, Zhang G, Chen X, Kawamoto EM, Mattson MP (2013) Nicotinamide forestalls pathology and cognitive decline in Alzheimer mice: evidence for improved neuronal bioenergetics and autophagy procession. *Neurobiology of aging* **34**: 1564-1580

Liu G, Park SH, Imbesi M, Nathan WJ, Zou X, Zhu Y, Jiang H, Parisiadou L, Gius D (2017) Loss of NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-2 Alters Mitochondrial Protein Acetylation and Dysregulates Mitophagy. *Antioxidants & redox signaling* **26**: 849-863

Liu Y, Xue X, Zhang H, Che X, Luo J, Wang P, Xu J, Xing Z, Yuan L, Liu Y, Fu X, Su D, Sun S, Zhang H, Wu C, Yang J (2019) Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia. *Autophagy* **15**: 493-509

Lou G, Palikaras K, Lautrup S, Scheibye-Knudsen M, Tavernarakis N, Fang EF (2020) Mitophagy and Neuroprotection. *Trends in molecular medicine* **26**: 8-20

Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* **145**: 256-264

Maiese K (2015) FoxO proteins in the nervous system. *Analytical cellular pathology* **2015**: 569392

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* **6**: 458-471

Marosi K, Kim SW, Moehl K, Scheibye-Knudsen M, Cheng A, Cutler R, Camandola S, Mattson MP (2016) 3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *Journal of neurochemistry* **139**: 769-781

Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R (2012) mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**: 903-914

Martinez-Vicente M (2017) Neuronal Mitophagy in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in molecular neuroscience* **10**: 64

Martins R, Lithgow GJ, Link W (2016) Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging cell* **15**: 196-207

Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou XD, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**: 1435-1455

Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, Chopra V, Hersch SM, Kazantsev AG (2011) The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Human molecular genetics* **20**: 3986-3996

McDaniel SS, Rensing NR, Thio LL, Yamada KA, Wong M (2011) The ketogenic diet inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Epilepsia* **52**: e7-11

Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, Montefusco S, Scotto-Rosato A, Prezioso C, Forrester A, Settembre C, Wang W, Gao Q, Xu H, Sandri M, Rizzuto R, De Matteis MA, Ballabio A (2015) Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature cell biology* **17**: 288-299

Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H (2009) FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 5153-5158

Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences* **36**: 587-597

Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**: 728-741

Moruno-Manchon JF, Uzor NE, Kesler SR, Wefel JS, Townley DM, Nagaraja AS, Pradeep S, Mangala LS, Sood AK, Tsvetkov AS (2016) TFEB ameliorates the impairment of the autophagy-lysosome pathway in neurons induced by doxorubicin. *Aging* **8**: 3507-3519

Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM (2010) Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochimica et biophysica acta* **1802**: 167-185

Nakagawa T, Guarente L (2011) Sirtuins at a glance. *Journal of cell science* **124**: 833-838

Napolitano G, Ballabio A (2016) TFEB at a glance. *Journal of cell science* **129**: 2475-2481

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* **183**: 795-803

Newman JC, Verdin E (2014) Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**: 42-52

Newman JC, Verdin E (2017) beta-Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual review of nutrition* **37**: 51-76

Ney PA (2015) Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochimica et biophysica acta* **1853**: 2775-2783

Nezich CL, Wang C, Fogel AI, Youle RJ (2015) MiT/TFE transcription factors are activated during mitophagy downstream of Parkin and Atg5. *The Journal of cell biology* **210**: 435-450

Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* **19**: 983-997

Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports* **11**: 45-51

Okarmus J, Bogetofte H, Schmidt SI, Ryding M, Garcia-Lopez S, Ryan BJ, Martinez-Serrano A, Hyttel P, Meyer M (2020) Lysosomal perturbations in human dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells with PARK2 mutation. *Scientific reports* **10**: 10278

Okatsu K, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N (2015) Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of cell science* **128**: 964-978

Olivares S, Henkel AS (2017) Induction of fibroblast growth factor 21 does not require activation of the hepatic X-box binding protein 1 in mice. *Molecular metabolism* **6**: 1616-1624

- Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N (2018) Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature cell biology* **20**: 1013-1022
- Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A (2011) Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human molecular genetics* **20**: 3852-3866
- Paoli A, Bianco A, Damiani E, Bosco G (2014) Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. *BioMed research international* **2014**: 474296
- Park JT, Lee YS, Cho KA, Park SC (2018) Adjustment of the lysosomal-mitochondrial axis for control of cellular senescence. *Ageing Res Rev* **47**: 176-182
- Pasinetti GM, Bilski AE, Zhao W (2013) Sirtuins as therapeutic targets of ALS. *Cell research* **23**: 1073-1074
- Polito VA, Li H, Martini-Stoica H, Wang B, Yang L, Xu Y, Swartzlander DB, Palmieri M, di Ronza A, Lee VM, Sardiello M, Ballabio A, Zheng H (2014) Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO molecular medicine* **6**: 1142-1160
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **90**: 1383-1435
- Roberts MN, Wallace MA, Tomilov AA, Zhou Z, Marcotte GR, Tran D, Perez G, Gutierrez-Casado E, Koike S, Knotts TA, Imai DM, Griffey SM, Kim K, Hagopian K, McMackin MZ, Haj FG, Baar K, Cortopassi GA, Ramsey JJ, Lopez-Dominguez JA (2018) A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice. *Cell metabolism* **27**: 1156
- Roczniak-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC, Ferguson SM (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling* **5**: ra42
- Santo EE, Paik J (2018) FOXO in Neural Cells and Diseases of the Nervous System. *Current topics in developmental biology* **127**: 105-118
- Schaffner I, Minakaki G, Khan MA, Balta EA, Schlotzer-Schrehardt U, Schwarz TJ, Beckervordersandforth R, Winner B, Webb AE, DePinho RA, Paik J, Wurst W, Klucken J, Lie DC (2018) FoxO Function Is Essential for Maintenance of Autophagic Flux and Neuronal Morphogenesis in Adult Neurogenesis. *Neuron* **99**: 1188-1203 e1186
- Schondorf DC, Ivanyuk D, Baden P, Sanchez-Martinez A, De Cicco S, Yu C, Giunta I, Schwarz LK, Di Napoli G, Panagiotakopoulou V, Nestel S, Keatinge M, Pruszkowski J, Bandmann O, Heimrich B, Gasser T, Whitworth AJ, Deleidi M (2018) The NAD⁺ Precursor Nicotinamide Riboside Rescues Mitochondrial Defects and Neuronal Loss in iPSC and Fly Models of Parkinson's Disease. *Cell reports* **23**: 2976-2988

- Seira O, Kolehmainen K, Liu J, Streijger F, Haegert A, Lebihan S, Boushel R, Tetzlaff W (2021) Ketogenesis controls mitochondrial gene expression and rescues mitochondrial bioenergetics after cervical spinal cord injury in rats. *Scientific reports* **11**: 16359
- Settembre C, De Cegli R, Mansueto G, Saha PK, Vetrini F, Visvikis O, Huynh T, Carissimo A, Palmer D, Klisch TJ, Wollenberg AC, Di Bernardo D, Chan L, Irazoqui JE, Ballabio A (2013) TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nature cell biology* **15**: 647-658
- Shi RY, Zhu SH, Li V, Gibson SB, Xu XS, Kong JM (2014) BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke. *CNS neuroscience & therapeutics* **20**: 1045-1055
- Shimazu T, Hirschev MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV, Jr., de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E (2013) Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* **339**: 211-214
- Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD (2008) Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* **4**: 176-184
- Singh P, Hanson PS, Morris CM (2017) Sirtuin-2 Protects Neural Cells from Oxidative Stress and Is Elevated in Neurodegeneration. *Parkinson's disease* **2017**: 2643587
- Sokoloff L (1981) Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **1**: 7-36
- Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY (2012) Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental & molecular medicine* **44**: 89-98
- Squire LR (2013) *Fundamental neuroscience*, 4th edn. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.
- Subramaniam S (2020) Exaggerated mitophagy: a weapon of striatal destruction in the brain? *Biochemical Society transactions* **48**: 709-717
- Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A (2002) Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Japanese journal of pharmacology* **89**: 36-43
- Taggart AK, Kero J, Gan X, Cai TQ, Cheng K, Ippolito M, Ren N, Kaplan R, Wu K, Wu TJ, Jin L, Liaw C, Chen R, Richman J, Connolly D, Offermanns S, Wright SD, Waters MG (2005) (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *The Journal of biological chemistry* **280**: 26649-26652

Tessitore A, del PMM, Sano R, Ma Y, Mann L, Ingrassia A, Laywell ED, Steindler DA, Hendershot LM, d'Azzo A (2004) GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Molecular cell* **15**: 753-766

Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu DC, Yan SD, Naini A, Vila M, Jackson-Lewis V, Ramasamy R, Przedborski S (2003) D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* **112**: 892-901

Tsunemi T, Ashe TD, Morrison BE, Soriano KR, Au J, Roque RA, Lazarowski ER, Damian VA, Masliah E, La Spada AR (2012) PGC-1alpha rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Science translational medicine* **4**: 142ra197

Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and cellular biology* **20**: 5454-5468

Wang F, Nguyen M, Qin FX, Tong Q (2007) SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging cell* **6**: 505-514

Wang S, Chen Y, Li X, Zhang W, Liu Z, Wu M, Pan Q, Liu H (2020) Emerging role of transcription factor EB in mitochondrial quality control. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **128**: 110272

Williams A, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2006) Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Current topics in developmental biology* **76**: 89-101

Xie Z, Zhang D, Chung D, Tang Z, Huang H, Dai L, Qi S, Li J, Colak G, Chen Y, Xia C, Peng C, Ruan H, Kirkey M, Wang D, Jensen LM, Kwon OK, Lee S, Pletcher SD, Tan M, Lombard DB, White KP, Zhao H, Li J, Roeder RG, Yang X, Zhao Y (2016) Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine beta-Hydroxybutyrylation. *Molecular cell* **62**: 194-206

Xu P, Das M, Reilly J, Davis RJ (2011) JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes & development* **25**: 310-322

Yamamoto T, Byun J, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Sadoshima J (2014) Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion. *PloS one* **9**: e98972

Yamano K, Youle RJ (2013) PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* **9**: 1758-1769

Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 9-14

Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10892-10903

Zhang S, Hama Y, Mizushima N (2021) The evolution of autophagy proteins - diversification in eukaryotes and potential ancestors in prokaryotes. *Journal of cell science* **134**

Zhang XJ, Chen S, Huang KX, Le WD (2013) Why should autophagic flux be assessed? *Acta pharmacologica Sinica* **34**: 595-599

Zhu H, Bi D, Zhang Y, Kong C, Du J, Wu X, Wei Q, Qin H (2022) Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations. *Signal transduction and targeted therapy* **7**: 11