



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Instituto de Fisiología Celular

**EFFECTO DEL B-HIDROXIBUTIRATO EN LA DINÁMICA DE LA
AUTOFAGIA Y LA SOBREVIVENCIA NEURONAL DURANTE LA
HIPOGLUCEMIA SEVERA Y LA INFUSIÓN DE GLUCOSA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

María del Carmen Torres Esquivel

TUTORA PRINCIPAL

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Instituto de Fisiología Celular – División de Neurociencias

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México Abril de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Hay dos maneras de vivir una vida: La primera es pensar que nada es un milagro. La segunda es pensar que todo es un milagro. De lo que estoy seguro es que Dios existe.”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento brindado por PAPIIT-UNAM (IN204919) y CONACyT (A1S-17357). Además de la beca de doctorado del CONACyT (573885).

Agradezco también al Programa de Doctorado en ciencias Biomédicas y al Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en el desarrollo integral de mi formación académica.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y ser mi tutora durante mi doctorado.

Agradezco especialmente a la Bióloga Teresa Montiel Montes, por su colaboración, asesoría técnica y apoyo incondicional durante la realización de mi proyecto.

A los miembros de mi Comité tutorial el Dr. Julio Morán Andrade y al Dr. Mauricio Días Muñoz, por sus observaciones e ideas, indispensables para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia, por su apoyo constante y por la asesoría en las sesiones de microscopía.

A la Dra. Claudia Rivero Cerecedo por su apoyo en el cuidado de los animales en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

A la M. en C. Ana María Escalante y al Ing. Francisco Pérez Eugenio de la Unidad de computo del Instituto de Fisiología Celular de la división de Neurociencias por su apoyo técnico y ayuda en momentos de crisis tecnológica.

A Sara Méndez Ibáñez, por su infinito apoyo en la Coordinación de Enseñanza. Por siempre salvarme y explicarme con una enorme sonrisa cada trámite que realicé.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque desde que me acogió como parte de su familia, no ha dejado de darme satisfacciones, académicas y personales. Gran parte de todo lo que soy es gracias a mi Universidad.

Querida Dra. Massieu, no imagina lo agradecida que estoy con usted por haberme abierto las puertas de la familia del laboratorio AL-302, por desde el primer día recibirme con una sonrisa y convertirse no sólo en una guía si no en un ejemplo de vida, por enseñarme que a pesar de que “la vida del estudiante de doctorado es dura”, está llena de recompensas; por motivar siempre mi curiosidad y por emocionarse en la espera de cada resultado. Usted me enseñó lo apasionante que puede llegar a ser la ciencia. Gracias por compartir conmigo los momentos más felices de mi vida y por apoyarme en los no tan buenos; por su increíble empatía, por su confianza y su inmensurable paciencia. En verdad espero poder seguir en contacto con usted.

Una de las personas más valiosas que conocí en el doctorado fuiste tú Tere Montiel, Cuando te conocí te tenía miedo y pensaba que me odiabas, con el tiempo comprendí que con cada regaño y llamada de atención me ayudabas a ser mejor y evitabas que cometiera más errores pues gracias a cada una de tus observaciones, jalones de oreja y evidentemente a todo tu trabajo y esfuerzo es que juntas pudimos terminar mi proyecto de doctorado. Gracias por convertirte en mi amiga y mi confidente, por tus reconfortantes abrazos, por tus sinceras sonrisas, por alimentarme con tu deliciosa comida y con tus increíbles consejos. Gracias por estar conmigo cuando te pedí ayuda y cuando no lo hacía, por rescatarme de mil formas distintas, por ser más que mi amiga mi guía en la vida. ¡No creas que ya te librate de mí!...

A Cecilia Escalona, por haber mantenido el orden y la limpieza en el laboratorio por tanto tiempo, es verdad eso que dicen que: “nadie sabe lo que tiene hasta que lo ve perdido”, todos te extrañamos muchísimo. Gracias por las charlas matutinas y por las risas que me regalabas, por tu apoyo y por las porras cuando todo parecía salir mal.

A mis tres mosqueteras Selene García de la Cadena, Lucy Camberos y Gabriela Langurén. Grumps (Selene), Soy muy afortunada por haber podido compartir contigo momentos y personas increíbles; agradezco infinitamente tus atinados consejos, tus bromas ácidas pero siempre geniales, tu apoyo incondicional, tus palabras de aliento cuando las necesite, por prestarme a Marux y estar siempre conmigo. Lucila, gracias por abrirme la puerta de tu vida y compartir conmigo más que el departamento y la vida del laboratorio, por ser mi paño de lágrimas y el abrazo que necesite para sentirme más fuerte y creer que si podía, por convertirte en un ejemplo de lucha y esfuerzo, por todos tus consejos y por confiar en mí siempre, incluso cuando yo no lo hacía. Gaby... No tengo palabras para agradecer toooooooooo lo que has hecho por mi desde el momento en que te conocí; decidiste apoyarme sin condiciones, me

conseguiste donde vivir y te encargaste de formar conmigo un hogar, compartimos muchas cosas divertidas (ejercicio doloroso, Yuya, series) y traumas (cuquis y mi ansiedad) y desde entonces no me has abandonado ni dos segundos, tu amistad es invaluable para mí. Escribí esta tesis siempre impulsada y motivada por ti, cuando más triste estuve tú me levantaste y no dejaste que me desvaneciera de nuevo. Te has vuelto fundamental en mi vida, eres un excelente ser humano y una amiga extraordinaria, mi “Gaby Darks Honey”, Gracias infinitas.

A Mara Prior, por tu infinito e incondicional apoyo, por ser la chispa de alegría que inundaba mis días de carcajadas, por aceptarme en tu vida y acogerme en tu casa y en tu lab. Por colorear mis días y convertirnos en partícipes siempre activas de la vida de la otra. Por comprenderme y apoyarme en todas mis facetas y nunca juzgarme, por tu complicidad infinita y ayudarme a crecer, por siempre hacerme saber que me quieres tanto como yo a ti. Gracias por tus consejos y por ser mi compañera de viajes, de alegrías y de infortunios, por tu confianza y por tu maravillosa amistad. Gracias Marita.

A Cristian Gerónimo, el más molón de mis amigos y también el que más me ha enseñado, a quien en un inicio quería golpear y después... también jajaja. Gracias kattan por ser mi mejor amigo en el doc, por aconsejarme en cada aspecto de mi vida y por impulsarme a ser mejor y enseñarme tanto. Por hacerme reír y hasta por hacerme enojar, por tu apoyo constante y por ser mi guía en muchas cosas, por enseñarme lo grandioso que es correr y por hacer divertido y placentero el trabajo del laboratorio. Te amodio Kitty Cat.

A Marck Antony Flowers (Marco Flores, por las dudas), mi increíble e incondicional amigo y maestro. Gracias por enseñarme siempre que el optimismo es la mejor herramienta para sobrevivir en el lab, ese “no pasa nada, se puede solucionar” jaja y esa paciencia con que me explicabas y me volvías a explicar cada cosa, por cada consejo que me diste, por indignarte si me ofendían y por hacerme sentir más segura, por ayudarme muchas veces a sobrevivir ante la pobreza económica y académica. Gracias Marquito de mi vida por seguir conmigo en la distancia y por hacerme saber que siempre estarás para mí como yo estaré siempre para ti.

A Juan Carlos Gómora García, por soportar mis bromas y por reír a mi lado, por siempre estar dispuesto a ayudarme y a explicarme pacientemente cada vez que se me nublaba la mente. Por tu confianza al platicarme tus cosas y por siempre alegrarte conmigo por mis alegrías, porque en esta etapa de mi vida me has apoyado incondicionalmente, por preocuparte por mí, por los detalles bonitos y hasta por siempre oler rico jaja. Mil gracias por tu amistad JC.

A Ashley Salcido, quien me abrió las puertas de aquello que parecía un búnker blindado, “su corazón” y convertirme en mi amiga. Por permitirme conocer algunos de tus secretos y por escucharme, leerme y apoyarme en oscuras facetas de mi vida y

regocijarte en las buenas, por las vacaciones de “soy tu fan” y por la música que compartimos. En verdad, muchas gracias Ash.

Al resto de mis compañeros, Alberto Julio-Amilpas, Susana Flores Yañez, Luis Ángel Montes, Nadia Rivero y Julio Abarca. Por haber compartido vivencias bonitas y divertidas en el lab. Los quiero mucho.

A mi mamá Carmen Esquivel, mi eterno ejemplo y mi apoyo constante. La primera persona en amarme y quien siempre ha creído en mí y me ha impulsado desde siempre a luchar ante todo y a pesar de todo, mi más grande orgullo y mi pilar más fuerte, la fuente de todo mi éxito, Te amo mamita. A mi segunda mamá Esperanza Cárdenas, “mi Cori”, porque sin tu infinito amor y tu increíble sabiduría yo no sería nada. A mis hermanos Rubén, Francisco y Perla Torres Esquivel y a Alejandra Pérez mis motores de vida desde que nacieron, la razón por la que desde chiquita quise ser un buen ejemplo y a quienes espero nunca decepcionar; a mis hermanas del corazón Sofía Pérez y Zaira Hernández, por hacer más bonita y grande mi familia. A mi papá por hacerme sentir su amor y por jamás dudar de mi capacidad.

A mi esposo, Víctor Hugo Salazar Hernández quien llegó a mi vida prácticamente al momento que inicie el Doctorado, puedo decir que el grado lo obtengo con él, pues me acompañó en todo momento y fue testigo de mi crecimiento académico y personal. Gracias amor por siempre respaldarme y ayudarme a crecer, por no dudar ni un instante de mí, por tus consejos, tus porras, tu sabiduría y tu infinito amor. Sin tu apoyo, habría sido muy difícil culminar este proyecto. Gracias por ser uno mismo conmigo, por amarme y hacerme sentir poderosa ante cualquier circunstancia, por creer en mí y por elegirme como compañera de vida y como mamá de nuestro bebé. A mi hij@, quien con su llegada ilumino mi vida entera por convertirme en mi nuevo mayor impulso y en mi más grande amor; tú y tu papá son la mayor bendición que Dios me ha dado.

A mi nueva familia, Juanita Hernández, Tania Salazar y David Pérez, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, por alentarme y cuidarme durante el doctorado. Por apoyarme a terminar este proyecto, mil gracias.

A mis estrellas en el cielo, mis abuelos Rubén Torres y Héctor Esquivel, mi amada tía Josefina Torres y a mi amiga Marisol Solorio porque en este mundo me amaron y siempre creyeron en mí y desde el cielo cuidan y dirigen el andar de mis pasos.

A mis sobrinos, Rubencito, Mía, Maximiliano, Athalia, Carlitos, Alondra, David, Alicia, Santiago, Samantha, Frida, Emi y Arath; por ser mi motivación y la fuente infinita de mis alegrías. Los amo.

En verdad fue difícil esta parte de la tesis pues redactar los “agradecimientos” simboliza el cierre de uno de los capítulos más hermosos y significativos de mi vida.

ÍNDICE

ABSTRACT	10
ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	13
1. Metabolismo energético cerebral	13
1.1. Transportadores de Glucosa	13
1.2. Metabolismo de glucosa en el cerebro	16
1.3. Relación metabólica neurona-astrocito	18
2. Hipoglucemia	22
2.1. Generalidades	22
2.2. Muerte neuronal inducida por hipoglucemia	23
3. Cuerpos cetónicos	28
3.1. Transportadores de monocarboxilatos	31
3.2. Efecto protector de los cuerpos cetónicos	32
4. Autofagia	36
4.1. Descripción de las etapas la autofagia.	37
4.2. Participación de la autofagia en la supervivencia neuronal en respuesta al estrés energético	42
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL.....	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
METODOLOGÍA	45
1. Animales	45
2. Inducción de hipoglucemia severa sin infusión de glucosa (HS).	46
3. Inducción de hipoglucemia severa con infusión de glucosa (HS+IG)	46
4. Inducción de coma hipoglucémico seguido de infusión de glucosa (Coma) 47	
5. Tratamiento con D-BHB	48
6. Determinación de D-BHB en sangre.	50
7. Inmunoblot	50
8. Histología	51
8.1. Tinción con fluoro-jade B y Nissl	52

8.2. Inmunofluorescencia	52
9. Análisis estadístico	53
RESULTADOS	54
1. Concentración de glucosa en sangre y registro encefalográfico	54
2. Dinámica de la autofagia durante la hipoglucemia y la infusión de glucosa en ratas expuestas a hipoglucemia severa en presencia o ausencia de coma. 56	
3. El tratamiento con D-BHB después del coma hipoglucémico estimula el flujo autofágico e incrementa la sobrevivencia celular	59
4. Iniciación de la autofagia después del coma hipoglucémico	67
5. Papel de la activación de mTOR y AMPK en la iniciación de la autofagia después del coma hipoglucémico.	68
6. Efecto de D-BHB sobre la actividad de mTOR y AMPK después del coma hipoglucémico.....	69
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIÓN	79
PERSPECTIVAS	79
REFERENCIAS	80
ANEXO –Artículo Publicado-	91

RESUMEN

El cerebro es un órgano energéticamente muy costoso por lo que depende del suministro continuo de glucosa para su correcto funcionamiento; en condiciones como la isquemia cerebral o la hipoglucemia, el aporte de glucosa se interrumpe induciendo daño cerebral. En estas condiciones limitantes de glucosa, el cerebro puede utilizar sustratos energéticos alternos como los cuerpos cetónicos (CC), acetoacetato (AcAc) y β -hidroxibutirato (BHB) previniendo la muerte neuronal; no obstante los mecanismos implicados en la neuroprotección no se conocen del todo. En respuesta al estrés energético, las células activan mecanismos adaptativos como la autofagia, un proceso de degradación lisosomal que elimina organelos y proteínas dañadas suministrando energía y promoviendo la sobrevivencia celular. No obstante, se ha demostrado que la autofagia excesiva o disfuncional puede contribuir a la muerte neuronal. Previamente demostramos que la autofagia disfuncional participa en la muerte neuronal inducida por la privación de glucosa en neuronas corticales y que D-BHB puede restablecer el flujo autofágico incrementando la viabilidad neuronal. Por lo tanto, nuestro objetivo fue analizar la dinámica de la autofagia en la corteza y el hipocampo de ratas sometidas a distintas condiciones: hipoglucemia severa (HS), hipoglucemia severa seguida de una infusión de glucosa (HS+IG) y un breve período de coma hipoglucémico seguido de IG (Coma). Además evaluamos el efecto de la administración de D-BHB después del coma (Coma+BHB) sobre la autofagia. La transformación de LC3-I en LC3-II y los cambios en la abundancia de las proteínas de autofagia, Beclin 1 (BECN1), ATG7 y el conjugado ATG12-ATG5, se analizaron como índice de formación de autofagosomas, mientras que los cambios en secuestrosoma1/p62 (SQSTM1/p62) fueron determinados como índice de degradación autofágica. Los datos sugieren que los autofagosomas se acumulan en la corteza y el hipocampo de ratas sometidas a 2 h HS, posiblemente a consecuencia de una falla en la degradación autofágica. En la corteza, la acumulación de autofagosomas persistió hasta 6 h después de la IG en animales expuestos a HS, recuperando los niveles basales a las 24 h,

mientras que en el hipocampo no se observaron diferencias significativas. En los animales expuestos a coma la acumulación de autofagosomas se mantuvo hasta 24 h después de la IG en ambas regiones. El tratamiento con D-BHB redujo el contenido de LC3-II y SQSTM1/p62 así como la fosforilación de ULK1 por AMPK, lo que sugiere que actúa a dos niveles, por una parte estimula la degradación del cargo y por otra atenúa la formación de nuevos autofagosomas. Además el D-BHB disminuye el número de células en degeneración. Los resultados sugieren que la autofagia puede activarse de manera diferencial en la corteza y el hipocampo y sigue dinámicas distintas en ratas expuestas a HS o al coma hipoglucémico. Los datos sugieren que el tratamiento con D-BHB puede modular la dinámica de la autofagia favoreciendo el flujo autofágico y restableciendo la autofagia adaptativa.

ABSTRACT

The brain is an organ with high energy demand thereby it depends on a continuous glucose supply for its correct operation. During acute hypoglycemia or cerebral ischemia glucose supply is interrupted, inducing brain damage. Under these glucose-limited conditions, alternative substrates of glucose such as the ketone bodies (KB), acetoacetate (AcAc) and β -hydroxybutyrate (BHB) can be used as energy source in brain preventing neuronal death; however the mechanisms involved in neuroprotection are not fully understood. In response to energy stress conditions, adaptive cell responses can be activated such as autophagy, a lysosomal-dependent degradation process, in which damaged organelles and proteins are eliminated, supplying energy and promoting cell survival. Nevertheless, it has been shown that excessive or impaired autophagy contributes to neuronal death. We have previously shown that dysfunctional autophagy contributes to neuronal death induced by glucose deprivation in cortical neurons and that the D isomer of BHB (D-BHB) restores the autophagic flux increasing neuronal viability. Therefore, we aimed to analyze autophagy dynamics in the cortex and the hippocampus of rats subjected to different conditions: severe hypoglycemia (SH), severe hypoglycemia followed by

glucose infusion (SH+GI) and a brief period of hypoglycemic coma followed by GI (Coma). The effect of D-BHB administration on autophagy dynamics after the hypoglycemic coma was also tested (Coma + BHB). Transformation of LC3-I to LC3-II and the abundance of autophagy proteins, Beclin 1 (BECN1), ATG7, and ATG12-ATG5 conjugate, were analyzed as an index of autophagosome formation, while levels of sequestosome1/p62 (SQSTM1/p62) were determined as an index of autophagic degradation. Data suggest that autophagosomes accumulate in the cortex and hippocampus of rats exposed to SH, probably due to impaired autophagic degradation. In the cortex, autophagosome accumulation persisted at 6 h after GI in animals exposed to SH but recovered basal levels at 24 h. Meanwhile in the hippocampus no significant effect was observed. In animals subjected to coma, autophagosome accumulation was observed at 24 h after GI in both regions. D-BHB treatment reduced LC3-II and SQSTM1/p62 content and reduced ULK1 phosphorylation by AMPK, suggesting that the effect of BHB acts at two levels, on one side it stimulates cargo degradation and on the other it attenuates the formation of new autophagosomes. Furthermore, D-BHB decreased the number of degenerating cells. Results suggest that autophagy could be differentially activated in the cortex and in the hippocampus and follows different dynamics in rats exposed to HS or hypoglycemic coma. The data suggest that D-BHB treatment may modulate autophagy dynamics by improving autophagic flux and restoring adaptive autophagy.

ABREVIATURAS

AcAc: Acetoacetato.

acetil-CoA: acetil coenzima A.

AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase.

ANLS: Lanzadera de lactato astrocito-neurona.

ATG: Autophagy related gene.

ATP: Adenosín Trifosfato.

BECN1/PIK3C3: Complejo beclina1/fosfatidil-inositol-cinasa de clase III.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

CAMKK β : Calcio-calmodulina cinasa β .

CC: Cuerpos Cetónicos.

CMA: Autofagia mediada por chaperonas.

CQ: Cloroquina.

DMT1: Diabetes Mellitus Tipo 1.

EAT: Transportadores de aminoácidos excitadores.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

FADH₂: Flavín Adenín Dinucleótido reducido.

GF: Glucógeno Fosforilasa.

GLAST: Transortador de glutamato y aspartato.

GLT1: Transportador de glutamato 1.

GluRs: Receptores glutamatergicos.

GLUTs: Transportadores específicos de glucosa.

GS: Glucógeno Sintasa.

GTP: Guanosín Trifosfato.

HDACs: Desacetilasas de histonas de clase 1.

HMG-CoA liasa: Hydroxi-metilglutaril-CoA liasa.

HMG-CoA sintasa: Hydroxi-metilglutaril-CoA Sintasa.

HS: Hipoglucemia severa.

IG: Infusión de glucosa.

LC3: Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LIR: Región de reconocimiento a LC3

MCT: Transportadores de monocarboxilatos.

mTORC1: Mammalian Target of Rapamycin complex 1.

NADH: Nicotin Adenin Dinucleótido reducido.

NADPH: Nicotín Adenín Dinucleotido Fosfato reducido.

NOX: NADPH oxidasa.

PARP-1: Poli (ADPribosa)-polimerasa-1.

PE: Fosfatidiletanolamina

PG: Privación de glucosa.

PTM: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SQSTM1/p62: Secuestrosoma-1/p62

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas.

ULK1: Unc-51 like kinase-1.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo energético cerebral

El cerebro es un órgano altamente dinámico y por lo tanto, energéticamente demandante, por lo que depende del aporte continuo del principal sustrato energético celular, la glucosa. El cerebro consume aproximadamente el 25% del aporte total de la glucosa corporal, lo equivalente a aproximadamente 120 g de glucosa (420 kcal de energía) por día para mantener las condiciones fisiológicas normales (Mergenthaler et al., 2013; Nimgampalle et al., 2020)

Se estima que del total de la energía cerebral aproximadamente 75% se requiere para el mantenimiento del potencial de membrana y la señalización intracelular mientras que el 25% restante se utiliza para sostener actividades celulares básicas como síntesis y degradación de proteínas, recambio de fosfolípidos y nucleótidos, transporte axoplásmico y fuga de protones mitocondriales (McKenna et al., 2006).

1.1. Transportadores de Glucosa

La glucosa producida por el hígado es liberada a la circulación sanguínea e ingresa al sistema nervioso central (SNC) a través de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante difusión facilitada, mediada por transportadores de glucosa. Esta barrera funge como filtro selectivo para proteger al cerebro de sustancias tóxicas y controlar el suministro de sustratos metabólicos tales como glucosa, cuerpos cetónicos (CC) y algunos intermediarios metabólicos como el lactato y el piruvato (Simpson et al., 2007; Beltrán et al., 2012).

Debido a que la glucosa no puede atravesar la BHE, requiere de transportadores que permitan su ingreso a las células. Hasta ahora se han identificado 12 transportadores específicos de glucosa (GLUT), que se expresan en diferentes áreas y células del cerebro siguiendo patrones de expresión tejido y célula-específico con excepción del GLUT1, que se expresa

de manera ubicua y representa uno de los dos principales GLUTs del cerebro (Simpson et al., 2007; Koepsell, 2020).

Este transportador, media la captura de glucosa de la periferia al interior del cerebro, por lo que su expresión puede ser modulada transcripcional y postranscripcionalmente por la concentración de glucosa circundante; tiene dos isoformas, ambas derivadas del mismo gen; la isoforma glicosilada de 55 kDa que se localiza en los microvasos cerebrales, plexo coroideo y células endoteliales, lo que representa la primera barrera para el transporte de glucosa circulante hacia el parénquima cerebral. La otra isoforma, la de 45 kDa de GLUT1 se localiza predominantemente en astrocitos que circundan a las neuronas y a la microglía. A diferencia de GLUT1, GLUT3 tiene una capacidad de transporte de glucosa cinco veces mayor, es el transportador de glucosa más abundante en el cerebro y se localiza principalmente en neuronas por lo que es responsable de facilitar el transporte de glucosa específicamente a este tipo celular. Se expresa ampliamente en las diferentes poblaciones neuronales con una distribución celular predominantemente en el neuropilo. GLUT4 y GLUT8 representan otros dos transportadores neuronales de glucosa cuyo patrón de expresión, en contraste con GLUT3, está restringido a una subpoblación específica de neuronas, y han sido detectados en poblaciones neuronales del hipocampo, el cerebelo y el bulbo olfatorio. Específicamente la actividad de GLUT4 esta mediada por la concentración de insulina en la sangre, por lo que es indispensable para el ingreso de glucosa en tejidos periféricos como el miocardio, el musculo esquelético y el tejido adiposo (Vannucci et al., 1997; Koehler-Stec et al., 2000; Mergenthaler et al., 2013; Magistretti and Allaman, 2015; 2018; Koepsell, 2020; Nimgampalle et al., 2020).

Otro transportador de glucosa detectado en el sistema nervioso central es GLUT2, que se localiza en neuronas y astrocitos de regiones cerebrales que participan en la regulación de la ingesta de alimentos y el mantenimiento de la homeostasis de glucosa como en el núcleo del tracto solitario, en pocas células hipotalámicas, en neuronas secretoras del neuropéptido Y así como neuronas

pro-opiomelanocortina positivas de la vía de la melanocortina. Considerando su papel de "sensor de glucosa" en la periferia como control central de liberación de insulina, las células que expresan GLUT2 tienen un papel importante al mediar la respuesta contrarreguladora ante el déficit de glucosa (Marty et al., 2007; Magistretti and Allaman, 2015).

GLUT5 es otra proteína transportadora de glucosa localizada en el cerebro que se encuentra en las células microgliales, los macrófagos residentes del cerebro, por lo que participan en las respuestas inmunes e inflamatorias del sistema nervioso. Cabe destacar que considerando sus diferentes afinidades por sustratos y su papel en los tejidos periféricos, el GLUT5 puede funcionar como un mejor transportador de fructosa que de glucosa (Figura 1) (Magistretti and Allaman, 2018).

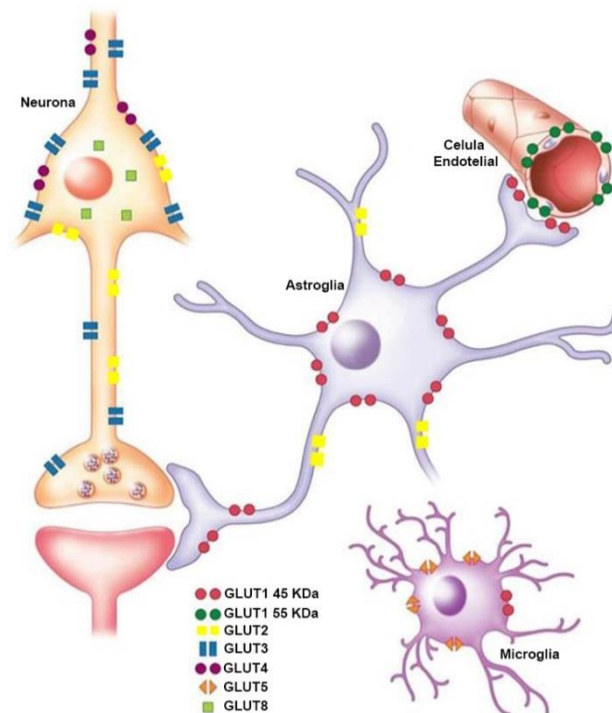


Figura 1. Distribución celular de los principales transportadores de glucosa en el SNC. Tomado de Magistretti and Allaman 2018.

1.2. Metabolismo de glucosa en el cerebro

En el cerebro, la glucosa provee de energía a través de la generación de adenosín trifosfato (ATP), útil para funciones fisiológicas y no fisiológicas en las células que componen al SNC; además proporciona precursores para la síntesis de neurotransmisores y neuromoduladores, participa en el mantenimiento de gradientes de concentración iónica transmembranal, en la plasticidad neuronal, defensa antioxidante y en la función cognitiva que incluye aprendizaje y memoria (Nimgampalle et al., 2020).

La primera vía de obtención de energía a partir de este sustrato es la glucólisis, en la cual la glucosa es fosforilada por la hexocinasa produciendo glucosa 6 fosfato, esta es la primera de una serie de reacciones enzimáticas en la cual una molécula de glucosa es convertida en 2 moléculas de piruvato y produce ATP y nicotín adenín dinucleótido reducido (NADH). A partir del piruvato los procesos ulteriores dependen de ciertas condiciones metabólicas. En condiciones anaeróbicas, el producto final es el ácido láctico y el rendimiento energético resulta ser mucho menor (2 ATP) que en condiciones aeróbicas, en las cuales el piruvato ingresa a la mitocondria para ser descarboxilado oxidativamente y generar acetil coenzima A (acetil-CoA) en una reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA es el alimento del ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés de *Tricarboxylic acid cycle*). El tiolester de esta molécula, es un enlace rico en energía, lo cual resulta de importancia en la primera reacción del ciclo, pero además este metabolito garantiza la actividad del TCA porque mantiene los niveles de los metabolitos a concentraciones adecuadas. La acetil-CoA se condensa con oxaloacetato para producir citrato, iniciando una serie de reacciones catalizadas por diversas enzimas hasta volver a producir oxaloacetato. En cada vuelta del ciclo se produce la entrada de un grupo acetilo en forma de acetil-CoA y la salida de dos moléculas de CO₂. Además, cuatro de las ocho reacciones de este proceso son de óxido-reducción en las que la energía de oxidación se conserva, con elevada eficiencia, produciendo 4 cofactores reducidos, 3 NADH y 1 flavín adenín dinucleótido reducido (FADH₂),

sustratos de la cadena respiratoria en la cual se forma ATP mitocondrial. Así mismo, en otra de estas reacciones se produce directamente un guanosín trifosfato (GTP), equivalente a un ATP por fosforilación a nivel de sustrato. De esta manera bajo condiciones aeróbicas una molécula de glucosa produce un total de 36 moléculas de ATP (Cardellá and Hernández, 2002; Nelson et al., 2008).

La glucosa también puede oxidarse mediante una vía alterna, la vía de las pentosas fosfato, que constituye una vía de oxidación directa de este sustrato energético, mediante la cual se generan monosacáridos de 5 carbonos para la síntesis de ácidos nucleicos y la producción de equivalentes reductores de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Este último, además de ser un intermediario redox para la biosíntesis de ácidos nucleicos y coenzimas, también es sustrato de la glutatión reductasa, enzima que genera glutatión reducido a partir del glutatión oxidado, que a su vez es producto de una serie de reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa (Beltrán et al., 2012).

Por otro lado, la glucosa se puede almacenar en forma de glucógeno en el cerebro, el cual se sintetiza a partir de glucosa-6-fosfato por efecto de la glucógeno sintasa (GS) únicamente en astrocitos maduros, puesto que en las neuronas, esta enzima se encuentra altamente fosforilada y por lo tanto en estado inactivo; en este sentido por lo general en las neuronas la GS es degradada vía proteasomal por el complejo laforina-malina (Solaz-Fuster et al., 2008). La hidrólisis de esta reserva energética (glucogenólisis) en los astrocitos depende de la glucógeno fosforilasa (GF), produciendo glucosa-6-fosfato (Figura 2), la cual puede emplearse para la generación de sustratos metabólicos diferentes a glucosa como el ácido láctico, que se pueden exportar de los astrocitos a las neuronas cuando éstas incrementan sus requerimientos de energía o durante escasa disponibilidad de glucosa. También se ha propuesto que la rápida movilización de glucógeno en los astrocitos incrementa de manera importante la concentración de glucosa-6-fosfato lo que inhibe a la

hexocinasa y por tanto disminuye la captura de glucosa en éstas células, aumentando la disponibilidad de glucosa para el consumo neuronal (DiNuzzo et al., 2011).

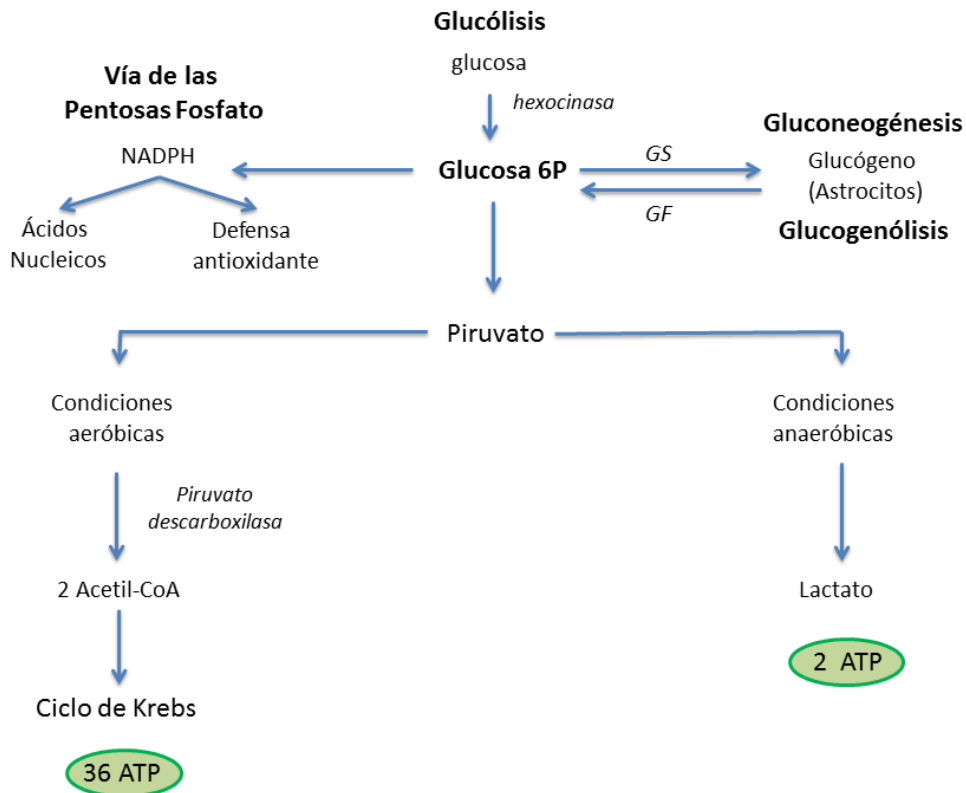


Figura 2. Rutas metabólicas de la glucosa para la generación de energía.

1.3. Relación metabólica neurona-astrocito

Los astrocitos son células indispensables en el SNC, pues participan en diversas funciones del SNC, tales como neurotransmisión, homeostasis de metabolitos y electrolitos, señalización celular, inflamación, defensa antioxidante, regulación del flujo sanguíneo cerebral y la modulación sináptica. Además, se ha demostrado que mantienen una estrecha relación con las neuronas a través de sistemas denominados “neurogliales”, que se encargan de mantener la homeostasis celular, en este sentido, se sabe que los astrocitos expresan enzimas clave de varias vías metabólicas que no se expresan en neuronas y son capaces de producir a partir de precursores exógenos,

metabolitos intermedios necesarios para el metabolismo energético de las neuronas (Ricci et al., 2009; Guillamón-Vivancos et al., 2015; Siracusa et al., 2019).

Toda la superficie externa de los capilares cerebrales está cubierta por pericitos y por pies terminales astrocíticos; se ha reportado que aproximadamente el 96% de las células endoteliales se encuentran cubiertas por éstos últimos (Nehlig, 2004; Amaral, 2013). De este modo los astrocitos cuentan con la posición ideal para censar la actividad sináptica y acoplarla con la distribución de sustratos energéticos, es decir, son capaces de censar el microambiente metabólico cerebral y responder adecuadamente a la demanda energética (Belanger et al., 2011; Magistretti and Allaman, 2015).

En 1994 el grupo de Pellerin y Magistretti, describió la lanzadera de lactato astrocito-neurona (ANLS, por sus siglas en inglés de *astrocyte-neuron lactate shuttle*), un mecanismo que explica el acoplamiento entre la actividad sináptica y el suministro energético, en esencia, el modelo postula que el glutamato extracelular liberado durante la actividad neuronal, estimula la captura de glucosa y la producción de lactato en astrocitos (Pellerin and Magistretti, 1994). El lactato se libera de los astrocitos y las neuronas circundantes lo capturan inmediatamente para impulsar la actividad dependiente del metabolismo oxidativo (Kasischke, 2009).

El glutamato es cotransportado al interior de los astrocitos con 3 iones de Na^+ ; al alterar el gradiente de Na^+ , se activa la ATPasa de Na^+/K^+ y se consume una molécula de ATP. El glutamato se transforma en glutamina por efecto de la glutamina-sintasa y se utiliza otro ATP, la glutamina se libera de los astrocitos y es capturada por las neuronas, donde la glutaminasa lo transforman nuevamente en glutamato; este ciclo denominado “ciclo glutamina-glutamato” permite que una gran cantidad de glutamato pueda reciclarse en las terminales sinápticas renovando la reserva vesicular de glutamato, mientras que el glutamato restante se transforma en α -cetoglutarato mediante reacciones de transaminación o por efecto de la glutamato deshidrogenasa e

ingresa al TCA en los astrocitos. La disminución en el contenido de ATP, promueve la captura y el metabolismo de glucosa al desinhibir las enzimas clave de la glucólisis, como la hexocinasa y la fosfofructocinasa. Por otro lado, la glucosa captada es procesada glucolíticamente en los astrocitos para producir lactato, el cual se libera a través de transportadores de monocarboxilatos específicos (MCT, por sus siglas en inglés de *Monocarboxylate transporters*) MCT1 y MCT4 al espacio extracelular y posteriormente es capturado por los MCT2 en las neuronas, en donde, tras convertirse en piruvato se metaboliza oxidativamente en las mitocondrias para producir alrededor de 17 ATP por molécula de lactato (Fig. 3) (Peng et al., 1991; Magistretti and Pellerin, 1999; Magistretti and Allaman, 2015).

El flujo de lactato es posible por la expresión diferencial de las isoformas de MCT y lactato deshidrogenasa (LDH) entre las células neuronales y astrogiales, específicamente por la LDH5 (expresada principalmente en astrocitos) que tiene mayor afinidad por el piruvato y genera lactato, el cual, como habíamos mencionado antes, se transporta a las neuronas a través de los MCT. En las neuronas se oxida por la LDH1 (expresado principalmente en mitocondrias de neuronas), que tiene mayor afinidad por el lactato obteniendo piruvato que ingresa al TCA proveyendo de energía necesaria para la actividad neuronal. En esencia, el modelo de la ANLS postula que las neuronas son predominantemente oxidativas y los astrocitos glucolíticos. Además este modelo proporciona un posible mecanismo que explica el acoplamiento del metabolismo glutamatérgico con el consumo de glucosa en el SNC (Beltrán et al., 2012; Nimgampalle et al., 2020).

Debido a que las neuronas tienen mayores requerimientos energéticos, mantienen una alta tasa de metabolismo oxidativo en comparación con las células gliales. Existe evidencia que postula que las neuronas pueden usar de manera eficiente lactato como sustrato energético e incluso preferir su uso sobre la glucosa cuando ambos sustratos están presentes; a este respecto, se ha reportado que la enzima 6-fosfofructosa-2-cinasa/fructosa-2,6 bisfosfatasa-

3, está prácticamente ausente en las neuronas debido a su degradación proteosomal, lo que contrasta con los altos niveles de expresión en astrocitos. Esta enzima es responsable de la generación de fructosa-2,6-bisfosfato, un potente activador de la fosfofructocinasa-1. Como resultado de una baja producción de fructosa-2,6 bifosfato, las neuronas muestran una tasa glucolítica más lenta en comparación con los astrocitos (Cardellá and Hernández, 2002; Belanger et al., 2011).

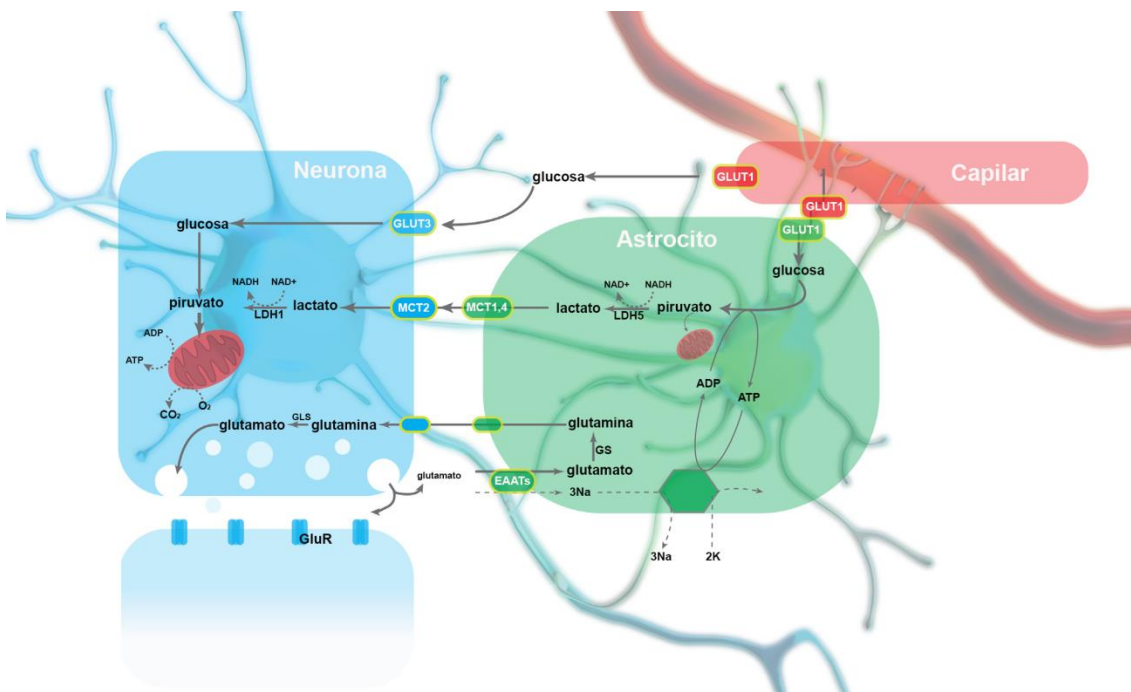


Figura 3. Representación de la lanzadera de lactato astrocito-neurona. El glutamato liberado durante la actividad sináptica, activa a los receptores glutamatergicos (GluRs). Una proporción importante de este glutamato es captado por los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT); específicamente GLT1 y GLAST, utilizando el gradiente electroquímico del Na^+ como fuerza impulsora, promoviendo la activación de la Na^+/K^+ ATPasa, un proceso que consume ATP. Tras haber sido capturado, el glutamato se transforma en glutamina por efecto de la glutamina sintasa, consumiendo de nuevo ATP, y se transporta a las neuronas, donde las glutaminasas lo convierten nuevamente en glutamato. La carga metabólica creada por la captura de glutamato induce la utilización de glucosa no oxidativa en los astrocitos y la captura de glucosa proveniente del torrente sanguíneo por el GLUT1. El piruvato derivado glicolíticamente se convierte en lactato mediante la LDH5 y se transporta a las neuronas a través de los MCT. En las neuronas, el lactato se puede utilizar como sustrato energético tras su conversión en piruvato por LDH1. Tomado de Magistretti y Allaman 2015.

2. Hipoglucemia

2.1. Generalidades

Bajo circunstancias normales, la concentración plasmática de glucosa se mantiene dentro de un rango fisiológico (70-110mg/dl), el cual resulta de un estricto balance entre la glucosa endógena y exógena; cuando este equilibrio se rompe y los niveles de glucosa se hallan por debajo de 70mg/dl se produce una condición fisiológica conocida como hipoglucemia. Generalmente la hipoglucemia es un estado transitorio, aunque puede presentarse de forma crónica a consecuencia de diversos factores como trastornos hormonales, alteraciones en la hormona de crecimiento, presencia de insulinomas, insuficiencia adrenal, alcoholismo, entre otros (Bansal and Weinstock, 2000). No obstante, esta condición es considerada como la principal complicación del tratamiento con insulina, pues afecta aproximadamente al 40% de los pacientes insulino-dependientes (Bree et al., 2009), quienes sufren en promedio 2 episodios de hipoglucemia moderada (40-60 mg/dl) por semana y un episodio de hipoglucemia severa (HS) (<35 mg/dl) al año. De esta manera, cerca del 2 al 4% de los pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) mueren a causa de la hipoglucemia (Cryer, 2007; Cryer et al., 2009).

Los niveles de glucemia se encuentran altamente controlados por sistemas de regulación endocrina, conocidos como “respuesta contrareguladora de la hipoglucemia” que inducen una serie de respuestas fisiológicas y conductuales, que ayudan a prevenir o corregir la hipoglucemia. La primera respuesta es la supresión de la secreción de insulina en las células β pancreáticas, que ocurre cuando los niveles de glucosa se hallan por debajo de rango de 81 mg/dl, favoreciendo el aumento de la producción de glucosa y limitando su utilización periférica. Si la concentración de glucosa es inferior a 68 mg/dl, se estimula la secreción de glucagón y epinefrina lo que induce la glucogenólisis (degradación de glucógeno a glucosa) y la gluconeogénesis (producción de glucosa a partir de piruvato y otros sustratos). Si estas respuestas de defensa fallan al prevenir la hipoglucemia y los niveles de glucosa disminuyen aún más, dan lugar a una respuesta simpatoadrenal más intensa originando síntomas neurogénicos

(sudoración, mareo, náusea, temblor, ansiedad, irritabilidad, palpitaciones, hambre, etc.) provocados por la liberación de noradrenalina y adrenalina y cuyo objetivo es promover la ingesta de alimento y revertir el estado hipoglucémico. Si tras la aparición de estos síntomas no hay corrección en los niveles de glucosa aparecen síntomas neuroglucopénicos (debilidad, visión borrosa, confusión, dificultad para hablar, somnolencia, etc.), resultado de la ausencia de glucosa en el cerebro. Si pese a todas estas señales fisiológicas y conductuales, los niveles de glucosa no se restablecen, pueden presentarse alteraciones cognitivas, conductas erráticas, convulsiones e incluso un estado de coma, este último es un caso extremo que sucede cuando los niveles de glucosa se encuentran por debajo de 41 mg/dl (Cryer, 2005; 2007; Sprague and Arbelaez, 2011; Languren et al., 2013). El estado de coma caracterizado por el cese de la actividad eléctrica cerebral (periodo isoelectrico), puede ocasionar daños neurológicos permanentes dependiendo de su duración en áreas vulnerables del cerebro, entre las que se incluyen la corteza y el hipocampo; incluso derivando en la muerte del paciente (Auer et al., 1984).

2.2. Muerte neuronal inducida por hipoglucemia

a) Excitotoxicidad

Diversos estudios señalan que para que ocurra muerte neuronal se requieren niveles de glucemia inferiores a 18 mg/dl y de la presencia de un evento de coma prolongado (30 minutos o más) (Auer, 2004). No obstante, aunque los mecanismos que dirigen la muerte neuronal inducida por la HS no han sido completamente dilucidados, diversos estudios señalan que es el resultado de una secuencia de eventos desencadenados por un mecanismo excitotóxico inducido por un aumento en la liberación de glutamato y aspartato al espacio extracelular. Este incremento se debe a que durante la HS la disponibilidad de glucosa es limitada por lo que disminuye la producción de piruvato y por ende de acetil-CoA para suplementar al ciclo de Krebs, de manera que como mecanismo compensatorio el tejido cerebral es capaz de mantener una capacidad limitada de fosforilación oxidativa mediante la

producción de compuestos reductores (NADH y FADH₂) al metabolizar el glutamato (y la glutamina), el cual dona su grupo amino al oxaloacetato produciendo α cetoglutarato y aspartato (Figura 4), el primer compuesto cumple la función de sustrato anaplerótico que permite el funcionamiento parcial del ciclo de Krebs mientras que el segundo es un neurotransmisor excitador que estimula los receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Auer, 2004; Sutherland et al., 2008). Aunado a esto, la falla energética impide el funcionamiento de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, incrementando la concentración de Na⁺ intracelular e induciendo la despolarización neuronal que conduce a la liberación de glutamato y aspartato que se suma al aspartato generado por la modificación metabólica del ciclo de Krebs (Ciclo de Krebs truncado). Así mismo, la disipación del gradiente de Na⁺ promueve el funcionamiento inverso de los EAAT, por lo que hay mayor acumulación de glutamato en el espacio sináptico. Todos estos procesos contribuyen a la generación de excitotoxicidad (Sandberg et al., 1986; Ogata et al., 1995). De este modo, Wieloch y colaboradores en 1985, mostraron que la administración de antagonistas de los receptores NMDA antes del coma hipoglucémico reduce la muerte neuronal en un 90%. Este mismo grupo demostró también que la muerte neuronal en el estriado inducida por HS, puede prevenirse al eliminar las terminales glutamatérgicas cortico-estriatales (Wieloch et al., 1985). Finalmente, cultivos corticales e hipocampales tratados con un inhibidor de los receptores NMDA (MK-801), disminuye la liberación de glutamato y previene la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa. (Paramo et al., 2010). Estos estudios demuestran la participación de un mecanismo excitotóxico en la muerte neuronal inducida por la falla energética.

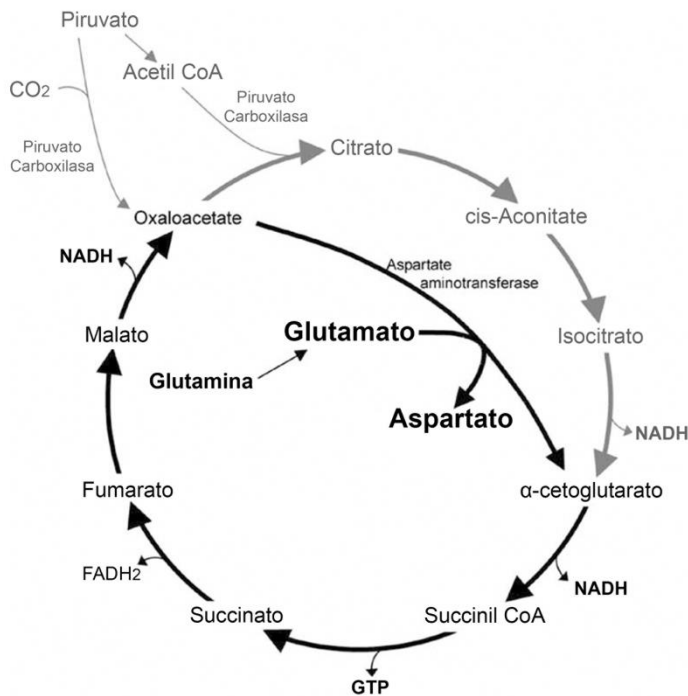


Figura 4. Adaptación del ciclo de Krebs durante la hipoglucemia. Las flechas en color gris indican las etapas del ciclo de Krebs que se interrumpen durante la hipoglucemia; mientras que las líneas negras señalan las modificaciones producidas en el ciclo de Krebs. Adaptado de Sutherland et al., 2008

b) Desregulación del calcio intracelular

Una de las principales consecuencias de la excitotoxicidad es la entrada masiva de calcio (Ca^{++}) al espacio intracelular, que se incrementa de forma progresiva durante el coma hipoglucémico, como consecuencia de la sobre activación de los receptores NMDA. Este aumento activa distintas enzimas dependientes de Ca^{++} que contribuyen a la muerte neuronal. En este sentido, la ausencia de calcio extracelular o el tratamiento con BAPTA-AM, un quelante de calcio intracelular, previene la muerte neuronal en cultivos de neuronas hipocampales expuestos a ausencia de glucosa o a la inhibición de la glucólisis, a través de mecanismos que involucran la inactivación de enzimas pro-oxidantes dependientes de calcio como la xantina oxidasa, la Fosfolipasa A2 y la NADPH oxidasa (NOX) (Hernandez-Fonseca and Massieu, 2005; Hernandez-Fonseca et al., 2008; Paramo et al., 2010). Así mismo, el incremento en la concentración de Ca^{++} y el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por estos sistemas enzimáticos durante la ausencia de glucosa promueven a la activación excesiva de calpaína, una

cisteín-proteasa dependiente de calcio implicada en la muerte neuronal excitotóxica (Paramo et al., 2013). Finalmente, en un modelo *in vivo* de hipoglucemia severa se observó que el tratamiento con verapamil, un bloqueador de los canales de calcio tipo L, disminuye el daño neuronal inducido por HS en aproximadamente 90% y previene el daño cognitivo (Jackson et al., 2018).

Otro mecanismo asociado a la muerte neuronal por HS es el estrés reticular, generado por la pérdida de la homeostasis de calcio intracelular, la producción de ERO y la disminución en la glicosilación de proteínas como consecuencia de la deficiencia energética que promueven la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico y la subsecuente activación de la respuesta a proteínas mal o no plegadas (UPR, por sus siglas en inglés de *Unfolded protein response*), que podría dirigir hacia la apoptosis celular (Malhotra and Kaufman, 2007). Diversos estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia cerebral (otro estado patológico, cuyo daño está asociado a la falta de suministro de glucosa sanguínea cerebral), han demostrado el aumento de marcadores de estrés reticular y de la actividad de la caspasa 12, caspasa residente del retículo endoplásmico que participa en la apoptosis inducida por estrés reticular (Mouw et al., 2003; Sun et al., 2016b). La participación del estrés reticular en modelos *in vivo* de hipoglucemia no ha sido explorada aun, no obstante, estudios previos de nuestro grupo realizados en cultivos hipocampales sometidos a ausencia de glucosa muestran que la muerte apoptótica inducida por el déficit energético es resultado de la activación del estrés reticular y de la caspasa 12 (García de la Cadena and Massieu, 2016).

c) Daño mitocondrial y estrés oxidativo

Por otro lado, el aumento de Ca^{++} es amortiguado por la mitocondria, en donde el influjo excesivo de este ión interrumpe la síntesis de ATP promoviendo la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTM), provocando la salida del citocromo C y del factor inductor de apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés de *Apoptosis-Inducing factor*) que conducen a la

muerte celular. El citocromo C forma parte de un complejo denominado apoptosoma, que en conjunto con la caspasa 9 activan a la caspasa 3, que es efectora de muerte apoptótica (Ferrand-Drake et al., 1999; Ferrand-Drake et al., 2003). Asimismo se ha reportado que durante la hipoglucemia disminuye la respuesta antioxidante y la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones, en especial el complejo I y IV promoviendo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial e incrementando la liberación de ERO, lo que favorece la aparición de estrés oxidativo (Bhardwaj et al., 1998; Ballesteros et al., 2003).

Diversos estudios demuestran que el estrés oxidante inducido durante la hipoglucemia induce daño en macromoléculas esenciales para la viabilidad celular como lípidos de membrana, ADN y proteínas. En este sentido, Patockova y colaboradores en 2003 observaron un aumento en la producción cerebral de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la lipoperoxidación de lípidos, después de un evento de HS. Más tarde, en 2010 se observó la presencia de daño oxidativo en lípidos en las regiones cerebrales vulnerables al daño hipoglucémico antes del inicio del periodo isoelectrico, así como un incremento en las proteínas nitrosiladas luego de la reintroducción de glucosa en las mismas regiones. (Haces et al., 2010). El aumento en la producción de ERO sobre activa a la poli (ADPribosa)-polimerasa-1 (PARP-1), una enzima que normalmente ayuda a amortiguar el daño celular al reparar del ADN, pero su sobre activación conduce a la muerte celular. A este respecto Suh y colaboradores en el 2003 mostraron que la administración de inhibidores de esta enzima durante la infusión de glucosa, disminuye considerablemente la muerte neuronal. La actividad de la PARP-1 consume el NAD^+ citosólico que es necesario para la glucólisis, de manera que la activación de esta enzima por la hipoglucemia severa hace a las células incapaces de metabolizar glucosa aun cuando la disponibilidad de este carbohidrato se restaura. En 2007, el mismo grupo probó que también durante la infusión de glucosa se libera óxido nítrico lo cual estimula la liberación de zinc de las terminales nerviosas y a su vez promueve la activación de la PARP-1 y de la NOX, esta última participa en la

generación de ERO (principalmente del anión superóxido) durante la reintroducción de glucosa. Además de que el exceso de glucosa durante la RG promueve su metabolismo por el ciclo de las pentosas favoreciendo la generación de NADPH que activa a la NOX y aumenta la generación de ERO (Suh et al., 2003; Suh et al., 2007b; Suh et al., 2007c; Suh et al., 2008). En conjunto, los datos anteriormente descritos indican que la muerte neuronal inducida por la HS es de origen multifactorial, dichos factores acontecen en etapas tempranas, durante el periodo isoeléctrico y durante la fase de RG (Languren et al., 2013).

3. Cuerpos cetónicos

Como se mencionó previamente, el cerebro es capaz de metabolizar sustratos energéticos distintos a la glucosa, como piruvato (Suh et al., 2005), glutamato, glutamina, aspartato (Rao et al., 2010; Amaral et al., 2011), glucógeno (Suh et al., 2007a) y CC; todos ellos pueden ser metabolizados por las neuronas cuando el metabolismo de glucosa se encuentra alterado, contribuyendo a prolongar la función neuronal y retrasar el agotamiento de ATP durante la hipoglucemia (Amaral, 2013). Así mismo, en condiciones de ausencia de nutrientes, el cerebro tiene la capacidad de adaptarse al uso de CC como principal fuente de energía, se ha reportado que son capaces de aportar más del 60% de la energía cerebral de acuerdo a su concentración en plasma (White and Venkatesh, 2011; Hashim and Vanitallie, 2014). Además, se les ha atribuido la capacidad de ahorrar glucosa, puesto que inhiben el complejo de la piruvato-deshidrogenasa, evitando la glucólisis y manteniendo cierta cantidad de glucosa disponible en el SNC durante el ayuno prolongado, reservándola para la producción de ATP glucolítico o bien para las vías biosintéticas que requieren glucosa; incluyendo la propia oxidación de los CC, ya que cierta cantidad de glucosa es esencial para impulsar el TCA, que provee de la succinil-CoA requerida en la cetólisis (Amaral, 2013).

La tasa del metabolismo cerebral de los CC depende principalmente de la concentración de éstos en la sangre, normalmente, la concentración plasmática

de CC en humanos y en ratas es cerca de 0.1mM, pero puede incrementar fácilmente en respuesta a ciertas alteraciones del estado fisiológico. La tabla 1 muestra el rango de concentración de los CC en sangre de humanos y ratas bajo distintas condiciones (Robinson and Williamson, 1980).

SITUACION	Concentración de CC (mM)	
	HUMANO	RATA
Con alimento	±0.1	> 0.3
Ayuno de 12 a 24 h	>0.3	1-2
Ayuno de 48 a 72 h	2-3	2
Post ejercicio	>2	>2
Neonatal	0.5-1	0.5-1.5
Hipoglucemia	1-5	
Diabetes sin tratamiento	>25	>10

Tabla 1. Concentración sanguínea de CC totales (AcAc+BHB) en rata y en humano en respuesta a distintas alteraciones del estado fisiológico. Modificado de Robinson y Williamson, 1980.

Cuando los niveles de glucosa disminuyen en sangre, por ejemplo, durante el ayuno prolongado o durante el ejercicio intenso, comienzan a utilizarse las reservas hepáticas de glucógeno, cuando estas reservas se agotan, el organismo comienza a sintetizar glucosa a partir de fuentes alternativas a carbohidratos como lactato, piruvato y ciertos aminoácidos. Se liberan a la circulación triglicéridos del tejido adiposo en forma de ácidos grasos y glicerol, éste último se utiliza como sustrato de la glucólisis y los ácidos grasos se oxidan en el hígado elevando la concentración de acetil-CoA y NADH; si la glucosa sanguínea no se normaliza y las reservas lipídicas continúan utilizándose, eventualmente el incremento en los niveles de NADH inhibe alostéricamente al ciclo de Krebs, y en consecuencia la acumulación de acetil-CoA promueve la generación de CC (Melø et al., 2006; Nelson et al., 2008).

El paso inicial de la cetogénesis es la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA a través de la enzima β -cetotiolasa. Posteriormente, la Hidroxi-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa), integra un grupo acetilo proveniente de una tercera molécula de acetil-CoA para formar β -Hidroxi-metilglutaril-CoA. La enzima Hidroxi-metilglutaril-CoA liasa (HMG-CoA liasa) remueve una acetil-CoA de esta molécula para formar acetoacetato (AcAc), el cual puede tomar dos rutas, por un lado puede descarboxilarse espontáneamente produciendo CO_2 y acetona, otro cuerpo cetónico que al ser un compuesto volátil se elimina vía respiratoria y es incapaz e incorporarse al metabolismo; el camino alternativo del AcAc es la formación de BHB, que es el cuerpo cetónico más abundante en la circulación. Esta reacción es regulada por la β -hidroxibutirato deshidrogenasa y es reversible de acuerdo al estado del equilibrio redox ya que requiere de un hidrógeno proveniente del recambio de NAD^+/NADH . Como las células hepáticas no son capaces de metabolizar los CC debido a que carecen de una enzima determinante para el proceso de cetólisis (β -cetoacil-CoA-transferasa), se liberan al torrente sanguíneo y son transportados al sistema nervioso por los transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 y MCT4, localizados en las células endoteliales, las neuronas y las células gliales respectivamente. El uso de los CC en el cerebro requiere que tanto el BHB como el AcAc se oxiden como sustrato alternativo de glucosa produciendo acetil-CoA. De este modo la β -hidroxibutirato deshidrogenasa transforma el BHB en AcAc, este último se transforma nuevamente en Acetoacetil-CoA por efecto de la β -cetoacil-CoA-transferasa y finalmente en un proceso catalizado por la β -cetotiolasa se convierte en acetil CoA, que entra al TCA para la generación de energía y metabolitos (Figura 5) (Melø et al., 2006; Camberos-Luna and Massieu, 2020). Por otro lado, aunque generalmente se asume que el hígado provee de CC al cerebro, se ha demostrado que los astrocitos también son capaces de sintetizar CC a partir de ácidos grasos y de leucina (Guzman and Blazquez, 2004; Takahashi et al., 2014).

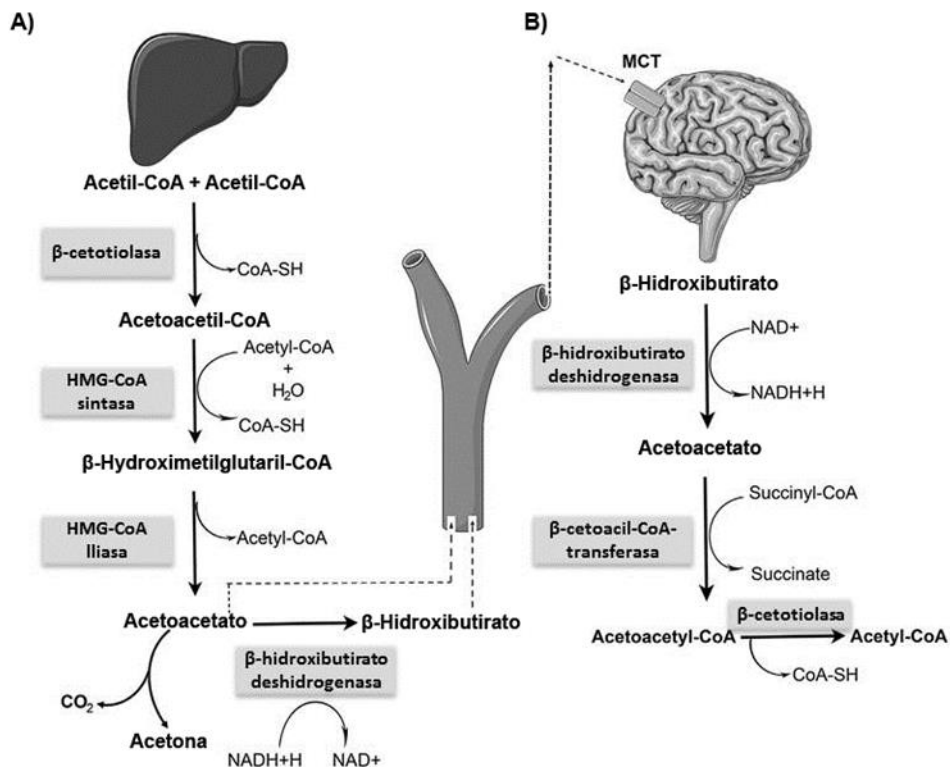


Figura 5. Metabolismo de Cuerpos Cetónicos. **A)** Cetogénesis, formación de CC a partir de acetil-CoA en el hígado y **B)** Cetólisis, Producción de acetil-CoA a partir de CC en el cerebro (también puede ocurrir en otros tejidos extra hepáticos como músculo esquelético y cardíaco). Tomado de Camberos y Massieu 2020.

3.1. Transportadores de monocarboxilatos

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo cerebral de los CC depende principalmente de su concentración en sangre así como de la permeabilidad de la BHE, que a su vez depende de la abundancia de transportadores de monocarboxilatos (MCT) y no del aumento de la actividad neuronal como en el caso del metabolismo de glucosa (Morris, 2005). De esta manera, existen estudios que demuestran que la expresión de los MCT y por tanto la permeabilidad de los CC incrementa durante el periodo de lactancia, (Pellerin et al., 1998; Leino et al., 1999), el ejercicio prolongado (Takimoto et al., 2013) y en condiciones patológicas como hipoxia (Gao et al., 2014; Miranda-Goncalves et al., 2016) isquemia (Tseng et al., 2003; Moreira et al., 2009; Hong et al., 2015) e hiperglucemia (Canis et al., 2009).

Pese a que hasta hora se han identificado 14 miembros pertenecientes a la familia de los MCT, solo los transportadores de monocarboxilatos del 1 al 4 son capaces de co-transportar CC y protones al interior de la célula mediante un mecanismo de simporte con una estequiometría equimolar 1:1. (Pierre and Pellerin, 2005; Simpson et al., 2007). El MCT1 se encuentra predominantemente en las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos cerebrales y en los astrocitos, mientras que en neuronas su expresión es muy limitada; no obstante, durante el desarrollo este transportador se encuentra ampliamente distribuido en todos los tipos celulares coincidiendo con el periodo de lactancia en roedores y disminuye su expresión con la madurez; por lo que se piensa que favorece la captura de CC en el SNC principalmente durante esta etapa del desarrollo (Vannucci and Simpson, 2003).

MCT2 constituye el principal MCT neuronal, se expresa ampliamente en dendritas y se asocia con densidades post sinápticas; se localiza preferentemente en neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo y del cerebelo (Simpson et al., 2007). Así mismo, existen reportes que señalan su presencia en los pies terminales de los astrocitos (Gerhart et al., 1998).

La expresión del transportador MCT3 se encuentra limitada al plexo coroideo y al epitelio retinal pigmentado y finalmente el MCT4, que se expresa exclusivamente en astrocitos y es considerado el principal transportador de lactato; posee una baja afinidad para piruvato, previniendo así la pérdida de este monocarboxilato de la célula para incrementar la tasa de glucólisis y el ATP citosólico (Pierre and Pellerin, 2005).

3.2. Efecto protector de los cuerpos cetónicos

Desde la antigüedad, el ayuno se ha empleado con fines de desarrollo espiritual, para mejorar la calidad de vida y como tratamiento para distintos padecimientos incluyendo la epilepsia, la cual a principios de la década de 1920 se asoció a un desbalance en el equilibrio ácido-base del cuerpo, en donde la alcalinización del medio incrementaba la probabilidad de desarrollar

ataques convulsivos (Barborka, 1928). En esa misma década, se reportó que la disminución de las convulsiones se producía típicamente después de 2 o 3 días de ayuno a consecuencia de un cambio metabólico generado por la ausencia de alimentos o carbohidratos forzando al organismo a metabolizar grasas formando ácidos (ceto-ácidos) (Wheless, 2008). No obstante, el principal problema del ayuno radicaba en que al reanudar la dieta normal también volvían a presentarse las crisis convulsivas. Por consiguiente, Russel Wilder en 1921 propuso la administración de una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos en pacientes pediátricos con epilepsia refractaria, para estimular la β -oxidación y en consiguiente la producción de CC, simulando los efectos del ayuno y disminuyendo considerablemente los eventos convulsivos. A pesar de que el uso de la “Dieta cetogénica” fue cada vez menor a consecuencia del desarrollo de fármacos anticonvulsivantes, actualmente es considerada la principal alternativa terapéutica para el tratamiento de niños con epilepsia refractaria, puesto que ha mostrado disminuir eficazmente los episodios convulsivos e incluso eliminarlos completamente desde los 3 meses de tratamiento (Freeman and Vining, 1999; Wheless, 2008)

Desde entonces se ha evaluado el efecto terapéutico de los CC en diversos trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral, neurotrauma, tumores cerebrales, esclerosis lateral amiotrófica, autismo, cefalea y trastornos del sueño (Stafstrom and Rho, 2012). Así mismo, los CC han mostrado poseer un efecto neuroprotector en condiciones de estrés energético. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que los CC previenen notablemente la muerte neuronal inducida por la inhibición de la glucólisis y la ausencia de glucosa *in vitro* y durante condiciones de hipoglucemia severa inducida por la administración de insulina en ratas (Haces et al., 2008; Paramo et al., 2010; Paramo et al., 2013; Julio-Amilpas et al., 2015).

El efecto protector de los CC se atribuye principalmente a su componente metabólico al incrementar los niveles energéticos, restablecer el metabolismo

mitocondrial y mantener la integridad de los complejos de la cadena respiratoria elevando los niveles de ATP (Veech, 2004; Lin et al., 2015). Así mismo, se ha sugerido que los CC promueven la biogénesis mitocondrial y previenen su fraccionamiento, evitan que se desaten cascadas apoptóticas al impedir la apertura del PTM y disminuyen el estrés oxidante (Bough et al., 2006; Kim et al., 2007). Maalouf y colaboradores en 2007, demostraron que la combinación de BHB y AcAc disminuye la producción de ERO por el complejo 1 de la cadena respiratoria, previniendo el daño neuronal inducido por la exposición prolongada a glutamato (Maalouf et al., 2007). Así mismo, estudios de nuestro grupo muestran que tanto el D-BHB como el AcAc tienen la capacidad de disminuir las ERO en modelos de HS *in vivo* y en cultivos primarios de neuronas corticales en condiciones de privación de glucosa. Además se demostró que el isómero no metabolizable del BHB, L-BHB, también tiene la capacidad de disminuir y atrapar ERO (Haces et al., 2008; Paramo et al., 2010; Julio-Amilpas et al., 2015). Del mismo modo, la administración de este sustrato energético disminuye la lipoperoxidación lipídica, en modelos de HS y de isquemia cerebral (Suzuki et al., 2002; Hacec et al., 2008).

No obstante, se han descrito otros mecanismos de protección de los CC además de los que se relacionan con su función metabólica y antioxidante. Por ejemplo, diversos estudios han asociado al BHB con la modulación de procesos inflamatorios mediante la inhibición del inflammasoma NLRP3, la disminución en la producción de IL-1 β e IL-18 y al atenuar la activación de la caspasa 1 a través de la inhibición de la salida de K⁺ (Youm et al., 2015). También, se ha reportado que el BHB participa en la regulación epigenética. Xie y Cols identificaron y describieron el proceso de β -hidroxibutilación, una marca de histonas derivada del BHB (Xie et al., 2016). Asimismo, el BHB promueve la actividad transcripcional de genes de la respuesta antioxidante como FOXO3A, metalotienina 2 (MT2) y el factor de transcripción NRF2 que a su vez promueve la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa a través de la inhibición de las desacetilasas de histonas de clase 1 (HDACs) y también mediante la activación de la SIRT3

como consecuencia del incremento del cociente NAD⁺/NADH mitocondrial (Shimazu et al., 2013; Yin et al., 2015).

FOXO3A puede además estimular la expresión de genes de autofagia (Sun et al., 2018a). En concordancia, estudios de nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con BHB, previene la muerte por ausencia de nutrientes a través de la estimulación del flujo autofágico en cultivos primarios de neuronas corticales (Camberos-Luna et al., 2016).

De este modo, puede decirse que los CC son moléculas multifuncionales, pues se han descrito diversos mecanismos por los cuales ejercen su papel neuroprotector, entre los que figuran su efecto sobre el metabolismo, su capacidad antioxidante, epigenética, anti-inflamatoria e incluso se han propuesto como moléculas implicadas en la señalización celular (Camberos-Luna and Massieu, 2020).

En vista de que los descubrimientos relacionados con el papel neuroprotector de los CC han ido en aumento; se han comenzado a implementar las llamadas “neurocetoterapias”, es decir, estrategias terapéuticas cuyo propósito principal es incrementar los niveles de CC en sangre para utilizarlas como moléculas de protección ante diversas patologías. Algunas de estas estrategias inducen la producción endógena de CC como la dieta cetogénica, la restricción calórica, el ayuno intermitente y la ingesta de triglicéridos de cadena media. Aunque también pueden incrementarse los niveles de CC de manera exógena vía intravenosa y enteral o por el consumo oral de sales o de esteres cetónicos (Camberos-Luna and Massieu, 2020). Estas últimas estrategias, principalmente el uso de esteres cetónicos o la ingesta de triglicéridos de cadena media han mostrado ser alternativas más amigables para los pacientes que la dieta cetogénica, ya que la adherencia a las dietas cetogénicas es difícil de lograr, pues son poco palatables, además de que pueden asociarse a efectos adversos como problemas gastrointestinales, pérdida de peso y tras un tratamiento prolongado incluso pueden generar

nefrolitiasis, acidosis metabólica e hipercolesterolemia. (Camberos-Luna and Massieu, 2020; Jensen et al., 2020).

4. Autofagia

Ante el estrés energético, las células han desarrollado diferentes mecanismos para restablecer la homeostasis celular, como la respuesta antioxidante, la respuesta a estrés reticular y la autofagia. Esta última es un mecanismo de sobrevivencia celular altamente conservado que involucra la degradación lisosomal de macromoléculas y organelos celulares dañados en biomoléculas básicas como aminoácidos y ácidos grasos que podrían utilizarse para la síntesis de nuevas macromoléculas y ATP o bien, podrían ser secretadas por la célula. De este modo, la autofagia desempeña un importante papel en la respuesta adaptativa durante condiciones desfavorables como la ausencia de nutrientes (Wirawan et al., 2012; Yin et al., 2016). No obstante, en todas las células existe actividad autofágica basal para conservar la homeostasis celular y el balance energético. Se ha relacionado con diversos procesos fisiológicos como son el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular, y la atenuación del daño asociado al envejecimiento, la diferenciación y desarrollo celular así como la inmunidad innata y adaptativa (Yin et al., 2016). En contraste, cuando la autofagia no procede adecuadamente o cuando su actividad es excesiva puede contribuir a la muerte celular (Liu and Levine, 2015).

Típicamente la autofagia en mamíferos se clasifica en macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA, por sus siglas en inglés de *Chaperone-mediated autophagy*). El centro de todas ellas es el lisosoma, pero mientras que la degradación del cargo de la CMA y la microautofagia ocurre directamente en el lisosoma (ya sea mediante un complejo de translocación de proteínas transmembrana que dirige el cargo al lisosoma, como ocurre en la CMA o bien al ser directamente engullidas por el lisosoma como se ha descrito en la microautofagia), en la macroautofagia se genera una nueva estructura de doble membrana llamada “autofagosoma”.

Posteriormente los lisosomas se fusionan con la membrana externa de esta estructura proveyendo hidrolasas que degradan la membrana interna junto con su contenido. Considerando que el tamaño del autofagosoma oscila entre 0.5 y 2 μm , la macroautofagia es capaz de degradar agregados proteicos, mitocondrias, lisosomas, fragmentos de retículo endoplásmico dañados e incluso bacterias (Mizushima et al., 2008; Yim and Mizushima, 2020)

4.1. Descripción de las etapas la autofagia.

La macroautofagia (a la cual me referiré a partir de ahora como autofagia) es un proceso orquestado por una compleja maquinaria proteica que dirige su correcta ejecución (Figura 6). La regulación adecuada de este proceso es indispensable para la sobrevivencia de las células, por lo que cuenta con varios puntos críticos de control. Para facilitar el estudio de la maquinaria central de la autofagia se ha dividido en las siguientes etapas:

a) Iniciación

La vía clásica de iniciación de la autofagia, involucra la inhibición del complejo mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), que regula numerosos procesos biológicos entre los que destacan el crecimiento y la proliferación celular, la síntesis de proteínas y la inhibición de la autofagia (Ryskalin et al., 2017). Tanto mTORC1 como AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) regulan a la autofagia mediante la fosforilación coordinada de ULK1, la cual es indispensable para la formación de complejo ULK1, encargado de la inducción de la autofagia. Cuando la cantidad de nutrientes en el ambiente es suficiente, mTORC1 fosforila a ULK1 en la serina 757 (S757), previniendo la formación del complejo de inducción de autofagia. Por el contrario, cuando la disponibilidad de nutrientes es baja, la AMP cinasa (AMPK) fosforila a la subunidad de mTORC1 RPTOR, para inducir autofagia. Esto produce la liberación de ULK1 del complejo mTORC1 y permite su interacción con AMPK que activa directamente a ULK1 al fosforilarlo en la S317. Subsecuentemente ULK1 activa al complejo beclina1/fosfatidil-inositol-cinasa de clase III (BECN1/PIK3C3) a través de la fosforilación de las proteínas

que lo componen, entre ellas a BECN1 en S14, que promueve la actividad de cinasa de la PIK3C3 (Figura 6) (Zachari and Ganley, 2017; Klionsky et al., 2021).

b) Nucleación

El complejo BECN1/PIK3C3, compuesto por BECN1, AMBRA, VPS15, UVRAG y ATG14 es fundamental durante la nucleación (Figura 6). En esta etapa, el fosfatidil-inositol-3-fosfato (PIP3) inducido por la PIK3C3, recluta otras proteínas ATG (Autophagy Related Genes proteins) al sitio de ensamblaje del autofagosoma (WIPI, DFCP1, MP1, ATG2 y ATG9). Por otro lado, AMBRA1, normalmente funciona como ancla del complejo BECN1/PIK3C3 al citoesqueleto, pero en condiciones de estrés energético, ULK1 activo fosforila a AMBRA1 liberando al complejo de los microtúbulos y promoviendo su translocación al retículo endoplásmico (RE), uno de los organelos más importante para la formación del autofagosoma (Lee et al., 2013).

c) Elongación

La elongación del fagóforo (estructura pre-autofagosomal) probablemente requiere reclutar membrana proveniente de otros organelos. Una de las proteínas encargadas de esta función es ATG9, que es una proteína transmembrana que circula entre la red *trans*-Golgi y los endosomas probablemente acarreado membrana para la formación del autofagosoma (Ravikumar et al., 2010). Dos sistemas de tipo ubiquitinación están implicados en la elongación, modelado y sellado de la membrana del autofagosoma. En el primer sistema la proteína ATG12 es activada por ATG7, que tiene una función similar a E1. Posteriormente ATG12 se transfiere a ATG10, que funciona como E2 y después se forma una unión covalente con ATG5. El conjugado ATG12-ATG5 interactúa más adelante con ATG16 formando un trímero que se multidimeriza para formar un gran complejo que se transloca a la membrana externa del fagóforo para promover su elongación e incluso se ha sugerido que es importante para la determinación de su curvatura (Wirawan et al., 2012).

Este nuevo complejo ATG12-ATG5-ATG16 actúa como E3 para inducir la segunda reacción de tipo ubiquitinación, en la cual participa la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3), la cual es escindida por ATG4, dando lugar a la forma citosólica, LC3-I. Esta proteína se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) a través de las proteínas ATG7 (E1), ATG3 (E2) y el mismo complejo ATG12-ATG5-ATG16 (E3) generando la forma membranal, ahora denominada LC3-II (Ravikumar et al., 2010; Rubinsztein et al., 2012). Una vez que el autofagosoma está maduro, ATG4 se encarga de deslipidar a las moléculas de LC3-II que se encuentran en la parte externa de la membrana del autofagosoma y transformarlas de nuevo en su forma citosólica (Figura 6) (Mizushima, 2007).

Paralelo a esto, existen proteínas denominadas “receptores autofágicos” cuya función es reconocer el cargo autofágico (proteínas/organelos dañados, patógenos, exceso de peroxisomas, etc) y dirigirlo al autofagosoma durante su formación. Estas proteínas se caracterizan por su habilidad para reconocer señales de degradación y porque pueden unirse a LC3, pues poseen una región de reconocimiento a LC3 (LIR). La señal de degradación más común es la poliubiquitinación y existen varios receptores de autofagia que poseen dominios de unión a ubiquitina como optineurina, NBR1, NDP52 y el más estudiado SQSTM1/p62 (Figura 6) (Deng et al., 2017).

d) Degradación

Después del cierre de la membrana del fagóforo, la doble membrana del autofagosoma madura y se fusiona con un lisosoma generando una nueva estructura llamada “autolisosoma” en donde se degradará su contenido (Figura 6). En primer lugar, el autofagosoma y el lisosoma deben acercarse. La ausencia de nutrientes induce la acumulación perinuclear de lisosomas, mediante cambios en el pH intracelular (Heuser, 1989). Los autofagosomas maduros son transportados por proteínas motoras del citoesqueleto como dineínas y kinesinas a lo largo de los microtúbulos hasta la región perinuclear cerca de los lisosomas (Jahreiss et al., 2008). En la fusión del lisosoma con el

autofagosoma participan diversos factores de anclaje. El factor de anclaje central para la fusión del autofagosoma y el lisosoma es el complejo HOPS, que se compone de VPS11, VPS16, VPS18, VPS33A, VPS39 y VPS41. El complejo HOPS interactúa con Q-SNARE STX17 y facilita el ensamblaje del complejo *trans*-SNARE para mediar en la fusión autofagosoma-lisosoma. Otro factor importante es RAB7 que puede unirse a membranas y proteínas ancladas a la membrana e interactúa con el complejo HOPS mediante VPS41 y VPS39, el ensamblaje del complejo RAB7-HOPS puede unir 2 membranas opuestas, lo que facilita la fusión de membranas; además RAB7 interactúa con varios factores de anclaje que mejoran la especificidad del autofagosoma y el lisosoma. Para garantizar un alto nivel de especificidad en la fusión autofagosoma-lisosoma se necesitan factores de anclaje adicionales. Hasta el momento se ha demostrado la participación de “proteínas adaptadoras” que se unen a ciertos componentes del lisosoma o del autofagosoma como LC3 y ATG12-ATG5, al mismo tiempo que interactúan con el complejo SNARE y/o factores de anclaje como RAB7 y el complejo HOPS asegurando la fusión. Por ejemplo, PLEKHM, que es una proteína adaptadora que contiene un motivo LIR y por tanto se une directamente a LC3, esta proteína forma un puente entre LC3 y el complejo HOPS uniendo VPS41 a RAB7 en los lisosomas. TECPR1, otro tipo de proteína adaptadora localizada en los lisosomas, se une a ATG12-ATG5 y PtdIns3P localizados en autofagosomas facilitando la fusión entre el autofagosomas y el lisosoma (Yu et al., 2018; Zhao and Zhang, 2019).

Cuando todas las etapas de la autofagia ocurren de manera ininterrumpida, se dice que hay “flujo autofágico” y una manera de evidenciarlo es analizando los niveles de SQSTM1/p62, que es degradada junto con el cargo que recluta al autofagosoma. De este modo, se utiliza la administración de fármacos como la cloroquina (CQ), que aumenta el pH lisosomal inhibiendo la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma y por lo tanto promueve la acumulación de SQSTM1/p62 interrumpiendo el flujo autofágico (Browning and Lee, 2014; Klionsky et al., 2021).

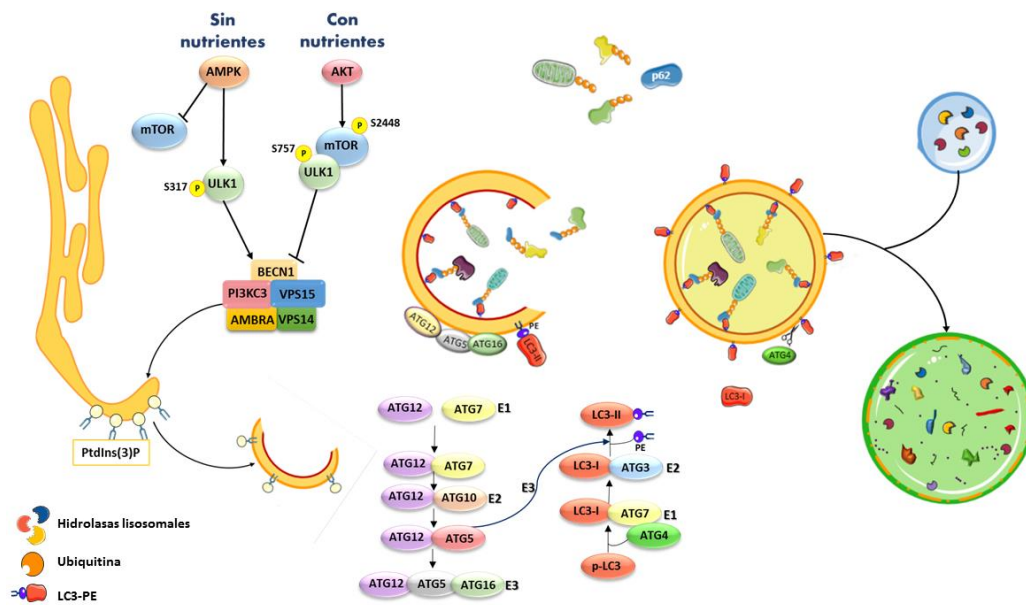


Figura 6. Proteínas implicadas en la autofagia. Durante la ausencia de nutrientes los niveles de AMP incrementan activando a AMPK, esta enzima inhibe al complejo mTOR permitiendo que ULK1 se libere y pueda ser fosforilado por AMPK. ULK1 activo, promueve el reclutamiento de proteínas ATG indispensables para la formación del fagóforo, en donde la lipidación de LC3-I para producir LC3-II es necesaria para la elongación y maduración de esta estructura hasta convertirse en un autofagosoma maduro. La proteína SQSTM1/p62 es la encargada de dirigir el contenido citoplasmático que se va a degradar al interior del autofagosoma por su capacidad para reconocer a LC3, de esta forma tanto SQSTM1/p62 como LC3-II serán degradadas en el interior de la estructura que se forma por la fusión del autofagosoma con un lisosoma denominada autofagolisosoma.

4.2. Participación de la autofagia en la sobrevivencia neuronal en respuesta al estrés energético

Las neuronas son células post-mitóticas, es decir, son células que pierden la capacidad de reactivar su ciclo celular permaneciendo en estado G0. Se piensa que esta característica es una respuesta adaptativa debido a que las neuronas requieren generar conexiones estables para la transmisión sináptica (Frade and Ovejero-Benito, 2015). Por consiguiente, la autofagia adquiere un valor crítico en el mantenimiento de la homeostasis y la sobrevivencia neuronal debido a que el reemplazo de neuronas disfuncionales es muy pobre y solo ocurre a través de la neurogénesis en zonas particulares del cerebro, por lo que las neuronas existentes deberán sobrevivir (Geronimo-Olvera and Massieu, 2019).

La eliminación continúa de proteínas y organelos anormales a través de la autofagia ayuda a prevenir la acumulación de agregados proteicos que pueden alterar la función neuronal. En este sentido, se ha reportado que ratones KO de genes esenciales para la autofagia (*ATG5*, *ATG7* y *Fip200*) en el SNC, muestran daño neurológico y conductual además de acumulación de proteínas poliubiquitinadas, degeneración axonal y muerte neuronal, dando como resultado la muerte temprana de los sujetos experimentales (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Liang et al., 2010).

A pesar de que la autofagia actúa como respuesta adaptativa ante situaciones de estrés energético, el papel de la autofagia en la sobrevivencia neuronal ha sido controversial. Por un lado, existen estudios que sugieren que la autofagia excesiva podría contribuir en la muerte neuronal a través de la degradación de componentes celulares esenciales o mediante su interacción con la cascada apoptótica durante condiciones patológicas (Uchiyama et al., 2008; Wen et al., 2008; Nikolettou et al., 2013). En este sentido, se ha observado en modelos de hipoxia/isquemia que la inhibición de la autofagia previene la muerte neuronal, sugiriendo su participación en la inducción de la muerte neuronal (Levine and Yuan, 2005; Koike et al., 2008; Kang et al., 2011; Shi et al., 2012).

En contraste, se ha reportado que la autofagia previene la muerte neuronal en animales sujetos a preconditionamiento isquémico (Carlioni et al., 2008; Yan et al., 2011; Sheng et al., 2012; Yan et al., 2013; Fan et al., 2014). Así mismo, Jang y colaboradores en el 2013 describieron la activación de autofagia subsecuente a la privación de glucosa (PG) en una línea neuronal, y sugirieron que la interrupción del flujo autofágico durante la fase de RG promueve la muerte, sugiriendo que la autofagia tiene un rol neuroprotector (Jang et al., 2013).

Actualmente se ha llegado a la conclusión de que el límite entre la inducción de la muerte neuronal o la sobrevivencia radica en la intensidad y la duración del estímulo estresante, los cuales pueden disparar diferentes respuestas. Cuando el daño es moderado y breve, la autofagia promueve la sobrevivencia neuronal al remover componentes celulares dañados para restaurar la homeostasis; por el contrario, un estímulo estresante prolongado e intenso induce “autofagia mal adaptativa” o disfuncional incrementando el daño neuronal (Geronimo-Olvera and Massieu, 2019).

En este contexto, los defectos en la autofagia que se observan en condiciones severas de ausencia de nutrientes pueden estar relacionados con la escases de ATP, ya que a pesar de ser un proceso catabólico, requiere de un aporte de energía en por lo menos 2 etapas autofágicas: en el secuestro del material citosólico en el autofagosoma y en el mantenimiento de actividad de la bomba de protones (V-ATPasa) necesaria para la acidificación de los lisosomas, esencial para la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, así como para la degradación del autofagolisosoma (Moruno et al., 2012). Recientemente en nuestro grupo se demostró que la autofagia se activa de manera temprana en neuronas corticales expuestas a ausencia de glucosa, probablemente como respuesta adaptativa a la privación de nutrientes. Sin embargo, el proceso ocurre de manera defectuosa como consecuencia de la disfunción lisosomal mediada por la calpaína que se activa durante la ausencia de nutrientes y rompe a la proteína LAMP2 alterando la fusión autofagosoma-

lisosoma, lo que conlleva a transformar una respuesta autofágica adaptativa en autofagia “aberrante” que contribuye a la muerte neuronal (Geronimo-Olvera et al., 2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Experimentos *in vitro* de nuestro grupo sugieren que durante la reintroducción de glucosa en neuronas previamente expuestas a ausencia de glucosa se produce autofagia mal adaptativa, que contribuye a la muerte neuronal por apoptosis, mientras que la administración del D-BHB estimula el flujo autofágico y promueve la sobrevivencia neuronal. No obstante, no se ha estudiado la dinámica de la autofagia durante la hipoglucemia severa *in vivo*, ni su papel en la muerte neuronal. Por tal motivo, el presente estudio se enfocó en investigar los cambios en los marcadores de autofagia durante la fase de HS y durante la infusión de glucosa (IG), en ratas tratadas con insulina en presencia o ausencia de un episodio de coma. Así mismo, investigamos si el tratamiento con D-BHB en los animales sometidos al coma hipoglucémico podría preservar la autofagia funcional y contribuir a la sobrevivencia neuronal, tal como se observó *in vitro*.

HIPÓTESIS

El tratamiento con D-BHB restablecerá la autofagia deficiente inducida por la hipoglucemia severa lo que contribuirá a la sobrevivencia neuronal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible alteración de la dinámica de la autofagia en condiciones de hipoglucemia severa y si el efecto protector del D-BHB está asociado al restablecimiento de la autofagia funcional.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Investigar la dinámica de la autofagia en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas sometidas a la hipoglucemia severa con y sin infusión de glucosa, en presencia y ausencia de coma.
- Analizar si existe un efecto protector del D-BHB administrado después del coma hipoglucémico.
- Determinar si el efecto D-BHB está relacionado con la activación de autofagia adaptativa y si esto podría conferir un efecto neuroprotector.

METODOLOGÍA

1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar entre 280-350g de peso (2-3 meses), procedentes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Estos animales se mantuvieron bajo condiciones de alimentación y agua *ad libitum* y con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura controlada (22-23°C) en cajas estándar de acrílico. Un día antes del ensayo de hipoglucemia se restringió el alimento de los animales (4 pellets/15 gramos) antes del cambio de ciclo luz-oscuridad. Todos los protocolos empleados fueron realizados durante la fase de luz. El tamaño de muestra por grupo oscilo entre 3 y 7 animales, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente entre los distintos grupos. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IFC (CICUAL/IFCLMT101-16)

2. Inducción de hipoglucemia severa sin infusión de glucosa (HS).

La HS fue inducida en animales no anestesiados mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de 32 U/kg de insulina humana (Lilly, Humulin 70/30). La concentración de glucosa en sangre fue monitoreada mediante una muestra de sangre obtenida de la vena de la cola antes (niveles basales) y a las 0.5, 1, 2 y 3 h posteriores a la administración de insulina utilizando un glucómetro convencional (Abbott Laboratories, Bedford, MA, USA). Aproximadamente una hora después de la inyección de insulina, los animales alcanzaron el estado de HS (<40-30 mg/dl) y fueron sometidos a un proceso de eutanasia 2 h después. Los cerebros de estos animales fueron extraídos y procesados para su análisis por inmunoblot (Fig. 7A).

Los animales pertenecientes al grupo control se trataron en paralelo con los animales expuestos a HS. Se les administró solución vehículo (ácido acético al 0.1%) en lugar de insulina.

3. Inducción de hipoglucemia severa con infusión de glucosa (HS+IG)

Los animales de este grupo fueron sometidos a HS y rescatados con una infusión de glucosa al 25% (IG) continua. Con la finalidad de monitorear la actividad eléctrica cerebral se realizó un registro electroencefalográfico (EEG), para ello, una semana antes de la inducción de hipoglucemia se implantaron electrodos epidurales a los animales bajo anestesia con isoflurano entre 2.0% y 3.0% y como antiinflamatorio se administró meloxicam (1 mg/kg i.p.) después de la cirugía. La administración de 32 U/kg de insulina para la inducción de hipoglucemia fue realizada entre las 09:00 y las 11:00 h y los niveles de glucosa en sangre se monitorearon antes (tiempo 0) y a las 0.5, 1, 2, 3, 6, 7 y 27 h después de inyección de insulina. Para conocer la actividad eléctrica basal del cerebro, el registro electroencefalográfico comenzó 30 min antes de la administración de insulina y continuó durante toda la fase de hipoglucemia y de IG hasta que los animales recuperaron completamente la actividad eléctrica normal (Fig. 7B). El rescate con glucosa se realizó después de la pérdida del reflejo de enderezamiento (RR, por sus siglas en inglés *righting reflex*), que

precede al estado de coma (Haces et al., 2010) mediante un bolo ip de 0.3 mL de glucosa al 25% en buffer Krebs-Henseleit, seguido de una infusión intravenosa (i.v.) de esta misma solución durante 3 h (1.5 ml/h) con un catéter insertado en la vena de la cola empleando una bomba de perfusión (Harvard Apparatus 22, South Natick, MA, Estados Unidos). Ninguno de los animales de este grupo mostró isoelectricidad (ausencia de actividad eléctrica cerebral), que es indicativo del coma hipoglucémico en el EEG. Un subgrupo de estos animales, se sacrificó 6 h después de la IG (9 h después de la inyección de insulina) y un segundo subgrupo a las 24 h (27 h después de la inyección de insulina) (Fig. 7B). Se extrajeron los cerebros y se procesaron para su análisis por inmunoblot.

Los animales pertenecientes al grupo control se trataron en paralelo con los animales experimentales. Se les administró solución vehículo (ácido acético al 0.1%) en lugar de insulina y se mantuvieron ayuno durante todo el tiempo que duró el experimento.

4. Inducción de coma hipoglucémico seguido de infusión de glucosa (Coma)

Los animales sometidos a coma (Coma), fueron tratados del mismo modo que los del grupo HS+IG, con la diferencia de que después de presentarse la HS se permitió que la hipoglucemia progresara al estado de coma determinado por EEG; 5 min después de iniciado el coma, los animales recibieron un bolo i.p. de 0.3 ml de glucosa al 25% como se describe para el grupo HS+IG y 12 min después se administró una infusión continua de glucosa i.v. como se describió previamente. El período de coma osciló entre 6 y 12 min (media = 8.9 ± 0.34). Se optó por un mínimo de 6 min de coma puesto que en estudios previos hemos observado que los períodos de coma más cortos producen muerte neuronal muy limitada o nula, de modo que los animales que mostraron periodos de coma de 5 min o menos fueron descartados de este estudio. En contraste, se seleccionó un máximo de 12 min de coma debido a que los animales con periodos de coma más largos pueden manifestar insuficiencia

respiratoria. De estos animales, un subgrupo se sacrificó a las 6 h y un segundo subgrupo a las 24 h después de la IG (Fig. 7C). Los cerebros se extrajeron y procesaron para análisis de inmunoblot (6 y 24 h) e histología (24 h). Aquellos animales que desarrollaron crisis convulsivas fueron descartados del estudio.

Los animales pertenecientes al grupo control se trataron en paralelo con los animales experimentales. Se les administró solución vehículo (ácido acético al 0.1%) en lugar de insulina y se mantuvieron ayuno durante todo el tiempo que duró el experimento.

5. Tratamiento con D-BHB

Únicamente aquellos animales expuestos al coma fueron tratados con una dosis total de 250 mg/kg (1M) o 500 mg/ kg (2M) de D-BHB (Coma+BHB), la cual fue dividida en dos administraciones i.p. La primera administración de D-BHB (125 o 250 mg/kg) se administró 10 min después del inicio de la infusión i.v. de glucosa y la segunda al término de la misma (3 h después del coma). Los animales fueron sometidos a un proceso de eutanasia 6 o 24 h post-IG como se indica en la Figura 7D. Los cerebros fueron extraídos y procesados para su análisis por inmunoblot (6 y 24 h) e histología (24 h).

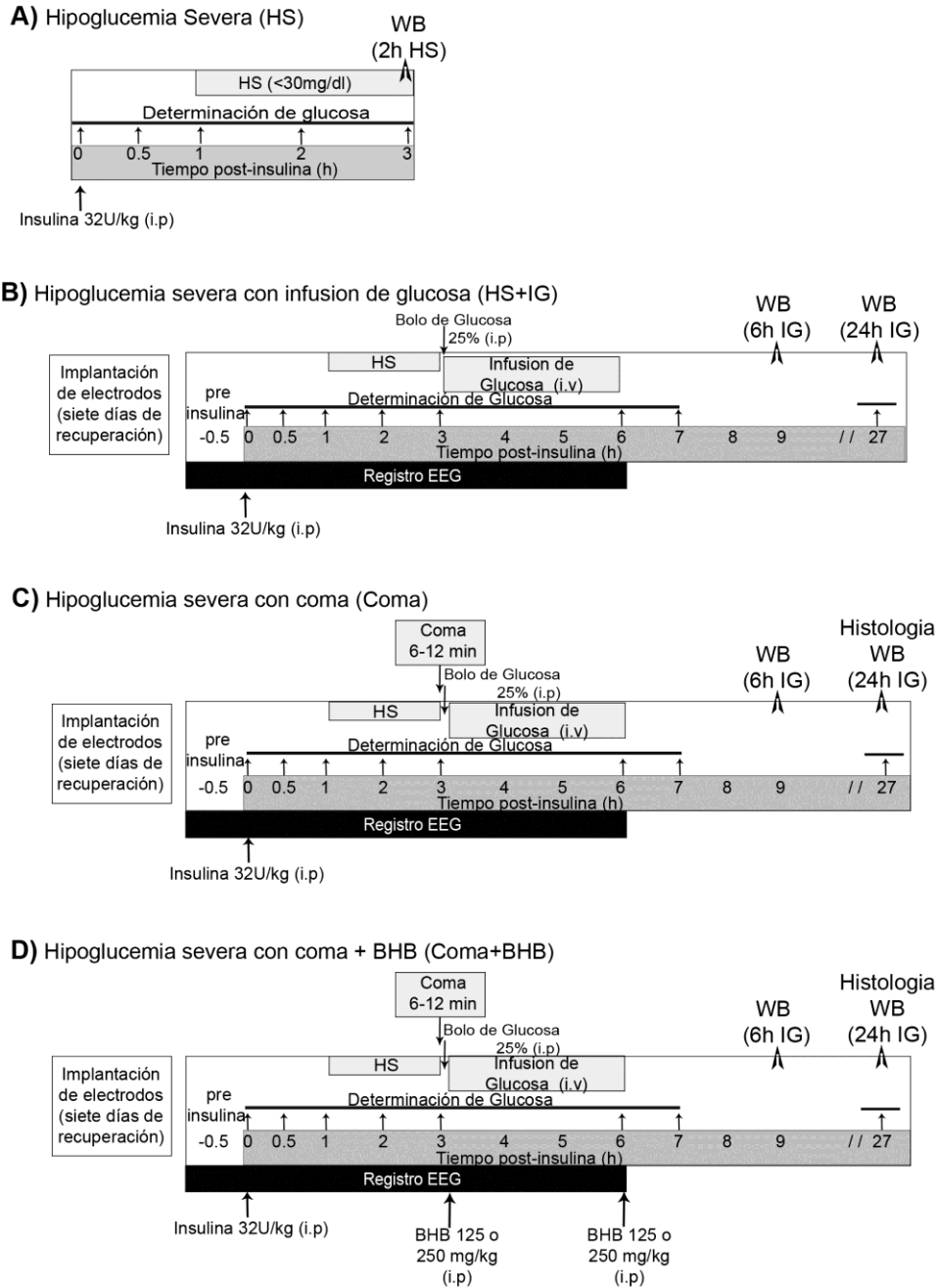


Figura 7. Diseño Experimental. **A)** Grupo de HS. Se indujo la HS mediante la administración i.p. de insulina (32 U/kg), estos animales fueron sometidos a un proceso de eutanasia 2 h después de haber alcanzado 30mg/dl de glucosa en sangre. **B)** Grupo de HS+IG. Los animales fueron implantados con electrodos epidurales una semana antes de la inducción de HS para el registro electroencefalográfico (EEG); siete días después se expusieron a 2 h de HS y fueron rescatados con glucosa antes de alcanzar el estado de coma. **C)** Grupo de Coma. Los animales fueron tratados de la misma forma que el grupo de HS+IG, pero en estos animales, la

hipoglucemia se dejó progresar al estado de coma de entre 6 y 12 min e inmediatamente después fueron rescatados con glucosa. **D) Grupo de Coma+BHB.** Los animales recibieron el mismo trato que el grupo de Coma, pero estos animales recibieron dos dosis de 125 mg/kg o de 250 mg/kg de D-BHB vía i.p; la primera en los 10 min siguientes al inicio de la IG después del coma y la segunda al finalizar la IG. Los animales fueron sometidos a un proceso de eutanasia a las 6 o 24 h posteriores al inicio de la IG en los grupos para su posterior análisis por western-blot (WB) o Inmunohistoquímica.

6. Determinación de D-BHB en sangre.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola (siete animales por grupo) y se midió la concentración de D-BHB utilizando un sistema de medición de glucosa y cetonas en sangre (FreeStyle Optium Neo, Abbott Diabetes Care, Limited, Witney, Oxon, Reino Unido) y tiras reactivas para cetonas (FreeStyle Optium β -Ketones). Se obtuvieron muestras de animales intactos y en ayuno en distintos momentos del período experimental. Los niveles de D-BHB, fueron también determinados en muestras de sangre de animales de los grupos Coma y Coma+BHB, antes (tiempo 0) y 1 y 2 h después de la inyección de insulina; en el momento en que los animales alcanzaron el coma (3 h); a diferentes tiempos después de la recuperación con glucosa o glucosa+D-BHB (250 mg / kg); después de la segunda administración de D-BHB (250 mg / kg), y 27 h después de la administración de insulina, como se indica en la Figura 8C. Los animales de estos grupos fueron igualmente manipulados durante el período de hipoglucemia antes de la recuperación y fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los tratamientos.

7. Inmunoblot

Los animales fueron sometidos a un proceso de eutanasia con una dosis letal de pentobarbital Sódico vía i.p. y posteriormente se obtuvo el tejido cerebral mediante decapitación disectando las regiones de interés (corteza parietal e hipocampo). Inmediatamente después se homogenizó el tejido en buffer de lisis 1:10 peso/volumen que contenía: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 1%, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 0,5%, PMSF 1 mM, NaPPi 5 mM, Na_3VO_4 2 mM y 2mg/ml del coctel de inhibidores de proteasas Roche

complete, pH 7.5. El lisado obtenido fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C y las proteínas fueron desnaturalizadas en buffer de Laemmli 2X + β -mercaptoetanol en ebullición durante 6 min. La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo al método de Lowry. Se utilizaron entre 30 y 40 microgramos de proteína para los ensayos de electroforesis en geles de acrilamida (10-16%) en condiciones desnaturalizantes. Los geles fueron electrotransferidos a membranas de polivinilidene fluoride (PVDF), posteriormente se bloquearon en TBS/leche al 5% durante 1 h y se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios específicos: LC3 (1:5000); ATG5 (1:1000), p-ULK1 S317 (1:500); BECN1 (1:2000), ATG7 (1:1,000), ULK1 (1: 6000), p-ULK1 S757 (1:6000), mTOR (1:1000), p-mTOR S2448 (1:1000), AMPK (1:1000), SQSTM1/p62 (1:2500) y como control de carga, actina (1:7000) en TBS/BSA 5%. Se realizaron 3 lavados con TBS, cada uno de 10 min; se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo correspondiente en TBS/leche al 5%. La inmunorreactividad de los anticuerpos se detectó con sustrato de quimioluminiscencia (LuminataTM, Forte, de Merck Millipore), empleando el escáner digital C-Digit Blot de LI-COR Biosciences y la densidad óptica de las bandas de interés fue medida utilizando el programa ImageJ.

8. Histología

Veinticuatro horas después de los tratamientos, los animales de los diferentes grupos experimentales (n=4-7) fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital i.p. y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina al 0.9% seguida de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 mM; los cerebros se extrajeron y se transfirieron a un gradiente de sacarosa del 20 al 30% (24 y 72 h, respectivamente). Se obtuvieron cortes coronales de cerebro de 20 y 40 μ m en un criostato (LEICA CM1510S) para análisis histológico.

8.1. Tinción con fluoro-jade B y Nissl

La muerte neuronal se evaluó a las 24 h mediante la tinción de Fluoro Jade B (FJB). Los cortes de 40 μm , fueron montados en portaobjetos cubiertos con gelatina, se cubrieron durante 5 y 2 min con etanol al 80 y 70% respectivamente, posteriormente se lavaron y se cubrieron con permanganato de potasio al 0.06% durante 10 min. Enseguida las secciones se incubaron durante 20 min con 0.0004% de FJB disuelto en ácido acético al 0.1%, se secaron a 50°C durante 20 min, se sumergieron en xilol y finalmente fueron cubiertas con permount (Fisher Chemical™ SP15-500) (Julio-Amilpas et al., 2015). Las secciones fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ci (usando filtro AT-EGFP/F) y el número total de células positivas a FJB se cuantificó en ambos hemisferios. En la corteza parietal, se contabilizaron de forma bilateral en 15 secciones separadas por 200 μm . En el caso del hipocampo, se utilizaron 6 secciones y se contaron las células en un área de 200 μm^2 de la cresta y la hoja ventral del giro dentado utilizando el programa Image J. Los datos son reportados como número total de células positivas en ambas subregiones. El daño celular se confirmó por la presencia de células picnóticas después de la tinción con Nissl de las secciones adyacentes.

8.2. Inmunofluorescencia

Los cortes de cerebro fueron permeabilizados durante 30 min (PBS/Triton X-100 al 0.9%), se lavaron durante 10 min en PBS y se incubaron en buffer de citratos al 0.1% a 58°C durante 20 min. Posteriormente, se incubaron en PBS/glicina al 0.1% durante 15 min y después se bloquearon en PBS/BSA 5%/suero de cabra 2%/Tween 0.5%/Triton 0.9% a temperatura ambiente. Una hora más tarde, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios contra LC3 (1:300) o SQSTM1/p62 (en PBS/BSA 1%/Triton X-1000.3%/Tween-20 0.05%), durante 48 h a 4°C. Los portaobjetos se lavaron en PBS y se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-conejo o Dry-Light 488 anti-ratón (1:300). Después, los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst al 0.001% durante 10 min, se lavaron con PBS y se incubaron con Sudan Black B

(0.7%). durante 3 min para disminuir la fluorescencia de fondo. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal ZEISS LSM800 para LC3, SQSTM1/p62 y Hoechst. Las imágenes se adquirieron y procesaron utilizando el programa ZEN 3.1 de Zeiss. Los stack confocales se compusieron de 28 a 35 cortes (0.3 μm) y se obtuvo la proyección máxima de cada imagen (orientaciones x-y, x-z e y-z) de tres experimentos independientes.

9. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media SEM y se analizaron a través de una prueba de t de Student cuando se hizo una comparación entre dos grupos o ANOVA de una vía seguido de prueba post hoc LSD de Fisher para comparaciones múltiples, cuando se compararon más de dos grupos. La evolución temporal de los niveles sanguíneos de D-BHB en los grupos Coma y Coma+BHB se comparó mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparación múltiple de LSD de Fisher, y las comparaciones intragrupalas se realizaron mediante ANOVA de una vía y un post hoc LSD de Fisher.

RESULTADOS

1. Concentración de glucosa en sangre y registro encefalográfico

Los resultados muestran que el promedio de la concentración basal de glucosa en sangre fue cercano a 100 mg/dl en todos los grupos no mostrando diferencias significativas entre ellos. En los animales control, la concentración de glucosa fue constante durante el período experimental manteniéndose en el rango de normoglucemia (Figura 8A). En animales hipoglucémicos (HS+GI, Coma y Coma+BHB), la concentración de glucosa descendió a cerca de 30 mg/dl 1 h después de administración de insulina y disminuyó a 20 mg/dl durante las siguientes 2 h. Al término de la IG, los niveles de glucosa alcanzaron 30 mg/dl y 1 h más tarde se elevaron a 55 mg/dl. Los valores control se recuperaron 24 h después de la IG en todos los grupos experimentales (Figura 8A). La Figura 8B, muestra un registro EEG representativo obtenido antes, durante y después del coma hipoglucémico, en él se observa que antes de la administración de insulina las ondas eléctricas cerebrales tienen poca amplitud y alta frecuencia. Entre las 2 y 3 h posteriores a la administración de insulina, la actividad eléctrica cerebral declinó evidenciando en el EEG la aparición de ondas de mayor amplitud y de menor frecuencia con respecto a las observadas en el registro control, como se ha reportado anteriormente (Julio-Amilpas et al., 2015); durante este periodo, la concentración de glucosa descendió por debajo de 20 mg/dl; los animales estaban somnolientos y perdieron el RR; en el caso de los animales con coma, no hubo indicio de actividad eléctrica cerebral, evidenciando así la presencia del periodo isoelectrico. La actividad cerebral se recuperó 1 h después del IG. Los animales rescatados con glucosa más D-BHB (250 o 500 mg/kg) mostraron cambios similares en la actividad eléctrica cerebral de los animales sin tratamiento (no mostrado).

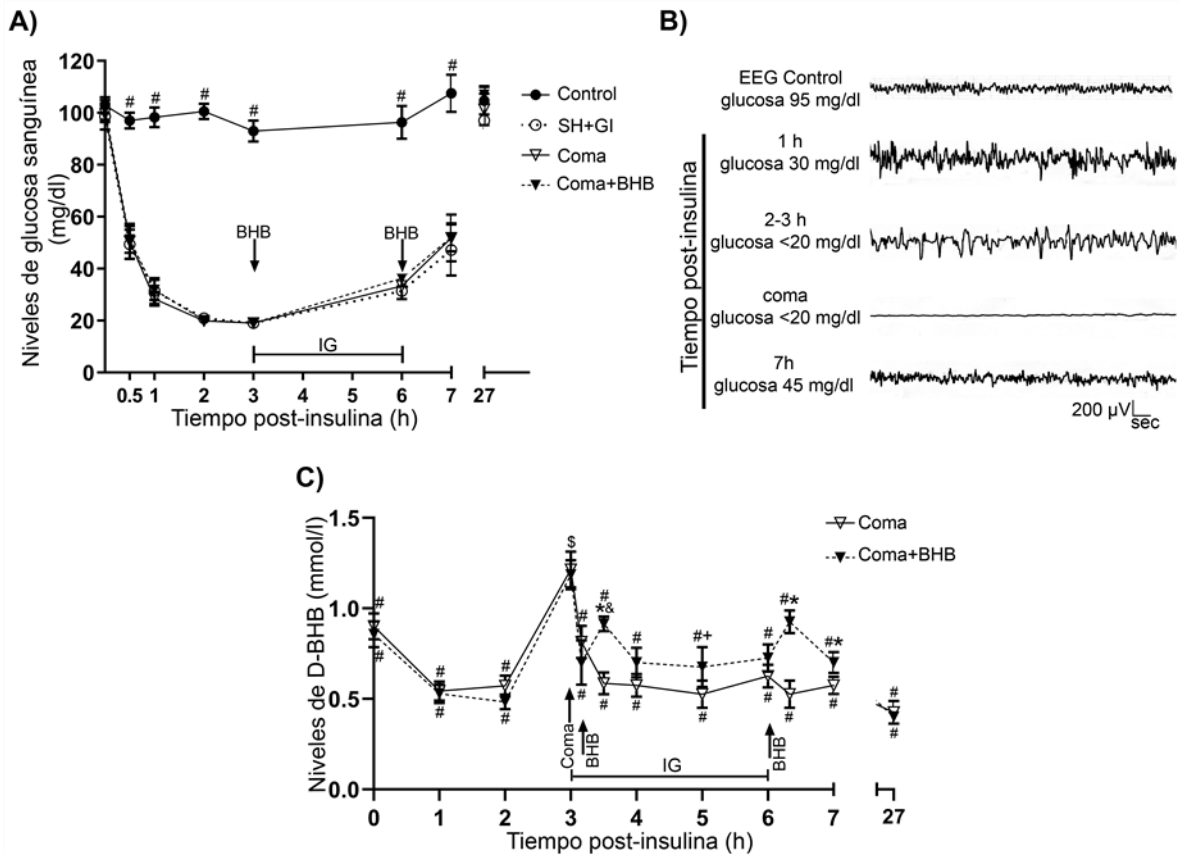


Figura 8. A) Progresión de la concentración de glucosa en animales control, hipoglucémicos rescatados con glucosa (HS+IG) y en animales con coma tratados (Coma+BHB) y no tratados (Coma) con D-BHB. Los datos se expresaron en términos de la media \pm el error estándar y se analizaron mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher, # $p \leq 0.05$ vs animales hipoglucémicos. **B)** Registro EEG en el que se muestran los cambios en la actividad eléctrica cerebral de un animal representativo antes de la administración de insulina (Control), durante la HS (1-3 h después de la administración de insulina), durante el coma y después de la IG. **C)** Niveles de D-BHB tomados en distintos momentos después de la administración de insulina en ratas con Coma tratadas y no tratadas con D-BHB. Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar y se analizaron mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher * $p \leq 0.05$ vs coma, $^s p \leq 0.05$ vs el valor correspondiente a 2h post insulina $^# p \leq 0.05$ vs el valor correspondiente a 3h (coma) $^& p \leq 0.05$ vs el valor correspondiente a 3.1h (antes de la administración del D-BHB) $^+ p \leq 0.05$ vs el valor correspondiente a 3.5h (20 min post D-BHB). $n=7$ animales por grupo.

2. Dinámica de la autofagia durante la hipoglucemia y la infusión de glucosa en ratas expuestas a hipoglucemia severa en presencia o ausencia de coma.

Los cambios en el contenido de LC3-II y SQSTM1/p62 se determinaron 2 h después de la HS y a las 6 y 24 h posteriores a la IG en ratas expuestas o no al coma. En la corteza parietal se observa que después 2 h de HS, la transformación de LC3-I en LC3-II aumentó notablemente, mientras que no se observó ningún cambio en los niveles de SQSTM1/p62. A las 6 h posteriores a la IG, los niveles de LC3-II permanecieron significativamente elevados y a las 24 h se recuperaron los valores control en el grupo HS+IG (Figura 9A). Como el aumento de LC3-II no estuvo acompañado de una disminución de SQSTM1/p62 (Figura 9B), estos datos sugieren que el flujo autofágico está bloqueado y que el aumento de LC3-II deriva de la acumulación de autofagosomas. En los animales que desarrollaron coma, LC3-II tendió a aumentar tras 6 h IG, sin embargo, a las 24 h el aumento fue significativo. Como en el caso de HS+IG, el incremento en LC3-II no estuvo acompañado de una disminución en SQSTM1/p62, lo que sugiere que el flujo autofágico se encuentra comprometido 24 h después de la IG en las ratas que presentaron coma. (Figuras 9A, B). De acuerdo a estas observaciones, en la figura 12C se observa un incremento en la inmunorreactividad de LC3 y de SQSTM1/p62 24 h después a la IG únicamente en los animales que presentaron coma.

Corteza Parietal

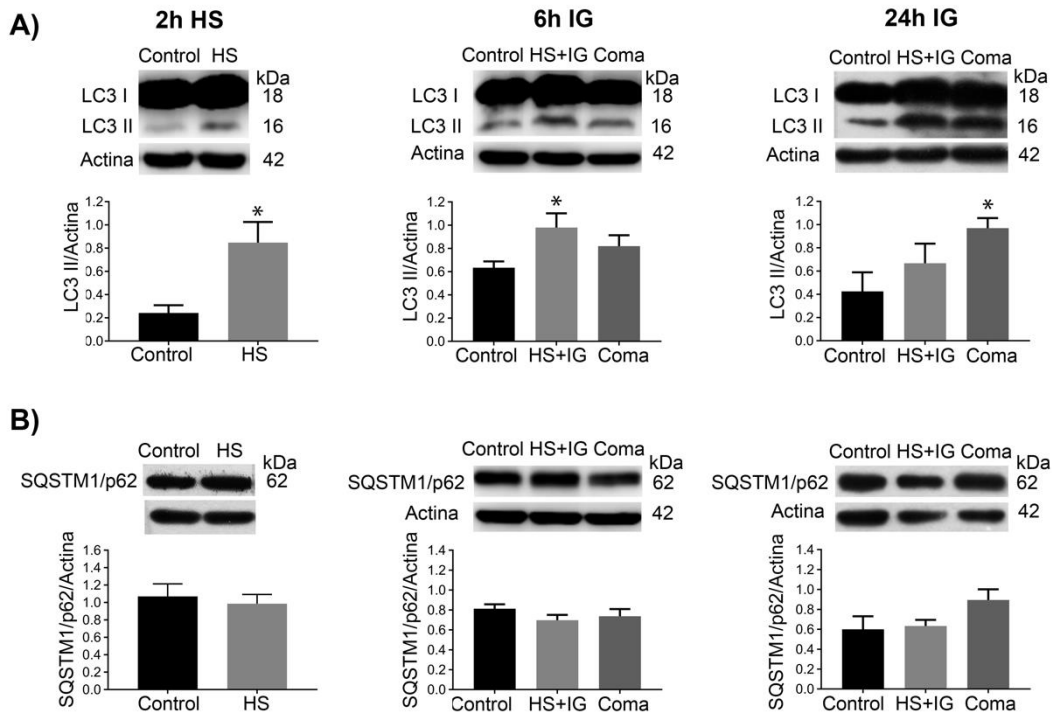


Figura 9. Dinámica de la autofagia inducida por hipoglucemia severa y el coma hipoglucémico en la corteza parietal. Cambios en los niveles de **A)** LC3-II/Actina y **B)** SQSTM1/p62/Actina a las 2 h, 6 h y 24 h después de la infusión de glucosa en presencia y ausencia de coma. Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. Para el grupo de 2 h, se realizó una prueba de t. * $p \leq 0.05$ vs control, $n = 4-6$ para los grupos de 2 y 24 h y $n = 3$ en los grupos de 6 horas.

De forma similar a la corteza parietal, en el hipocampo LC3-II aumentó significativamente 2 h después de la hipoglucemia, mientras que no se encontró algún cambio significativo en SQSTM1/p62 (Figuras 10A, B). En el grupo sometido a HS+IG, no se observaron cambios en LC3-II o en SQSTM1/p62 a las 6 h ni a las 24 h (Figura 10B). Por el contrario, en el grupo con Coma, se encontró un aumento significativo en LC3-II 24 h después de IG, mientras que el contenido de SQSTM1/p62 no se modificó, sugiriendo nuevamente que la degradación autofágica es deficiente. De acuerdo a estos resultados, el análisis de inmunofluorescencia reveló que los cortes de cerebro de animales expuestos a coma hipoglucémico presentaron mayor inmunorreactividad a LC3 y SQSTM1/p62, en el giro dentado 24 h después de la IG Fig. 13 C y 15 C). En conjunto, estos datos sugieren que la presencia del

coma hipoglucémico induce que la degradación autofágica sea deficiente, puesto que únicamente los animales que presentaron coma muestran evidencia de acumulación de autofagosomas a las 24 h, mientras que los del grupo sin coma (HS+IG), parecen restaurar el flujo autofágico basal a este tiempo.

Los cambios en LC3-I también se investigaron a las 2 y 6 h en los grupos con y sin coma y no se encontraron cambios respecto a las ratas control sugiriendo que no hay modificaciones en la abundancia de esta proteína y solo en su transformación a LC3-II (datos no mostrados). Sin embargo a las 24 h hubo un ligero aumento significativo en la banda LC3-I en el hipocampo de ratas que experimentan coma pero no en la corteza (Fig. 11).

Hipocampo

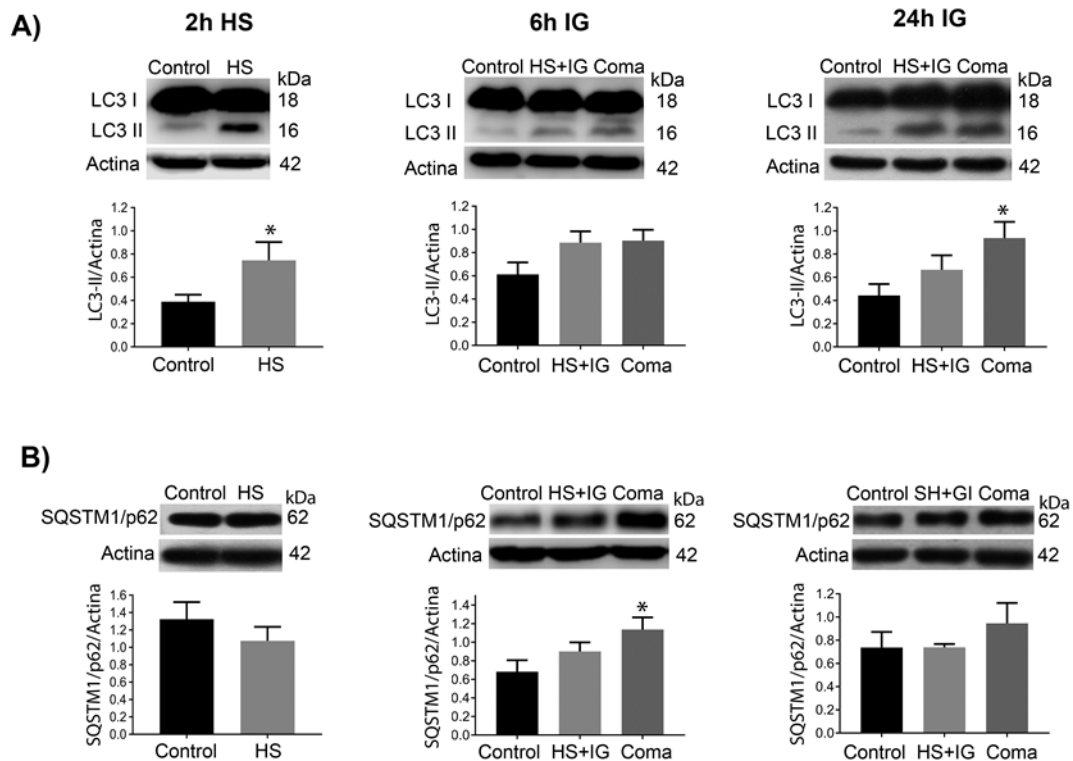


Figura 10. Dinámica de la autofagia inducida por hipoglucemia severa y el coma hipoglucémico en el hipocampo. Cambios en los niveles de **A)** LC3-II/Actina y **B)** SQSTM1/p62/Actina a las 2 h, 6 h y 24 h después de la infusión de glucosa en presencia y ausencia de coma. Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. Para el grupo de 2 h, se realizó una prueba de t. * $p \leq 0.05$ vs control, $n = 4-6$ para los grupos de 2 y 24 h y $n = 3$ en los grupos de 6 horas.

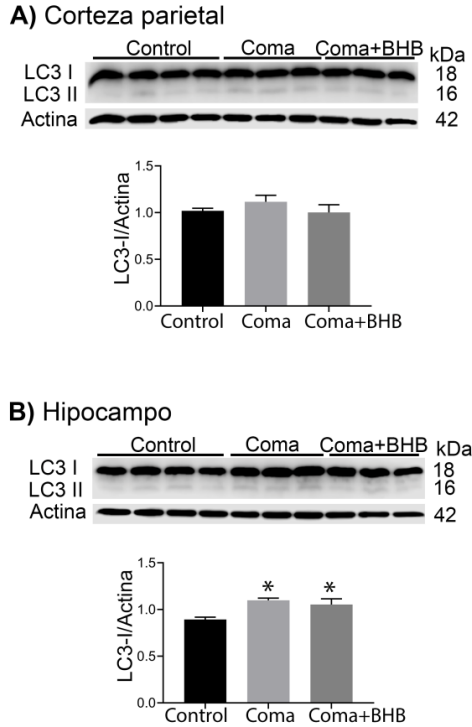


Figura 11. Niveles de LC3-I/actina 24 h después del IG en **A)** Corteza Parietal e **B)** Hipocampo de animales expuestos al coma hipoglucémico, tratados y no tratados con D-BHB (500 mg/kg). Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control. n=4–5 Control, n=5–6 Coma, n=5 Coma+BHB

3. El tratamiento con D-BHB después del coma hipoglucémico estimula el flujo autofágico e incrementa la sobrevivencia celular.

En un estudio previo reportamos que el tratamiento de D-BHB estimula el flujo autofágico y previene la muerte de neuronas corticales expuestas a privación y reintroducción de glucosa *in vitro* (Camberos-Luna et al., 2016). De modo que en este estudio decidimos comprobar si este CC ejerce el mismo efecto en un modelo *in vivo* de hipoglucemia. En este sentido, decidimos utilizar una dosis 250 mg/kg (1M) de D-BHB (Mejía-Toiber and Montiel, 2006), dividida en 2 administraciones de 125 mg/kg en aquellos animales que presentaron coma hipoglucémico y que fueron recuperados con glucosa, estos animales se analizaron a las 6 y 24 h. El tratamiento con D-BHB no tuvo efecto a las 6 h en cuanto a los niveles de LC3-II o SQSTM1/p62 en la corteza o el hipocampo (Figura 12A y 13A). Sin embargo, a las 24 h el tratamiento con D-BHB previno el aumento de LC3-II inducido por coma en ambas regiones del cerebro, mientras que no se encontraron cambios en SQSTM1/p62 (Figuras 12B y 13B). Estos resultados son consistentes con los datos de inmunofluorescencia, que muestran menor inmunorreactividad a LC3 en ratas tratadas con D-BHB en

comparación con las que no recibieron el tratamiento; mientras que la inmunorreactividad a SQSTM1/p62 no se modificó por el tratamiento de 250mg/kg de D-BHB (Figura 12C y 13C).

Debido a que la administración de 250 mg/kg de D-BHB no tuvo efecto sobre SQSTM1/P62, decidimos incrementar la dosis a 500 mg/kg (2M) dividida en dos dosis de 250 mg/kg (Julio-Amilpas et al., 2015). Al duplicar la dosis de D-BHB observamos que la transformación de LC3-I en LC3-II disminuyó significativamente en relación con los animales expuestos al coma tanto en la corteza como en el hipocampo (Figuras 14A y 15A); esta vez, el tratamiento también promovió la disminución significativa de SQSTM1/p62 (Figuras 14B y 16B), lo que sugiere que una dosis mayor de D-BHB estimula el flujo autofágico en ambas regiones. De acuerdo con estos resultados, el análisis de inmunofluorescencia mostró menor inmunorreactividad para LC3 y SQSTM1/p62 en la corteza parietal y el giro dentado de animales tratados con 500 mg/kg de D-BHB (Figuras 14C, 15C). Las imágenes confocales muestran que LC3 y SQSTM1/p62 están presentes tanto en el citoplasma que rodea el núcleo como en las neuritas, en las imágenes ortogonales de las orientaciones x-z y y-z confirman que LC3 y SQSTM1/p62 se encuentran en el citoplasma.

Corteza Parietal

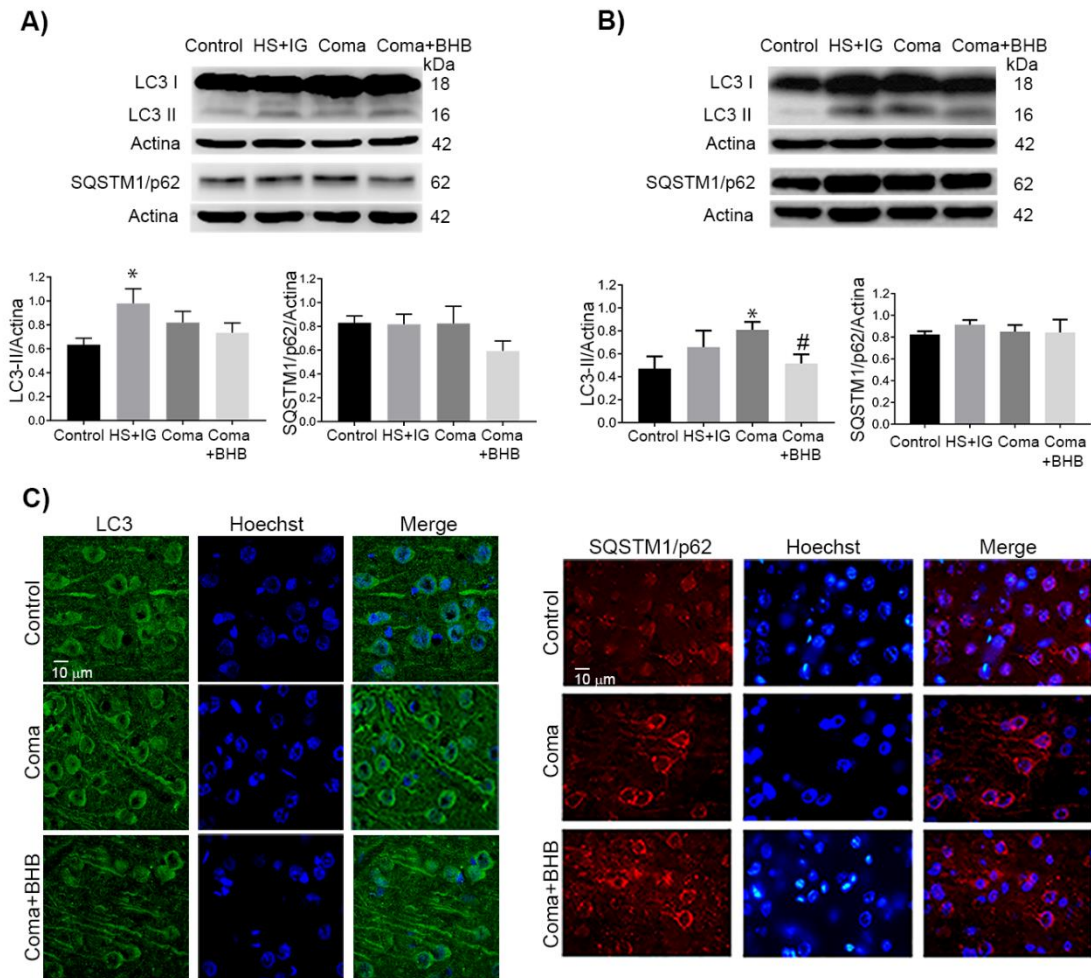


Figura 12. Cambios en LC3 y SQSTM1/p62 en animales expuestos a HS+IG con o sin coma y tratados con 250mg/kg de D-BHB en la Corteza Parietal. **A)** Niveles de LC3-II/actina y SQSTM1/p62 /actina 6 h después de la IG. **B)** Niveles de LC3-II/actina y SQSTM1/p62 /actina 24 h después de la IG. **C)** Inmunofluorescencia para detectar LC3 (panel izquierdo) y SQSTM1/p62 (panel derecho) en la Corteza Parietal de animales tratados y no tratados con 250mg/kg de D-BHB. Las imágenes de LC3 fueron obtenidas por microscopía confocal y las de SQSTM1/p62 por microscopía de epifluorescencia. Cada barra representa la media \pm el error estándar y se analizaron por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control, # $p \leq 0.05$ vs coma. $n=5$ control, $n=4$ HS, $n=5-6$ Coma, $n=5$ Coma+BHB para los animales analizados 24h después de IG y $n=3$ en todos los grupos de los animales estudiados 6h después de la IG.

Hipocampo

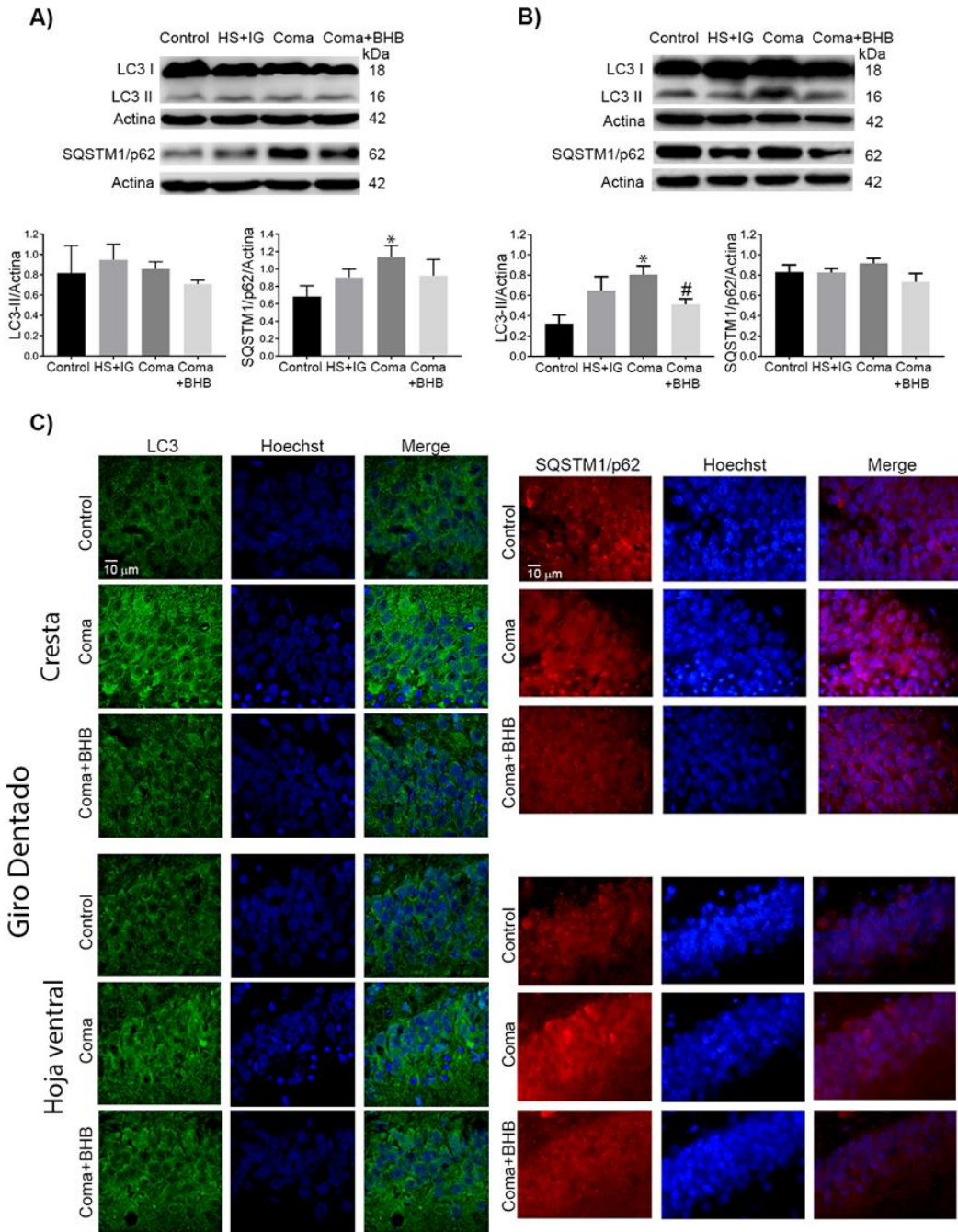


Figura 13. Cambios en LC3 y SQSTM1/p62 en animales expuestos a HS+IG con o sin coma y tratados con 250mg/kg de D-BHB en el hipocampo. **A)** Niveles de LC3-II/actina y SQSTM1/p62 /actina 6 h después de la IG. **B)** Niveles de LC3-II/actina y SQSTM1/p62 /actina 24 h después de la IG. **C)** Inmunofluorescencia para detectar LC3 (panel izquierdo) y SQSTM1/p62 (panel derecho) en la Corteza Parietal de animales tratados y no tratados con 250mg/kg de D-BHB. Las imágenes de LC3 fueron obtenidas por microscopía confocal y las de SQSTM1/p62 por microscopía de epifluorescencia. Cada barra representa la media \pm el error estándar y se analizaron por una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control, # $p \leq 0.05$ vs coma. $n=5$ control, $n=4$ HS, $n=5-6$ Coma, $n=5$ Coma+BHB para los animales analizados 24h después de IG y $n=3$ en todos los grupos de los animales estudiados 6h post IG.

Corteza Parietal

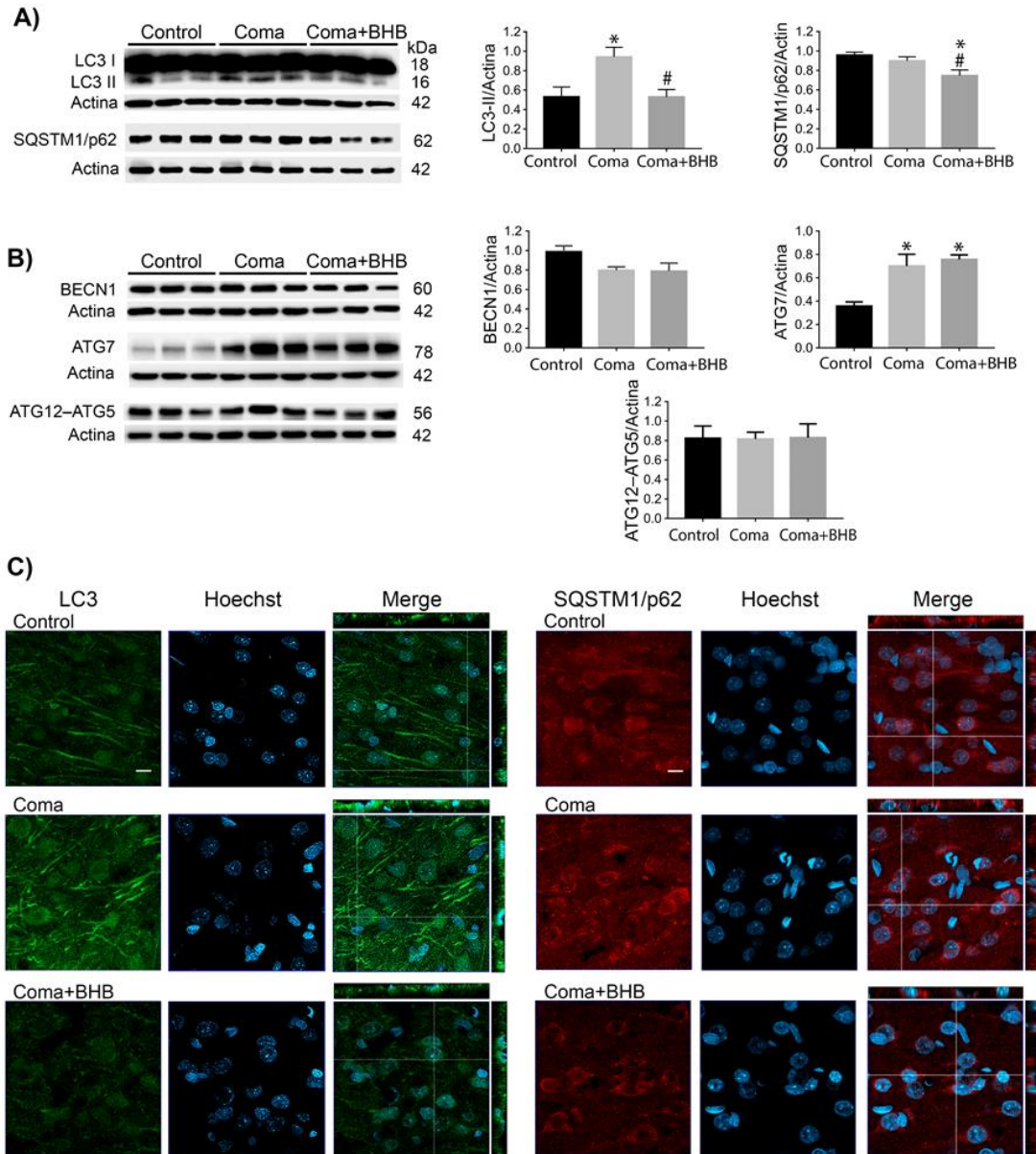


Figura 14. Efecto del D-BHB en las proteínas relacionadas con la autofagia en la corteza parietal 24 h después del coma hipoglucémico. Cambios en **A)** LC3-II/actina y SQSTM1/p62 /actina, **B)** BECN1/actina, ATG7/Actina y ATG12-ATG5/actina. **C)** Imágenes confocales representativas de la inmunorreactividad a LC3 y SQSTM1/p62 en animales tratados y no tratados con 500 mg/kg de D-BHB; se muestran imágenes ortogonales con orientación x-y (arriba) y y-z (derecha). Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control, # $p \leq 0.05$ vs coma. n=4-5 Control, n=5-6 Coma, n=5 Coma+BHB.

Hipocampo

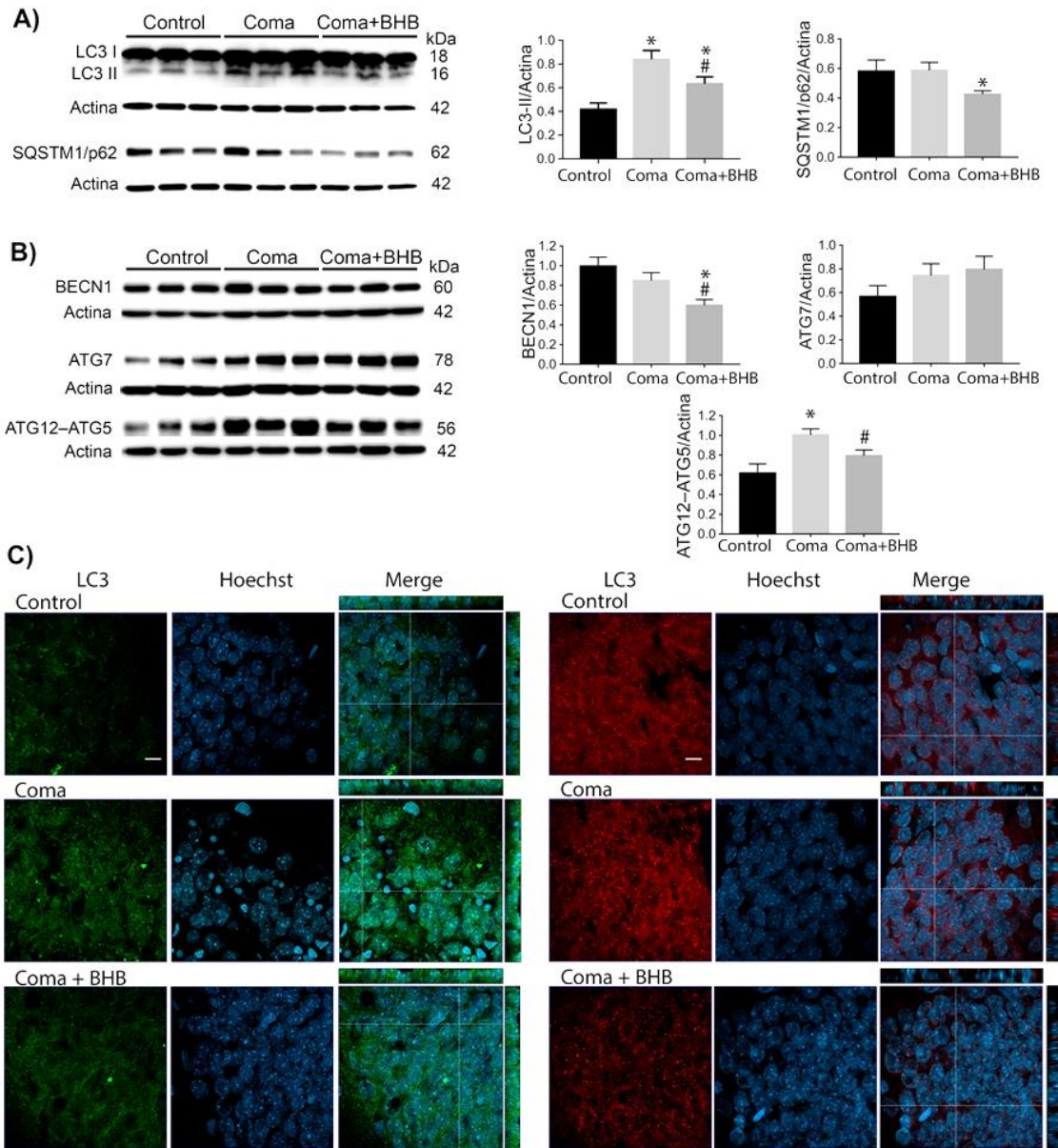


Figura 15. Efecto del D-BHB en las proteínas relacionadas con la autofagia en el hipocampo 24 h después del coma hipoglucémico. Cambios en **A)** LC3-II/actina y SQSTM1/p62 /actina, **B)** BECN1/actina, ATG7/Actina y ATG12-ATG5/actina. **C)** Imágenes confocales representativas de la inmunorreactividad a LC3 y SQSTM1/p62 en animales tratados y no tratados con 500 mg/kg de D-BHB; se muestran imágenes ortogonales con orientación x-y (arriba) y y-z (derecha). Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control, # $p \leq 0.05$ vs coma. n=4-5 Control, n=5-6 Coma, n=5 Coma+BHB.

El tratamiento con D-BHB no afectó la abundancia de LC3-I en la corteza en comparación con los grupos control y Coma y no previno el aumento de LC3-I inducido por el coma en el hipocampo (Figura 11).

En estudios previos demostramos que un periodo corto de coma induce muerte neuronal en la corteza cerebral y en el giro dentado (Languren et al., 2019). En este sentido, decidimos evaluar el efecto de la administración de D-BHB en la sobrevivencia celular a través de tinciones con FJB y violeta de cresilo para evidenciar el daño celular inducido por el coma hipoglucémico. A las 24 h de la infusión de glucosa, se observaron células en proceso degenerativo marcadas con FJB en la corteza parietal, principalmente en las capas superficial y media (II-IV) así como en el hipocampo, especialmente en la cresta y en la hoja ventral del giro dentado (Figura 16A). Las secciones adyacentes teñidas con violeta de cresilo mostraron células encogidas y oscuras con núcleos picnóticos en la misma ubicación donde estaban presentes las células positivas para FJB (Figura 16A). El tratamiento con D-BHB disminuyó el número de células positivas para FJB en ambas regiones cerebrales (Figura 16B). Además, en la corteza parietal, la protección del D-BHB fue dosis dependiente. En este sentido, se observó una reducción del 36% en el número de células marcadas con FJB cuando los animales fueron tratados con la dosis de 250 mg/kg de D-BHB después del coma hipoglucémico, mientras que cuando se administraron 500 mg/kg de D-BHB, el número de células positivas a FJB se redujo en un 87% (Figura 16B). Por consiguiente, las secciones teñidas con violeta de cresilo de animales tratados con D-BHB mostraron células con citoplasma claro y morfológicamente similares a las de los animales control. En el hipocampo, el número de células en degeneración disminuyó un 57% y un 80%, en los animales tratados con 250 o 500 mg/kg de D-BHB, respectivamente, aunque no se encontraron diferencias significativas entre las dos dosis (Figura 16B). Estos resultados demuestran que el D-BHB es capaz de disminuir la neurodegeneración cuando se administra después del coma hipoglucémico y que una dosis total de 500 mg/kg es más eficaz.

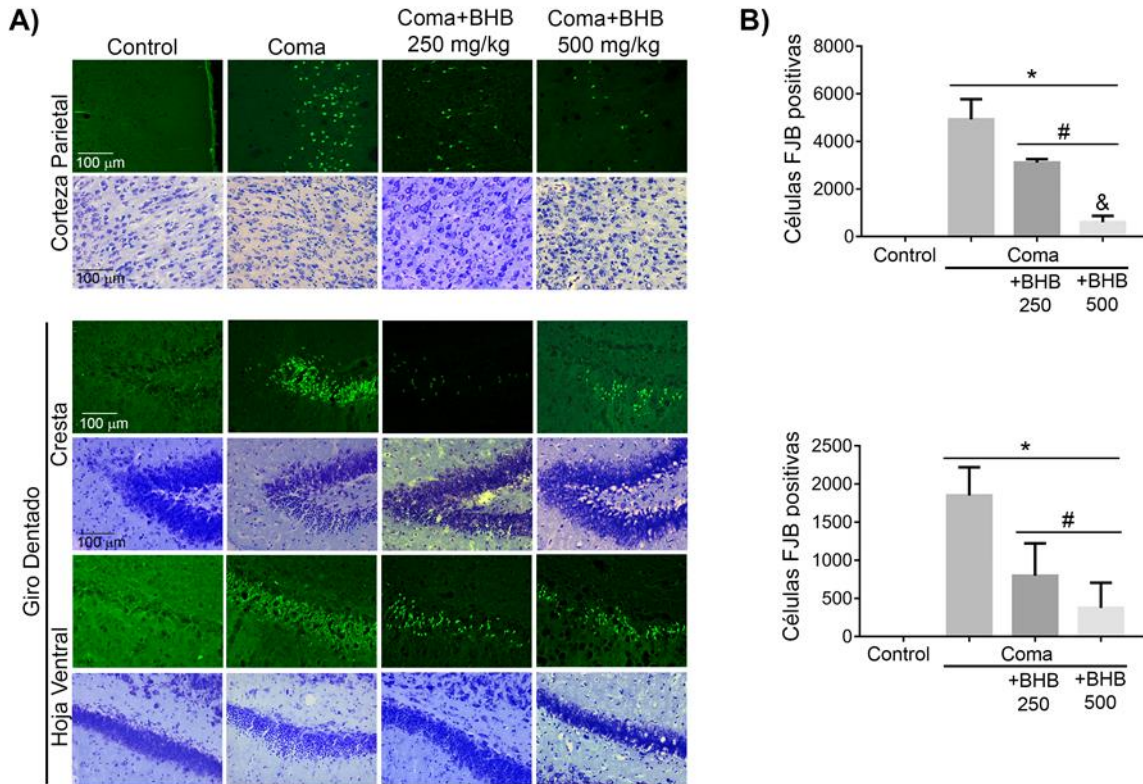


Figura 16. Efecto del tratamiento con D-BHB sobre la sobrevivencia celular en la corteza e hipocampo de ratas expuestas a coma hipoglucémico. **A)** Micrografías representativas de células positivas a FJB y violeta de cresilo en la corteza parietal y el giro dentado **B)** Número de células positivas a FJB en animales control e hipoglucémicos tratados y no tratados con 250 o 500 mg/kg de D-BHB en la Corteza parietal y en el giro dentado del hipocampo. Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control, # $p \leq 0.05$ vs coma, & $p \leq 0.05$ vs 250 mg/kg, $n = 6$ control, $n = 7$ coma, $n = 4$ Coma+BHB.

Los niveles en sangre de D-BHB se determinaron en diferentes momentos en animales control, animales en condiciones de ayuno y animales sometidos a coma tratados y no tratados con D-BHB. Como se esperaba, el ayuno aumento significativamente los niveles sanguíneos de D-BHB a 0.9 ± 0.075 mM en relación a los controles intactos (0.6 ± 0.057 , no mostrado), y estos niveles se mantuvieron durante todo el período experimental, recuperando los valores control 27 h después (0.56 ± 0.13 ; no mostrado). Una hora después de la administración de insulina, cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyeron cerca de 30 mg/dl, el D-BHB disminuyó a 0.5 mM (Figura 8C). Cuando la glucosa disminuyó aún más, por debajo de 20 mg/dl y los animales alcanzaron el estado de coma, la concentración sanguínea de D-BHB aumentó significativamente hasta 1.2 mM y disminuyó poco después del coma a 0.8-0.7

mM (Figura 8C). Es importante notar que hasta este momento, los animales tratados y no tratados con D-BHB mostraron un comportamiento semejante entre ellos, lo que sugiere que tuvieron una respuesta similar a la insulina. Durante la recuperación, 30 min después de que los animales fueron rescatados únicamente con glucosa, el D-BHB disminuyó aún más (0.58 ± 0.059) y sus niveles permanecieron bajos y estadísticamente diferentes al valor obtenido en el periodo del coma, durante todo el período de infusión de glucosa. Por el contrario, en los animales rescatados con glucosa y D-BHB (250mg/kg), los niveles de CC no disminuyeron, sino que aumentaron significativamente a 0.91 ± 0.040 después de 20 min, y descendieron progresivamente hasta 0.7 mM durante el período de infusión de glucosa (Figura 8C). 20 min después de la segunda administración de D-BHB, los niveles sanguíneos aumentaron de nuevo pero disminuyeron rápidamente 30 min más tarde. 24 h después de la infusión de glucosa, los niveles de D-BHB disminuyeron cerca de los valores control en ambos grupos (Figura 8C). En conjunto, estos resultados sugieren que la producción endógena de D-BHB se estimula durante el estado de coma, pero se consume rápidamente durante el IG. En estas condiciones, la administración exógena de 500 mg/kg de D-BHB durante el período de recuperación aumenta significativamente sus niveles en sangre en relación con los animales rescatados solo con glucosa.

4. Iniciación de la autofagia después del coma hipoglucémico

Para conocer si el incremento de LC3-II después del coma hipoglucémico está relacionado con un aumento de la inducción de autofagia, determinamos los cambios en los niveles de las proteínas de iniciación de este proceso celular. En la corteza parietal, no se observaron cambios significativos en BECN1, ni tampoco en los niveles de ATG12-ATG5, lo que sugiere que no hubo un aumento en la activación de la autofagia bajo estas condiciones. No obstante, los niveles de ATG7 incrementaron significativamente (Figura 14B). En el hipocampo tampoco se observaron cambios en BECN1, pero ATG7 mostró tendencia a aumentar y el conjugado ATG12-ATG5 incrementó

significativamente, lo que sugiere que después del coma se promueve la formación de autofagosomas en el hipocampo (Figura 14B). Posteriormente, probamos el efecto de D-BHB en estas mismas proteínas y no observamos cambios en ninguna de ellas en la corteza parietal en comparación con el grupo con Coma (Figura 14B). Por otro lado, pese a que el contenido de ATG7 no fue diferente del grupo con coma, el tratamiento con D-BHB disminuyó significativamente los niveles de BECN1 y ATG12–ATG5 en comparación con el grupo sin tratamiento en el hipocampo (Figura 15B). En este sentido, estos resultados sugieren que D-BHB reprime el inicio de la autofagia en el hipocampo.

5. Papel de la activación de mTOR y AMPK en la iniciación de la autofagia después del coma hipoglucémico.

Se ha demostrado que la activación de AMPK y la inhibición del complejo mTOR conducen al inicio de la autofagia. Por tal motivo, decidimos evaluar los niveles de fosforilación de su proteína blanco ULK1 en la serinas correspondientes a cada cinasa (p-ULK1 S317, fosforilada por AMPK y p-ULK1 S757, por mTOR), así como los niveles totales de ambas proteínas y de p-mTOR en la S2448, como índice de su actividad, 24 h después del coma hipoglucémico. En la corteza parietal, no se encontraron cambios significativos en mTOR total, p-mTOR S2448, ULK1 total y p-ULK1 S757, sugiriendo que la actividad de mTOR no está inhibida en este momento. Del mismo modo, AMPK total no mostró cambios con respecto del control y los niveles de p-ULK1 S317 tendieron a aumentar aunque este cambio no fue significativo (Figuras 17A, B). Así mismo, en el hipocampo tampoco se observaron cambios en mTOR total, p-mTOR S2448 y p-ULK1 S757. Sin embargo, contrario a lo hallado en la corteza parietal, hubo un aumento significativo en ULK1 total, AMPK total y p-ULK1 S317 después del coma (Figuras 18A, B). En general, estos resultados concuerdan con los niveles de las proteínas de iniciación de autofagia y sugieren que a las 24 h del coma se inicia la autofagia principalmente en el hipocampo de manera dependiente de la actividad de AMPK.

Corteza Parietal

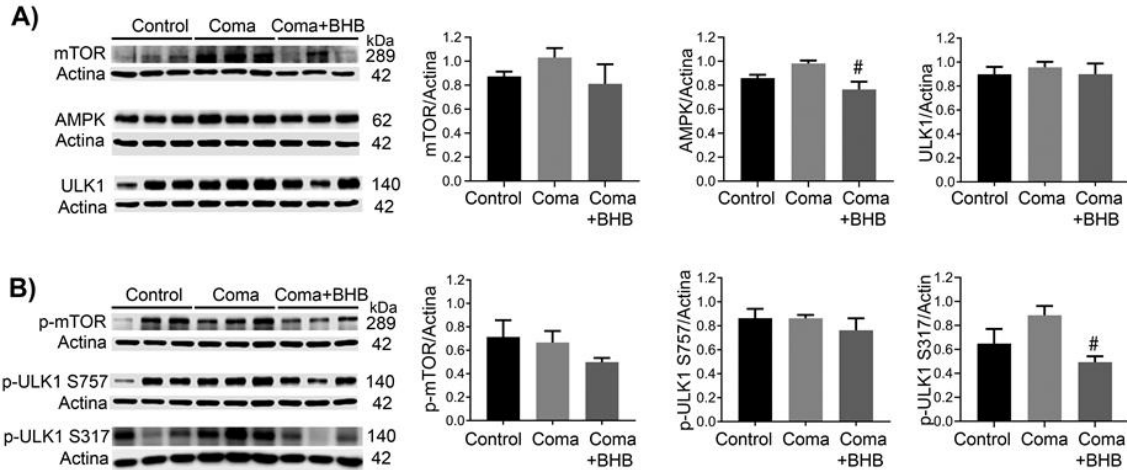


Figura 17. Actividad de mTOR y AMPK en la Corteza parietal de animales tratados y no tratados con D-BHB 24 h después del coma hipoglucémico. **A)** Niveles totales de mTOR, AMPK y ULK1. **B)** Niveles de fosforilación de mTOR S2448, ULK1 S757 y ULK1 S317. Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control. # $p \leq 0.05$ vs coma. $n=4-5$ control, $n=5-6$ coma, $n=4-5$ Coma+BHB.

6. Efecto de D-BHB sobre la actividad de mTOR y AMPK después del coma hipoglucémico.

Para conocer el efecto del tratamiento con D-BHB sobre la actividad de la vía de mTOR y AMPK, se analizó el efecto de la dosis de 500 mg/kg sobre la fosforilación de mTOR y ULK1. No se encontraron cambios en p-mTOR S2448 y p-ULK1 S757 ni en la corteza ni en el hipocampo de los animales tratados con D-BHB en comparación con el grupo con Coma (Figuras 17B y 18B). Por otra parte, el tratamiento con D-BHB disminuyó AMPK total y previno el aumento de p-ULK1 S317 inducido por el coma hipoglucémico en ambas regiones cerebrales, lo que sugiere que en ratas tratadas con D-BHB, la AMPK está menos activa (Figuras 17A, B y 18A, B). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con D-BHB atenúa la inducción de la autofagia.

Hipocampo

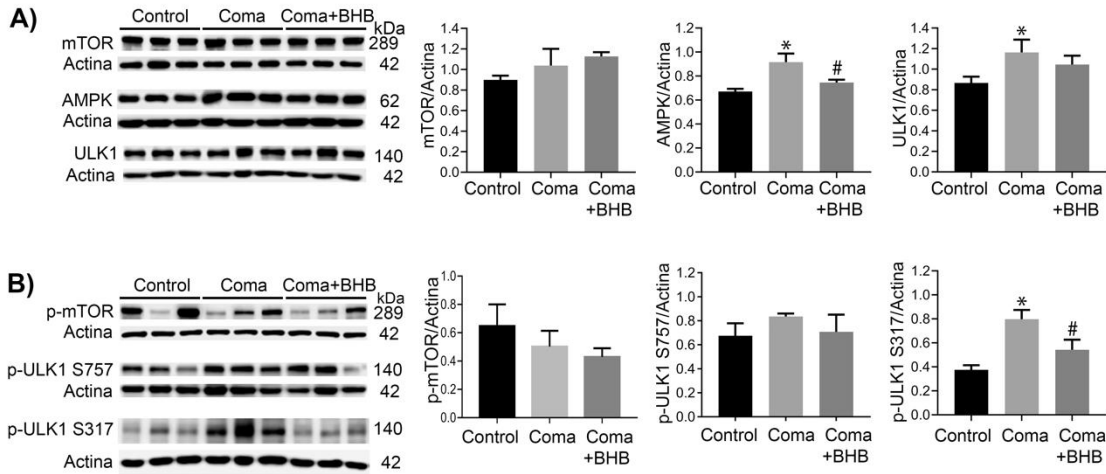


Figura 18. Actividad de mTOR y AMPK en el Hipocampo de animales tratados y no tratados con D-BHB 24 h después del coma hipoglucémico. **A)** Niveles totales de mTOR, AMPK y ULK1. **B)** Niveles de fosforilación de mTOR S2448, ULK1 S757 y ULK1 S317. Las barras representan la media \pm el error estándar y se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Fisher. * $p \leq 0.05$ vs control. # $p \leq 0.05$ vs coma. $n=4-5$ control, $n=5-6$ coma, $n=4-5$ Coma+BHB.

DISCUSIÓN

Uno de los rasgos característicos de la autofagia es su regulación dinámica, ya que durante condiciones fisiológicas, la actividad autofágica suele ser baja, pero puede regularse en respuesta a diferentes estímulos; el inductor de autofagia mayormente conocido es la ausencia de nutrientes, durante la cual, las células activan la autofagia para restaurar la homeostasis celular (Mizushima et al., 2010). Sin embargo, cuando la deficiencia energética es muy severa como ocurre durante la isquemia, la hipoxia y el trauma cerebral, puede inducirse muerte neuronal resultante de una actividad autofágica deficiente (Carlioni et al., 2008; Sarkar et al., 2014) o excesiva (Shi et al., 2012). Por el contrario, se ha reportado que durante condiciones de hipoxia moderada y durante el preconditionamiento isquémico, la autofagia se activa como medida de protección mediante la eliminación de organelos y proteínas dañados (Sheng et al., 2012; Sun et al., 2018b). Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la privación de glucosa en cultivos de neuronas corticales activa la autofagia como respuesta de sobrevivencia; no obstante, durante la reintroducción de glucosa se vuelve deficiente debido a una disfunción

lisosomal mediada por calpaína contribuyendo a la muerte neuronal (Geronimo-Olvera et al., 2017).

Hasta ahora, la dinámica de la autofagia en un modelo *in vivo* de hipoglucemia severa no había sido descrita. Utilizando un modelo de hipoglucemia ya sea en presencia o ausencia de coma en ratas, observamos que la autofagia se regula de forma diferencial en la corteza y en el hipocampo. Nuestros resultados sugieren por primera vez que los autofagosomas se acumulan en estas regiones durante el período de HS en comparación con los animales control, probablemente como resultado de una deficiente degradación autofágica. Seis horas después de haber infundido glucosa a los animales con HS, se observó un notable aumento en la formación de autofagosomas en relación a los animales control, sin embargo, este incremento fue relevante únicamente en la corteza parietal y se mantuvo de forma transitoria, pues regresó a valores control a las 24 h, sugiriendo la restauración de los niveles basales de autofagia. Por el contrario, los animales que estuvieron expuestos al coma mostraron un incremento no significativo en LC3-II a las 6 h post IG en relación con los valores control, pero a las 24 h, los niveles de LC3-II incrementaron aún más cobrando significancia a diferencia del grupo que solamente experimentó HS; por lo que podemos deducir que la autofagia no recupera valores basales cuando las ratas presentan coma hipoglucémico. Además, no se observó que los niveles de SQSTM1/p62 se encontraran disminuidos, por el contrario, tienden a incrementarse después del coma hipoglucémico, sugiriendo que la acumulación de autofagosomas es resultado de un flujo autofágico deficiente. Es importante destacar que la ausencia de cambio en SQSTM1/p62 o incluso su aumento no necesariamente reflejan que la autofagia sea deficiente, ya que sus niveles pueden mantenerse constantes a causa de su recambio o aumentar debido a la estimulación de la transcripción de esta proteína en condiciones de ausencia de nutrientes, como sucede durante la HS (Sahani et al., 2014). Por otro lado, la abundancia de LC3-I aumentó significativamente en el hipocampo pero no en la corteza, lo que sugiere el aumento en la transcripción de esta proteína después de IG o bien,

fallas en su degradación posiblemente debido a una actividad proteosomal alterada (Gao et al., 2010), aunque se requieren más experimentos para identificar el mecanismo involucrado.

La diferencia en la dinámica de la autofagia entre los animales que presentaron un evento de coma y los que solo tuvieron HS, podría relacionarse con la duración y la intensidad del déficit energético (Geronimo-Olvera and Massieu, 2019). Estudios pioneros revelaron que los niveles de fosfocreatina y ATP no se modifican durante la hipoglucemia sin coma, mientras que el coma desencadena un severo desequilibrio del estado energético que eventualmente conduce al agotamiento de la energía (Ferrendelli and Chang, 1973; Lewis et al., 1974), y por consiguiente afecta el correcto funcionamiento de la autofagia que requiere de ATP para reclutar el cargo y para mantener la acidez lisosomal (Moruno et al., 2012).

Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la IG posterior a la HS sin coma aumenta la producción de ERO y los niveles de 3-nitrotirosina, mientras que la muerte neuronal se limita a unas pocas células dispersas en la corteza cerebral (Haces et al., 2010; Amador-Alvarado et al., 2014; Julio-Amilpas et al., 2015). Por el contrario, existen reportes que demuestran que la IG después del coma exacerba el estrés oxidante y la muerte neuronal en la corteza y el hipocampo (Suh et al., 2003; Suh et al., 2007b). Por lo tanto, es probable que durante la HS en ausencia de coma la autofagia se active de manera transitoria como una respuesta asociada a la eliminación de componentes celulares dañados y entonces restablecer la homeostasis celular previniendo la muerte neuronal; mientras que la acumulación excesiva de moléculas dañadas oxidativamente después del coma exacerba la formación de autofagosomas e interrumpe el flujo autofágico.

Aunado a la deficiente degradación de autofagosomas observada a las 24 h en el hipocampo, los resultados sugieren que la autofagia está activa en los animales que fueron sometidos al coma. Dicha activación es dependiente de AMPK e independiente de mTOR, puesto que se encontró un aumento

significativo de p-ULK1 S317 en relación con los animales control. Mientras que tanto los niveles de p-ULK1 S757 como los de p-mTOR mantuvieron el mismo comportamiento que los del grupo control. Además los niveles de ATG7 mostraron tendencia a aumentar mientras que el conjugado ATG12-ATG5 incremento de manera significativa con respecto del grupo control sugiriendo que la autofagia se encuentra activa en el hipocampo 24 h después del coma, ya que estas proteínas son esenciales para la formación y elongación del autofagosoma. Por otro lado, en la corteza, la iniciación de la autofagia en respuesta al coma hipoglucémico no fue tan evidente. Se encontró un aumento significativo de ATG7 pero no fue así para el conjugado ATG12-ATG5, aunque se observó cierta tendencia al aumento de los niveles de p-ULK1 S317. Las diferencias observadas en la activación de la autofagia en la corteza y el hipocampo, podrían estar relacionadas con la alta demanda energética de este último, debido a su papel en la plasticidad sináptica y a su alta vulnerabilidad ante la lesión hipoglucémica (Auer et al., 1984).

Hasta el momento, no conocemos cuales son los mecanismos que conducen a la activación de AMPK en respuesta al coma hipoglucémico. Sin embargo, se han reportado vías de activación de esta enzima en condiciones similares a las que nosotros reportamos. Por ejemplo, la estimulación de la calcio-calmodulina cinasa β (CAMKK β) en respuesta al aumento de calcio intracelular podría estar involucrada, ya que se ha reportado que la homeostasis del calcio se pierde durante la privación energética aguda (Zundorf and Reiser, 2011; Sun et al., 2016a). Asimismo, la cinasa hepática B1 (LKB1), que fosforila y activa directamente a AMPK, también podría estar implicada en la iniciación de la autofagia, puesto que en condiciones de isquemia cerebral los niveles de fosforilación de esta proteína aumentan (Li et al., 2007). Además, la actividad de AMPK también puede ser estimulada por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, pues tanto la CAMKK β como la LKB1 pueden ser activadas por óxido nítrico y peroxinitrito, respectivamente (Cardaci et al., 2012; Li et al., 2013; Xia et al., 2018).

Se sabe que durante condiciones en que la glucosa es limitada, el cerebro puede utilizar otros sustratos energéticos para cubrir sus necesidades metabólicas, entre los que se encuentran los CC. La evidencia que respalda el efecto protector de la administración exógena de CC o de la inducción de cetosis contra la lesión cerebral aguda, es cada vez es mayor (Camberos-Luna and Massieu, 2020). Previamente demostramos que el tratamiento vía i.p. de D-BHB durante la hipoglucemia previene la producción de ERO tanto en la corteza como en el hipocampo y disminuye la muerte neuronal (Julio-Amilpas et al., 2015). En este trabajo, nos propusimos investigar si la administración de D-BHB post-coma es capaz de disminuir el daño neuronal e inducir el flujo autofágico, como se observó previamente en cultivos de neuronas corticales (Camberos-Luna et al., 2016). De acuerdo a los resultados, la dosis total de 250 mg/kg de D-BHB previno el aumento de LC3-II pero no fue capaz de estimular la degradación de SQSTM1/p62. No obstante, al duplicar la dosis de D-BHB, los niveles de LC3-II y SQSTM1/p62, disminuyeron significativamente en la corteza parietal y el hipocampo, sugiriendo que la dosis de 500 mg/kg promueve la degradación del cargo autofágico. Estos datos además coinciden con un menor número de células positivas a FJB, sugiriendo así que al menos una parte del efecto protector del D-BHB, se asocia al restablecimiento del flujo autofágico como reportamos en los experimentos *in vitro* y recientemente en el modelo de excitotoxicidad por NMDA (Camberos-Luna et al., 2016; Montiel et al., 2020). Es importante destacar que los resultados también muestran que el tratamiento con D-BHB atenúa la formación de autofagosomas en el hipocampo en etapas tardías posteriores a la IG, lo que respalda la idea de que la autofagia disfuncional y/o excesiva contribuye a la muerte neuronal.

La disminución de LC3-II y SQSTM1/p62 en los animales tratados con D-BHB, también pueden ser resultado de una menor activación de autofagia. De acuerdo a nuestros resultados, la administración de D-BHB no modificó los niveles de BECN1, ATG7 ni del conjugado ATG12-ATG5 en la corteza parietal, por lo que inferimos que el principal efecto del D-BHB en esta región es la inducción del flujo autofágico. No obstante, en el hipocampo, el tratamiento con

D-BHB previene la fosforilación de ULK1 en la serina 317 por AMPK, sugiriendo una menor actividad de esta enzima. Nuestros resultados concuerdan con hallazgos recientes en el estriado tras la inducción de excitotoxicidad por NMDA, en donde la administración exógena de D-BHB es capaz de disminuir la formación de nuevos autofagosomas (Montiel et al., 2020). Probablemente, la administración de D-BHB mejore el estado metabólico celular por su efecto sobre la función mitocondrial, su capacidad para incrementar los niveles de ATP y disminuir los niveles de ERO reduciendo así la actividad de la AMPK (Maalouf et al., 2007; Julio-Amilpas et al., 2015; Marosi et al., 2016)

De acuerdo a la determinación de los niveles de D-BHB en sangre, el ayuno induce una cetosis ligera, dado que los niveles sanguíneos de D-BHB aumentan a alrededor de 0.9 mM; mismos que disminuyeron rápidamente después de la administración de insulina, sugiriendo que se consumen por el cerebro durante la hipoglucemia. También observamos que cuando los animales alcanzan el estado de coma hipoglucémico, la producción endógena de CC se estimula de manera importante, pero disminuye poco tiempo después. Hasta este punto, es importante resaltar que los niveles de CC de los animales pertenecientes a ambos grupos (tratado y no tratado), se comportaron de manera similar durante el periodo de hipoglucemia previo a la recuperación con glucosa, lo que indica que ambos presentaron una reacción a la insulina semejante; no obstante, aún faltan estudios para determinar si la respuesta diferencial a la insulina es un factor importante para la sobrevivencia neuronal y la autofagia.

De acuerdo a los datos encontrados, la administración exógena de D-BHB inmediatamente después del coma, incrementó sus niveles cerca de los valores reportados en condiciones de ayuno. No obstante, la concentración de D-BHB disminuyó 30 minutos después de su primera y segunda administración, lo que sugiere la utilización de éste CC durante el periodo de recuperación. En concordancia, Julio-Amilpas en el 2015, demostró que la administración de D-

BHB durante la fase de hipoglucemia previa a la presencia del coma, incrementa sus niveles a valores cercanos a los reportados en condiciones de ayuno, proporcionando al cerebro un sustrato energético alternativo a la glucosa.

La posible contribución a la supervivencia neuronal de la producción endógena de D-BHB, observada cuando los animales alcanzan el coma, no puede pasarse por alto. Es probable que bajo nuestras condiciones experimentales se relacione a la limitada muerte neuronal asociada con un breve periodo de coma (Haces et al., 2010; Languren et al., 2019), en comparación con períodos más largos (30-60 min), en los que la muerte neuronal es extensa y se distribuye a lo largo de la corteza cerebral y todo el hipocampo (Auer et al., 1984; Suh et al., 2007b). Sin embargo, nuestros datos demuestran también que la suplementación con D-BHB exógeno durante la IG se asocia con una mayor supervivencia neuronal, ya que los cerebros de estos animales muestran un número menor de células FJB positivas de forma dosis-dependiente. El efecto protector de la administración exógena de CC en contra del daño neuronal ha sido demostrado en diversos modelos *in vivo* (Suzuki et al., 2001; Suzuki et al., 2002; Hacec et al., 2008; Julio-Amilpas et al., 2015; Montiel et al., 2020), en este trabajo se identificó un mecanismo más asociado al efecto protector de los CC, la regulación de la autofagia.

Los protocolos de protección que utilizan la inducción de cetosis endógena como la dieta cetogénica o la suplementación con triglicéridos de cadena media, se basan en la regulación positiva de los transportadores de monocarboxilatos para favorecer la oxidación de CC en el cerebro. Por el contrario, la administración exógena de CC o de sus derivados, incrementa su concentración en sangre rápidamente, pero requiere una administración repetida o continua para mantener elevados esos niveles (Camberos-Luna and Massieu, 2020). Sin embargo, aún queda por determinar si realmente existe la regulación positiva de los MCT durante nuestras condiciones experimentales, lo cual facilitaría la captura de CC en el cerebro, como se describe ante situaciones de isquemia y trauma cerebral (Tseng et al., 2003; Prins et al.,

2004; Zhang et al., 2005; Prins and Giza, 2006; Prins, 2008; Moreira et al., 2009) y recientemente después de la hipoglucemia severa en ratas hembra (Uddin et al., 2020).

Los datos obtenidos en esta investigación abren las puertas para el uso del D-BHB como tratamiento para disminuir el daño neuronal ocasionado por la privación de glucosa al cerebro, como sucede en la isquemia cerebral o en pacientes con hipoglucemia no diabética; probablemente también sea un buen candidato para disminuir el daño generado por la hipoglucemia severa secundaria al tratamiento con insulina, sin embargo, aún falta conocer el impacto de la administración exógena de los cuerpos cetónicos en pacientes diabéticos por su propensión a desarrollar cetoacidosis. Por otra parte, se ha estudiado mucho el daño neuronal ocasionado durante la isquemia cerebral y en modelos *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa, este trabajo nos permite conocer que ocurre cuando no hay uno de esos 2 componentes y analizarlos de manera independiente en un modelo in vivo.

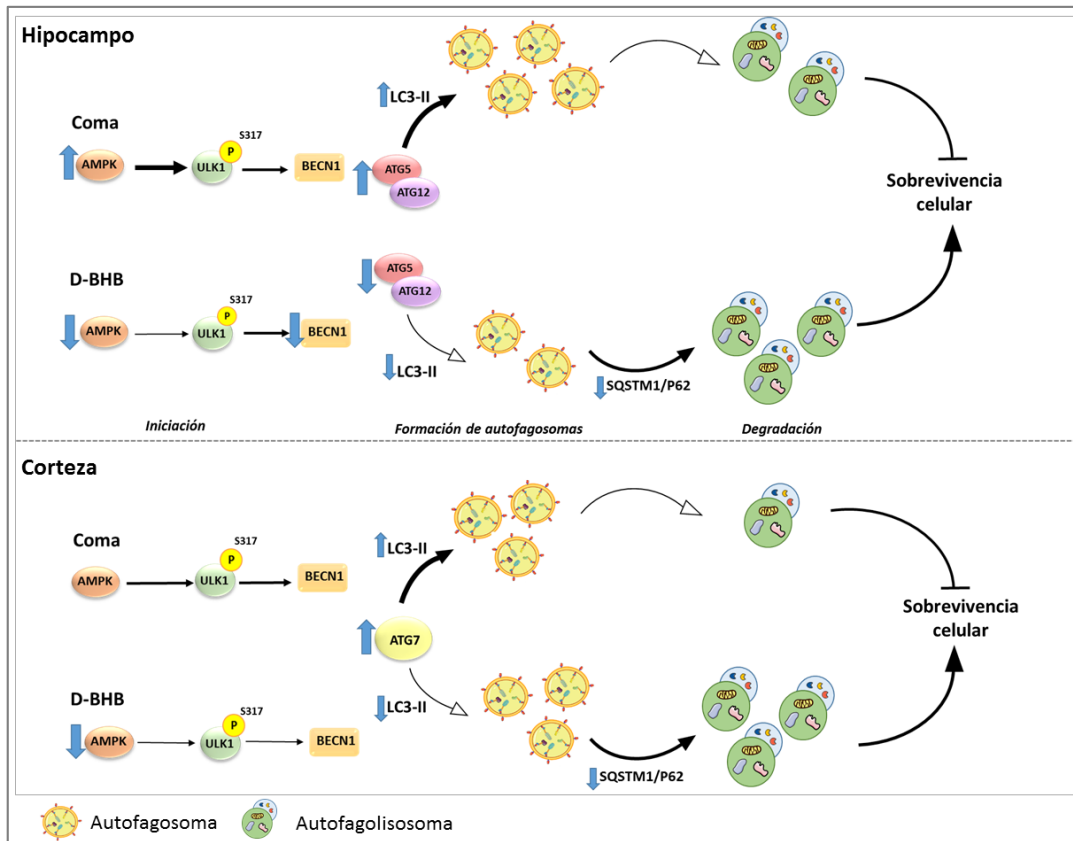


Figura 18. Efecto del coma hipoglucémico y del tratamiento con BHB sobre la autofagia en la corteza y el hipocampo. Ante la presencia del coma hipoglucémico la dinámica de la autofagia se modificó de manera diferencial en el hipocampo y en la corteza. En el hipocampo la autofagia está activa en los animales expuestos al coma hipoglucémico, dicha actividad es dependiente de AMPK, puesto que incrementaron los niveles de esta proteína incrementando también la fosforilación de su proteína blanco ULK1 en la S317. Además incrementaron los niveles de ATG5-ATG12 y de LC3-II, sugiriendo mayor formación de nuevos autofagosomas. Sin embargo, al no disminuir los niveles de SQSTM1/p62, es probable que los autofagosomas se estén acumulando debido a la disminución del flujo autofágico conduciendo a la muerte neuronal. Por otro lado, en la corteza la activación de la autofagia fue menos evidente; a diferencia del hipocampo no se modificaron los niveles de las proteínas de inducción de la autofagia, sin embargo los niveles de ATG7 incrementaron significativamente al igual que LC3-II, sugiriendo la formación de nuevos autofagosomas, los cuales, al igual que en el hipocampo no fueron degradados de manera eficiente puesto que los niveles de SQSTM1/p62 no disminuyeron conduciendo a la muerte neuronal. El tratamiento con D-BHB promovió la degradación autofágica, puesto que en ambas regiones tanto los niveles de LC3-II como los de SQSTM1/p62 disminuyeron con respecto a los animales sin tratamiento. Sin embargo en el hipocampo se observa que además el D-BHB tiene efecto sobre la formación de nuevos autofagosomas, pues disminuyen los niveles de AMPK, p-ULK1 S317, del conjugado ATG5-ATG12 y de BECN1. Probablemente, en la corteza parietal el D-BHB ejerció un efecto similar en la iniciación de la autofagia, pero más discreto, puesto que solamente disminuyeron los niveles de AMPK y p-ULK1 S317.

CONCLUSIÓN

El presente estudio advierte por primera vez, que la autofagia puede seguir dinámicas distintas durante la recuperación con glucosa en animales que experimentan HS o coma hipoglucémico, además de que puede activarse diferencialmente en la corteza y el hipocampo en respuesta a la falla energética. En el hipocampo la autofagia continúa estando activa aún a las 24 h después de la IG. Así mismo, el tratamiento con D-BHB se asocia con la estimulación del flujo autofágico tanto en la corteza como en el hipocampo, pero además en esta última región, es capaz de atenuar la inducción de la autofagia. De esta forma, la regulación de la autofagia se suma a los mecanismos de neuroprotección del D-BHB en condiciones de ausencia de nutrientes. Nuestros resultados aportan nueva información sobre las respuestas adaptativas cerebrales ante la hipoglucemia severa y sobre el papel del D-BHB como sustrato energético alternativo a glucosa en la modulación de estas respuestas.

PERSPECTIVAS

- Determinar el curso temporal de la vía de señalización que induce autofagia en condiciones de HS y de HS+coma y analizar el efecto del BHB sobre esta vía de señalización.
- Determinar si la HS y la HS+coma, así como el tratamiento con BHB producen cambios en la expresión de genes relacionados con la autofagia.
- Determinar si la autofagia que observamos en nuestras condiciones ocurre en astrocitos o en neuronas.
- Analizar si la disrupción del flujo autofágico que ocurre después del coma hipoglucémico se debe a alteraciones en la integridad y función lisosomal.
- Definir el efecto del tratamiento con D-BHB sobre la autofagia en condiciones control

- Determinar si se modifica la expresión de los MCT en respuesta al coma hipoglucémico.

REFERENCIAS

- Amador-Alvarado, L., Montiel, T., and Massieu, L. (2014). Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metab Brain Dis* 29(3), 711-719. doi: 10.1007/s11011-014-9508-5.
- Amaral, A.I. (2013). Effects of hypoglycaemia on neuronal metabolism in the adult brain: role of alternative substrates to glucose. *J Inherit Metab Dis* 36(4), 621-634. doi: 10.1007/s10545-012-9553-3.
- Amaral, A.I., Teixeira, A.P., Sonnewald, U., and Alves, P.M. (2011). Estimation of intracellular fluxes in cerebellar neurons after hypoglycemia: importance of the pyruvate recycling pathway and glutamine oxidation. *J Neurosci Res* 89(5), 700-710. doi: 10.1002/jnr.22571.
- Auer, R.N. (2004). Hypoglycemic brain damage. *Metab Brain Dis* 19(3-4), 169-175. doi: 10.1023/b:mebr.0000043967.78763.5b.
- Auer, R.N., Wieloch, T., Olsson, Y., and Siesjo, B.K. (1984). The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 64(3), 177-191.
- Ballesteros, J.R., Mishra, O.P., and McGowan, J.E. (2003). Alterations in cerebral mitochondria during acute hypoglycemia. *Biol Neonate* 84(2), 159-163. doi: 10.1159/000071951.
- Bansal, N., and Weinstock, R.S. (2000). "Non-Diabetic Hypoglycemia," in *Endotext*, eds. K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, H.J. Hofland, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J.E. Morley, M. New, J. Purnell, F. Singer, C.A. Stratakis, D.L. Trence & D.P. Wilson. (South Dartmouth (MA)).
- Barborka, C.J. (1928). Ketogenic diet treatment of epilepsy in adults. *JAMA* 91(2):73-78.
- Belanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14(6), 724-738. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
- Beltrán, A., Acuña, I., Miró, P., and Castro, A. (2012). Brain Energy Metabolism in Health and Disease. *Neuroscience - Dealing With Frontiers*. doi: 10.5772/36092.
- Bhardwaj, S.K., Sharma, M.L., Gulati, G., Chhabra, A., Kaushik, R., Sharma, P., et al. (1998). Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Mol Chem Neuropathol* 34(2-3), 157-168. doi: 10.1007/BF02815077.
- Bough, K.J., Wetherington, J., Hassel, B., Pare, J.F., Gawryluk, J.W., Greene, J.G., et al. (2006). Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol* 60(2), 223-235. doi: 10.1002/ana.20899.
- Bree, A.J., Puente, E.C., Daphna-Iken, D., and Fisher, S.J. (2009). Diabetes increases brain damage caused by severe hypoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(1), E194-201. doi: 10.1152/ajpendo.91041.2008.
- Browning, D.J., and Lee, C. (2014). Relative sensitivity and specificity of 10-2 visual fields, multifocal electroretinography, and spectral domain optical coherence tomography in detecting hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy. *Clin Ophthalmol* 8, 1389-1399. doi: 10.2147/OPHT.S66527.

- Camberos-Luna, L., Geronimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., and Massieu, L. (2016). The Ketone Body, beta-Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons. *Neurochem Res* 41(3), 600-609. doi: 10.1007/s11064-015-1700-4.
- Camberos-Luna, L., and Massieu, L. (2020). Therapeutic strategies for ketosis induction and their potential efficacy for the treatment of acute brain injury and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 133, 104614. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104614.
- Canis, M., Maurer, M.H., Kuschinsky, W., Duembgen, L., and Duelli, R. (2009). Increased densities of monocarboxylate transporter MCT1 after chronic hyperglycemia in rat brain. *Brain Res* 1257, 32-39. doi: 10.1016/j.brainres.2008.12.005.
- Cardaci, S., Filomeni, G., and Ciriolo, M.R. (2012). Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *J Cell Sci* 125(Pt 9), 2115-2125. doi: 10.1242/jcs.095216.
- Cardellá, R., and Hernández, F. (2002). *Bioquímica médica. Tomo III*. La Habana, Cuba.: Editorial Ciencias Médicas.
- Carloni, S., Buonocore, G., and Balduini, W. (2008). Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 32(3), 329-339. doi: 10.1016/j.nbd.2008.07.022.
- Cryer, P.E. (2005). Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure and its component syndromes in diabetes. *Diabetes* 54(12), 3592-3601. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3592.
- Cryer, P.E. (2007). Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J Clin Invest* 117(4), 868-870. doi: 10.1172/JCI31669.
- Cryer, P.E., Axelrod, L., Grossman, A.B., Heller, S.R., Montori, V.M., Seaquist, E.R., et al. (2009). Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 94(3), 709-728. doi: 10.1210/jc.2008-1410.
- Deng, Z., Purtell, K., Lachance, V., Wold, M.S., Chen, S., and Yue, Z. (2017). Autophagy Receptors and Neurodegenerative Diseases. *Trends Cell Biol* 27(7), 491-504. doi: 10.1016/j.tcb.2017.01.001.
- DiNuzzo, M., Maraviglia, B., and Giove, F. (2011). Why does the brain (not) have glycogen? *Bioessays* 33(5), 319-326. doi: 10.1002/bies.201000151.
- Fan, J., Zhang, Z., Chao, X., Gu, J., Cai, W., Zhou, W., et al. (2014). Ischemic preconditioning enhances autophagy but suppresses autophagic cell death in rat spinal neurons following ischemia-reperfusion. *Brain Res* 1562, 76-86. doi: 10.1016/j.brainres.2014.03.019.
- Ferrand-Drake, M., Friberg, H., and Wieloch, T. (1999). Mitochondrial permeability transition induced DNA-fragmentation in the rat hippocampus following hypoglycemia. *Neuroscience* 90(4), 1325-1338. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00559-4.
- Ferrand-Drake, M., Zhu, C., Gido, G., Hansen, A.J., Karlsson, J.O., Bahr, B.A., et al. (2003). Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem* 85(6), 1431-1442. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01794.x.
- Ferrendelli, J.A., and Chang, M.M. (1973). Brain metabolism during hypoglycemia. Effect of insulin on regional central nervous system glucose and energy reserves in mice. *Arch Neurol* 28(3), 173-177. doi: 10.1001/archneur.1973.00490210053006.

- Frade, J.M., and Ovejero-Benito, M.C. (2015). Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle* 14(5), 712-720. doi: 10.1080/15384101.2015.1004937.
- Freeman, J.M., and Vining, E.P. (1999). Seizures decrease rapidly after fasting: preliminary studies of the ketogenic diet. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153(9), 946-949. doi: 10.1001/archpedi.153.9.946.
- Gao, C., Wang, C., Liu, B., Wu, H., Yang, Q., Jin, J., et al. (2014). Intermittent hypoxia preconditioning-induced epileptic tolerance by upregulation of monocarboxylate transporter 4 expression in rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 39(11), 2160-2169. doi: 10.1007/s11064-014-1411-2.
- Gao, Z., Gammoh, N., Wong, P.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Jiang, X. (2010). Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome. *Autophagy* 6(1), 126-137. doi: 10.4161/auto.6.1.10928.
- Garcia de la Cadena, S., and Massieu, L. (2016). Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. *Apoptosis* 21(7), 763-777. doi: 10.1007/s10495-016-1247-0.
- Gerhart, D.Z., Enerson, B.E., Zhdankina, O.Y., Leino, R.L., and Drewes, L.R. (1998). Expression of the monocarboxylate transporter MCT2 by rat brain glia. *Glia* 22(3), 272-281.
- Geronimo-Olvera, C., and Massieu, L. (2019). Autophagy as a Homeostatic Mechanism in Response to Stress Conditions in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol* 56(9), 6594-6608. doi: 10.1007/s12035-019-1546-x.
- Geronimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., Castro-Obregon, S., and Massieu, L. (2017). Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis* 8(6), e2911. doi: 10.1038/cddis.2017.299.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., and Matías-Guiu, J. (2015). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología* 30(2), 119-129. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>.
- Guzman, M., and Blazquez, C. (2004). Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(3), 287-292. doi: 10.1016/j.plefa.2003.05.001.
- Haces, M.L., Hernandez-Fonseca, K., Medina-Campos, O.N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., and Massieu, L. (2008). Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211(1), 85-96. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.12.029.
- Haces, M.L., Montiel, T., and Massieu, L. (2010). Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165(1), 28-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.003.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095), 885-889. doi: 10.1038/nature04724.
- Hashim, S.A., and VanItallie, T.N. (2014). Ketone Body therapy: from the ketogenic diet to the oral administration of ketone ester. *Journal of Lipid Research* 55(9), 1818-1826.
- Hernandez-Fonseca, K., Cardenas-Rodriguez, N., Pedraza-Chaverri, J., and Massieu, L. (2008). Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86(8), 1768-1780. doi: 10.1002/jnr.21634.

- Hernandez-Fonseca, K., and Massieu, L. (2005). Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 82(2), 196-205. doi: 10.1002/jnr.20631.
- Heuser, J. (1989). Changes in Lysosome Shape and Distribution Correlated with Changes in Cytoplasmic pH *The Journal of Cell Biology* 108, 855-864.
- Hong, S., Ahn, J.Y., Cho, G.S., Kim, I.H., Cho, J.H., Ahn, J.H., et al. (2015). Monocarboxylate transporter 4 plays a significant role in the neuroprotective mechanism of ischemic preconditioning in transient cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 10(10), 1604-1611. doi: 10.4103/1673-5374.167757.
- Jackson, D.A., Michael, T., Vieira de Abreu, A., Agrawal, R., Bortolato, M., and Fisher, S.J. (2018). Prevention of Severe Hypoglycemia-Induced Brain Damage and Cognitive Impairment With Verapamil. *Diabetes* 67(10), 2107-2112. doi: 10.2337/db18-0008.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic* 9, 574-587. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x.
- Jang, B.G., Choi, B.Y., Kim, J.H., Kim, M.J., Sohn, M., and Suh, S.W. (2013). Impairment of autophagic flux promotes glucose reperfusion-induced neuro2A cell death after glucose deprivation. *PLoS One* 8(10), e76466. doi: 10.1371/journal.pone.0076466.
- Jensen, N.J., Wodschow, H.Z., Nilsson, M., and Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 21(22). doi: 10.3390/ijms21228767.
- Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, E., Geronimo-Olvera, C., and 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. *J Cereb Blood Flow Metab* 35(5), 851-860. doi: 10.1038/jcbfm.2015.1.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18(4), 571-580. doi: 10.1038/cdd.2010.191.
- Kasischke, K.A. (2009). Activity-Dependent Metabolism in Glia and Neurons. *Elsevier*.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462(2), 245-253. doi: 10.1016/j.abb.2007.03.034.
- Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy* 17(1), 1-382. doi: 10.1080/15548627.2020.1797280.
- Koehler-Stec, E.M., Li, K., Maher, F., Vannucci, S.J., Smith, C.B., and Simpson, I.A. (2000). Cerebral glucose utilization and glucose transporter expression: response to water deprivation and restoration. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(1), 192-200. doi: 10.1097/00004647-200001000-00024.
- Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch* 472(9), 1299-1343. doi: 10.1007/s00424-020-02441-x.
- Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., et al. (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172(2), 454-469. doi: 10.2353/ajpath.2008.070876.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095), 880-884. doi: 10.1038/nature04723.

- Languren, G., Montiel, T., Julio-Amilpas, A., and Massieu, L. (2013). Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int* 63(4), 331-343. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.018.
- Languren, G., Montiel, T., Ramirez-Lugo, L., Balderas, I., Sanchez-Chavez, G., Sotres-Bayon, F., et al. (2019). Recurrent moderate hypoglycemia exacerbates oxidative damage and neuronal death leading to cognitive dysfunction after the hypoglycemic coma. *J Cereb Blood Flow Metab*, 271678X17733640. doi: 10.1177/0271678X17733640.
- Lee, K.M., Hwang, S.K., and Lee, J.A. (2013). Neuronal autophagy and neurodevelopmental disorders. *Exp Neurol* 22(3), 133-142. doi: 10.5607/en.2013.22.3.133.
- Leino, R.L., Gerhart, D.Z., and Drewes, L.R. (1999). Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study. *Brain Res Dev Brain Res* 113(1-2), 47-54. doi: 10.1016/s0165-3806(98)00188-6.
- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115(10), 2679-2688. doi: 10.1172/JCI26390.
- Lewis, L.D., Ljunggren, B., Ratcheson, R.A., and Siesjo, B.K. (1974). Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia, related to blood glucose and to EEG. *J Neurochem* 23(4), 673-679. doi: 10.1111/j.1471-4159.1974.tb04390.x.
- Li, J., Zeng, Z., Viollet, B., Ronnett, G.V., and McCullough, L.D. (2007). Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke* 38(11), 2992-2999. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.490904.
- Li, L., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal* 25(1), 50-65. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.020.
- Liang, C.C., Wang, C., Peng, X., Gan, B., and Guan, J.L. (2010). Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J Biol Chem* 285(5), 3499-3509. doi: 10.1074/jbc.M109.072389.
- Lin, A.L., Zhang, W., Gao, X., and Watts, L. (2015). Caloric restriction increases ketone bodies metabolism and preserves blood flow in aging brain. *Neurobiol Aging* 36(7), 2296-2303. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.012.
- Liu, Y., and Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* 22(3), 367-376. doi: 10.1038/cdd.2014.143.
- Maalouf, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y., and Rho, J.M. (2007). Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145(1), 256-264. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.11.065.
- Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86(4), 883-901. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035.
- Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2018). "Brain Energy Metabolism," in *Neuroscience in the 21st Century*, eds. D.W. Pfaff & V.D. Nora. Springer New York), 1591-1620.
- Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (1999). Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1387), 1155-1163. doi: 10.1098/rstb.1999.0471.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18(6), 716-731. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.09.003.
- Marosi, K., Kim, S.W., Moehl, K., Scheibye-Knudsen, M., Cheng, A., Cutler, R., et al. (2016). 3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 139(5), 769-781. doi: 10.1111/jnc.13868.

- Marty, N., Dallaporta, M., and Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 22, 241-251. doi: 10.1152/physiol.00010.2007.
- McKenna, M.C., Gruetter, R., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., and Schousboe, A. (2006). "Energy Metabolism of the brain," in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, eds. G.J. Siegel, R.W. Albers, S.T. Brady & D.L. Price. Elsevier Academic), 537.
- Mejía-Toiber, J., and Montiel, T. (2006). D-b-Hydroxybutyrate Prevents Glutamate-Mediated Lipoperoxidation and Neuronal Damage Elicited during Glycolysis Inhibition In Vivo. *Neurochemical Research* 31, 1399–1408. doi: 10.1007/s11064-006-9189-5.
- Melø, T.M., Nehlig, A., and Sonnewald, U. (2006). Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem Int* 48(6-7), 498-507. doi: 10.1016/j.neuint.2005.12.037.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36(10), 587-597. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
- Miranda-Goncalves, V., Granja, S., Martinho, O., Honavar, M., Pojo, M., Costa, B.M., et al. (2016). Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. *Oncotarget* 7(29), 46335-46353. doi: 10.18632/oncotarget.10114.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21(22), 2861-2873. doi: 10.1101/gad.1599207.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182), 1069-1075. doi: 10.1038/nature06639.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140(3), 313-326. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028.
- Montiel, T., Montes-Ortega, L.A., Flores-Yanez, S., and Massieu, L. (2020). Treatment with the Ketone Body D-beta-hydroxybutyrate Attenuates Autophagy Activated by NMDA and Reduces Excitotoxic Neuronal Damage in the Rat Striatum in Vivo. *Curr Pharm Des*. doi: 10.2174/1381612826666200115103646.
- Moreira, T.J., Pierre, K., Maekawa, F., Repond, C., Cebere, A., Liljequist, S., et al. (2009). Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(7), 1273-1283. doi: 10.1038/jcbfm.2009.50.
- Morris, A.A. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis* 28(2), 109-121. doi: 10.1007/s10545-005-5518-0.
- Moruno, F., Perez-Jimenez, E., and Knecht, E. (2012). Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells* 1(3), 372-395. doi: 10.3390/cells1030372.
- Mouw, G., Zechel, J.L., Gamboa, J., Lust, W.D., Selman, W.R., and Ratcheson, R.A. (2003). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 14(2), 183-186. doi: 10.1097/00001756-200302100-00004.
- Nehlig, A. (2004). Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(3), 265-275. doi: 10.1016/j.plefa.2003.07.006.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., and Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.

- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833(12), 3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
- Nimgampalle, M., Chakravarthy, H., and V., D. (2020). "Glucose metabolism in the brain: An update," in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Elsevier).
- Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T., and Kataoka, K. (1995). A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 20(6), 737-743. doi: 10.1007/BF01705543.
- Paramo, B., Hernandez-Fonseca, K., Estrada-Sanchez, A.M., Jimenez, N., Hernandez-Cruz, A., and Massieu, L. (2010). Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167(4), 1057-1069. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.074.
- Paramo, B., Montiel, T., Hernandez-Espinosa, D.R., Rivera-Martinez, M., Moran, J., and Massieu, L. (2013). Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int J Biochem Cell Biol* 45(11), 2596-2604. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.013.
- Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22), 10625-10629. doi: 10.1073/pnas.91.22.10625.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Martin, J.L., and Magistretti, P.J. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7), 3990-3995. doi: 10.1073/pnas.95.7.3990.
- Peng, L.A., Schousboe, A., and Hertz, L. (1991). Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res* 16(1), 29-34. doi: 10.1007/BF00965824.
- Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94(1), 1-14. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x.
- Prins, M.L. (2008). Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(1), 1-16. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600543.
- Prins, M.L., and Giza, C.C. (2006). Induction of monocarboxylate transporter 2 expression and ketone transport following traumatic brain injury in juvenile and adult rats. *Dev Neurosci* 28(4-5), 447-456. doi: 10.1159/000094170.
- Prins, M.L., Lee, S.M., Fujima, L.S., and Hovda, D.A. (2004). Increased cerebral uptake and oxidation of exogenous betaHB improves ATP following traumatic brain injury in adult rats. *J Neurochem* 90(3), 666-672. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02542.x.
- Rao, R., Ennis, K., Long, J.D., Ugurbil, K., Gruetter, R., and Tkac, I. (2010). Neurochemical changes in the developing rat hippocampus during prolonged hypoglycemia. *J Neurochem* 114(3), 728-738. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06797.x.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90(4), 1383-1435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009.
- Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L., and Siciliano, G. (2009). Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *J Biol Phys* 35(4), 317-336. doi: 10.1007/s10867-009-9157-9.

- Robinson, A.M., and Williamson, D.H. (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60(1), 143-187. doi: 10.1152/physrev.1980.60.1.143.
- Rubinsztein, D.C., Shpilka, T., and Elazar, Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 22(1), R29-34. doi: 10.1016/j.cub.2011.11.034.
- Ryskalin, L., Lazzeri, G., Flaibani, M., Biagioni, F., Gambardella, S., Frati, A., et al. (2017). mTOR-Dependent Cell Proliferation in the Brain. *Biomed Res Int* 2017, 7082696. doi: 10.1155/2017/7082696.
- Sahani, M.H., Itakura, E., and Mizushima, N. (2014). Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *autophagy* 10:3, 431-441. doi: 10.4161/auto.27344.
- Sandberg, M., Butcher, S.P., and Hagberg, H. (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47(1), 178-184. doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb02847.x.
- Sarkar, C., Zhao, Z., Aungst, S., Sabirzhanov, B., Faden, A.I., and Lipinski, M.M. (2014). Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy* 10(12), 2208-2222. doi: 10.4161/15548627.2014.981787.
- Sheng, R., Liu, X.Q., Zhang, L.S., Gao, B., Han, R., Wu, Y.Q., et al. (2012). Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy* 8(3), 310-325. doi: 10.4161/auto.18673.
- Shi, R., Weng, J., Zhao, L., Li, X.M., Gao, T.M., and Kong, J. (2012). Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci Ther* 18(3), 250-260. doi: 10.1111/j.1755-5949.2012.00295.x.
- Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., et al. (2013). Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339(6116), 211-214. doi: 10.1126/science.1227166.
- Simpson, I.A., Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(11), 1766-1791. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600521.
- Siracusa, R., Fusco, R., and Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol* 10, 1114. doi: 10.3389/fphar.2019.01114.
- Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcaniz, J.V., Ros, S., Fernandez-Sanchez, M.E., Garcia-Fojeda, B., Criado Garcia, O., et al. (2008). Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum Mol Genet* 17(5), 667-678. doi: 10.1093/hmg/ddm339.
- Sprague, J.E., and Arbelaez, A.M. (2011). Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia. *Pediatr Endocrinol Rev* 9(1), 463-473; quiz 474-465.
- Stafstrom, C.E., and Rho, J.M. (2012). The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol* 3: 59.
- Suh, S.W., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., et al. (2003). Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 23(33), 10681-10690.
- Suh, S.W., Aoyama, K., Matsumori, Y., Liu, J., and Swanson, R.A. (2005). Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes* 54(5), 1452-1458. doi: 10.2337/diabetes.54.5.1452.

- Suh, S.W., Bergher, J.P., Anderson, C.M., Treadway, J.L., Fosgerau, K., and Swanson, R.A. (2007a). Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther* 321(1), 45-50. doi: 10.1124/jpet.106.115550.
- Suh, S.W., Gum, E.T., Hamby, A.M., Chan, P.H., and Swanson, R.A. (2007b). Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117(4), 910-918. doi: 10.1172/JCI30077.
- Suh, S.W., Hamby, A.M., Gum, E.T., Shin, B.S., Won, S.J., Sheline, C.T., et al. (2008). Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(10), 1697-1706. doi: 10.1038/jcbfm.2008.61.
- Suh, S.W., Hamby, A.M., and Swanson, R.A. (2007c). Hypoglycemia, brain energetics, and hypoglycemic neuronal death. *Glia* 55(12), 1280-1286. doi: 10.1002/glia.20440.
- Sun, F., Xu, X., Wang, X., and Zhang, B. (2016a). Regulation of autophagy by Ca(2). *Tumour Biol*. doi: 10.1007/s13277-016-5353-y.
- Sun, G.Z., Gao, F.F., Zhao, Z.M., Sun, H., Xu, W., Wu, L.W., et al. (2016b). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the penumbra aggravates secondary damage in rats with traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 11(8), 1260-1266. doi: 10.4103/1673-5374.189190.
- Sun, L., Zhao, M., Liu, M., Su, P., Zhang, J., Li, Y., et al. (2018a). Suppression of FoxO3a attenuates neurobehavioral deficits after traumatic brain injury through inhibiting neuronal autophagy. *Behav Brain Res* 337, 271-279. doi: 10.1016/j.bbr.2017.08.042.
- Sun, Y., Zhu, Y., Zhong, X., Chen, X., Wang, J., and Ying, G. (2018b). Crosstalk Between Autophagy and Cerebral Ischemia. *Front Neurosci* 12, 1022. doi: 10.3389/fnins.2018.01022.
- Sutherland, G.R., Tyson, R.L., and Auer, R.N. (2008). Truncation of the krebs cycle during hypoglycemic coma. *Med Chem* 4(4), 379-385. doi: 10.2174/157340608784872235.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Kitamura, Y., Mori, S., Sato, K., Dohi, S., et al. (2002). Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn J Pharmacol* 89(1), 36-43.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A., et al. (2001). Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 87(2), 143-150. doi: 10.1254/jjp.87.143.
- Takahashi, S., Iizumi, T., Mashima, K., Abe, T., and Suzuki, N. (2014). Roles and regulation of ketogenesis in cultured astroglia and neurons under hypoxia and hypoglycemia. *ASN Neuro* 6(5). doi: 10.1177/1759091414550997.
- Takimoto, M., Takeyama, M., and Hamada, T. (2013). Possible involvement of AMPK in acute exercise-induced expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 mRNA in fast-twitch skeletal muscle. *Metabolism* 62(11), 1633-1640. doi: 10.1016/j.metabol.2013.06.010.
- Tseng, M.T., Chan, S.A., and Schurr, A. (2003). Ischemia-induced changes in monocarboxylate transporter 1 reactive cells in rat hippocampus. *Neurol Res* 25(1), 83-86. doi: 10.1179/016164103101200978.
- Uchiyama, Y., Koike, M., and Shibata, M. (2008). Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy* 4(4), 404-408. doi: 10.4161/auto.5598.

- Uddin, M.M., Ibrahim, M.M.H., Aryal, D., and Briski, K.P. (2020). Sex-dimorphic moderate hypoglycemia preconditioning effects on Hippocampal CA1 neuron bio-energetic and anti-oxidant function. *Mol Cell Biochem*. doi: 10.1007/s11010-020-03806-7.
- Vannucci, S.J., Maher, F., and Simpson, I.A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21(1), 2-21. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199709)21:1<2::aid-glia2>3.0.co;2-c.
- Vannucci, S.J., and Simpson, I.A. (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(5), E1127-1134. doi: 10.1152/ajpendo.00187.2003.
- Veech, R.L. (2004). The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(3), 309-319. doi: 10.1016/j.plefa.2003.09.007.
- Wen, Y.D., Sheng, R., Zhang, L.S., Han, R., Zhang, X., Zhang, X.D., et al. (2008). Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 4(6), 762-769. doi: 10.4161/auto.6412.
- Wheless, J.W. (2008). History of the ketogenic diet. *Epilepsia* 49 Suppl 8, 3-5. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01821.x.
- White, H., and Venkatesh, B. (2011). Clinical review: ketones and brain injury. *Crit Care* 15(2), 219. doi: 10.1186/cc10020.
- Wieloch, T., Engelsen, B., Westerberg, E., and Auer, R. (1985). Lesions of the glutamatergic cortico-striatal projections in the rat ameliorate hypoglycemic brain damage in the striatum. *Neurosci Lett* 58(1), 25-30. doi: 10.1016/0304-3940(85)90323-4.
- Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P., and Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 22(1), 43-61. doi: 10.1038/cr.2011.152.
- Xia, G., Zhu, T., Li, X., Jin, Y., Zhou, J., and Xiao, J. (2018). ROS-mediated autophagy through the AMPK signaling pathway protects INS1 cells from human islet amyloid polypeptide-induced cytotoxicity. *Mol Med Rep* 18(3), 2744-2752. doi: 10.3892/mmr.2018.9248.
- Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., et al. (2016). Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine beta-Hydroxybutyrylation. *Mol Cell* 62(2), 194-206. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.036.
- Yan, W., Zhang, H., Bai, X., Lu, Y., Dong, H., and Xiong, L. (2011). Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1402, 109-121. doi: 10.1016/j.brainres.2011.05.049.
- Yan, W.J., Dong, H.L., and Xiong, L.Z. (2013). The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 34(5), 636-643. doi: 10.1038/aps.2013.18.
- Yim, W.W., and Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov* 6, 6. doi: 10.1038/s41421-020-0141-7.
- Yin, J., Han, P., Tang, Z., Liu, Q., and Shi, J. (2015). Sirtuin 3 mediates neuroprotection of ketones against ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 35(11), 1783-1789. doi: 10.1038/jcbfm.2015.123.
- Yin, Z., Pascual, C., and Klionsky, D.J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell* 3(12), 588-596. doi: 10.15698/mic2016.12.546.

- Youm, Y.H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., et al. (2015). The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med* 21(3), 263-269. doi: 10.1038/nm.3804.
- Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S.A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *AUTOPHAGY* 14 (2), 207–215. doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.
- Zachari, M., and Ganley, I.G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem* 61(6), 585-596. doi: 10.1042/EBC20170021.
- Zhang, F., Vannucci, S.J., Philp, N.J., and Simpson, I.A. (2005). Monocarboxylate transporter expression in the spontaneous hypertensive rat: effect of stroke. *J Neurosci Res* 79(1-2), 139-145. doi: 10.1002/jnr.20312.
- Zhao, Y.G., and Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *Journal of Cell Biology* 218(3), 757–770. doi: 10.1083/jcb.2018.
- Zundorf, G., and Reiser, G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14(7), 1275-1288. doi: 10.1089/ars.2010.3359.

ANEXO –Artículo Publicado-

Referencia: Torres-Esquivel, C., Montiel, T., Flores-Mendez, M., and Massieu, L. (2020). Effect of beta-Hydroxybutyrate on Autophagy Dynamics During Severe Hypoglycemia and the Hypoglycemic Coma. *Front Cell Neurosci* 14, 547215. doi: 10.3389/fncel.2020.547215.



Effect of β -Hydroxybutyrate on Autophagy Dynamics During Severe Hypoglycemia and the Hypoglycemic Coma

Carmen Torres-Esquivel, Teresa Montiel, Marco Flores-Méndez[†] and Lourdes Massieu*

Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

João M. N. Duarte,
Lund University, Sweden

Reviewed by:

Patricia Fernanda Schuck,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

Karin Borges,
The University of Queensland,
Australia

*Correspondence:

Lourdes Massieu
lmassieu@ifc.unam.mx

[†]Present address:

Marco Flores-Méndez,
Perelman Center for Cellular and
Molecular Therapeutics,
Children's Hospital of Philadelphia,
Philadelphia, PA, United States

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Neuropathology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 30 March 2020

Accepted: 31 August 2020

Published: 23 September 2020

Citation:

Torres-Esquivel C, Montiel T,
Flores-Méndez M and Massieu L
(2020) Effect of β -Hydroxybutyrate
on Autophagy Dynamics During
Severe Hypoglycemia and the
Hypoglycemic Coma.
Front. Cell. Neurosci. 14:547215.
doi: 10.3389/fncel.2020.547215

Glucose supply from blood is mandatory for brain functioning and its interruption during acute hypoglycemia or cerebral ischemia leads to brain injury. Alternative substrates to glucose such as the ketone bodies (KB), acetoacetate (AcAc), and β -hydroxybutyrate (BHB), can be used as energy fuels in the brain during hypoglycemia and prevent neuronal death, but the mechanisms involved are still not well understood. During glucose deprivation adaptive cell responses can be activated such as autophagy, a lysosomal-dependent degradation process, to support cell survival. However, impaired or excessive autophagy can lead to cell dysfunction. We have previously shown that impaired autophagy contributes to neuronal death induced by glucose deprivation in cortical neurons and that D isomer of BHB (D-BHB) reestablishes the autophagic flux increasing viability. Here, we aimed to investigate autophagy dynamics in the brain of rats subjected to severe hypoglycemia (SH) without glucose infusion (GI), severe hypoglycemia followed by GI (SH + GI), and a brief period of hypoglycemic coma followed by GI (Coma). The effect of D-BHB administration after the coma was also tested (Coma + BHB). The transformation of LC3-I to LC3-II and the abundance of autophagy proteins, Beclin 1 (BECN1), ATG7, and ATG12-ATG5 conjugate, were analyzed as an index of autophagosome formation, and the levels of sequestrosome1/p62 (SQSTM1/p62) were determined as a hallmark of autophagic degradation. Data suggest that autophagosomes accumulate in the cortex and the hippocampus of rats after SH, likely due to impaired autophagic degradation. In the cortex, autophagosome accumulation persisted at 6 h after GI in animals exposed to SH but recovered basal levels at 24 h, while in the hippocampus no significant effect was observed. In animals subjected to coma, autophagosome accumulation was observed at 24 h after GI in both regions. D-BHB treatment reduced LC3-II and SQSTM1/p62 content and reduced ULK1 phosphorylation by AMPK, suggesting it stimulates the autophagic flux and decreases AMPK activity

reducing autophagy initiation. D-BHB also reduced the number of degenerating cells. Together, data suggest different autophagy dynamics after GI in rats subjected to SH or the hypoglycemic coma and support that D-BHB treatment can modulate autophagy dynamics favoring the autophagic flux.

Keywords: hypoglycemia, ketone bodies, neuronal death, autophagy, AMPK

INTRODUCTION

The brain is a highly dynamic and energy-demanding organ that depends on the continuous glucose supply from blood, thereby disturbed glucose metabolism can lead to brain dysfunction and even brain injury (Mergenthaler et al., 2013). Reduced cerebral glucose delivery occurs during hypoglycemia, a condition considered as a major complication of insulin treatment in type 1 diabetes mellitus (DMT1) patients (Cryer, 2005). Patients can suffer two events of moderate hypoglycemia (60–40 mg/dl blood glucose) per week and one of severe hypoglycemia (SH, >35 mg/dl) per year. The presence of repeated episodes of moderate hypoglycemia increases the risk for SH, which can culminate in the state of coma resulting in irreversible brain damage in vulnerable brain regions, such as the cortex and hippocampus (Auer et al., 1984). Under conditions of limited glucose availability, such as ischemia, hypoxia, hypoglycemia, and cerebral trauma, alternative energy substrates to glucose, such as the ketone bodies (KB), acetoacetate (AcAc), and β -hydroxybutyrate (BHB), can be used by the brain (Melø et al., 2006) and prevent brain injury (Suzuki et al., 2002; Masuda et al., 2005; Puchowicz et al., 2008; Haces et al., 2008; Julio-Amilpas et al., 2015). KB are metabolized through the tricarboxylic acid cycle (TCA) and their protective effect has been attributed to enhanced cellular energy metabolism, improved mitochondrial activity, and decreased production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS; Maalouf et al., 2007; Marosi et al., 2016). Other actions have been described for KB including epigenetic, antioxidant, anti-inflammatory, and the up-regulation of brain-derived neurotrophic factor; they activate ATP-sensitive potassium channels and have been described as signaling molecules (Newman and Verdin, 2014; Camberos-Luna and Massieu, 2020). In addition, we have recently reported that the D isomer of BHB (D-BHB) stimulates the autophagic flux during glucose deprivation and prevents neuronal death in cortical cultures (Camberos-Luna et al., 2016).

Macro-autophagy (here referred to as autophagy) can be activated during nutrient deprivation and is characterized by the formation of a double-membrane structure named autophagosome that subsequently fuses with a lysosome leading to the degradation of damaged proteins and organelles for the restoration of cell homeostasis (Klionsky and Emr, 2000; Yin et al., 2016). During nutrient deprivation, mTOR inhibition by AMPK leads to ULK1 S317 phosphorylation, which in turn phosphorylates Beclin-1 (BECN1) promoting the activity of class III PtdIns3K complex, initiating the formation of the nucleation site. On the contrary, during nutrient abundance mTOR

activity phosphorylates ULK1 S757, preventing its activation by AMPK and autophagy initiation. Also, AMPK can directly phosphorylate ULK1 at S317 and initiate autophagy (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011). The autophagy-related proteins (ATG) are key players in autophagosome formation and membrane expansion. Microtubule-associated light chain-3 (LC3) is cleaved by ATG4 and conjugated with phosphatidylethanolamine (PE) to produce LC3-II. LC3-II is associated with autophagosomes where it functions as a docking site of adaptor proteins such as SQSTM1/p62, which delivers polyubiquitinated proteins to the autophagosome for degradation. SQSTM1/p62 is degraded together with cargo by lysosome hydrolytic enzymes. ATG7 and ATG3 form the conjugation system involved in the relocation of LC3-I to the phagophore membrane and ATG5 covalently binds to ATG12 forming the ATG12–ATG5–ATG16 conjugate essential for autophagosome membrane elongation. Mature autophagosomes fuse with a lysosome leading to cargo degradation (Sou et al., 2008; Wirawan et al., 2012). Enhanced conversion of LC3-I to LC3-II and a reduction in SQSTM1/p62 abundance is taken as an index of autophagic flux.

Deficient autophagy in the central nervous system leads to the accumulation of ubiquitinated proteins, axonal degeneration, and neuronal death. Loss of cortical and cerebellar neurons has been observed in ATG7-deficient animals (Komatsu et al., 2005, 2006) and animals lacking ATG5 do not survive (Kuma et al., 2004). Also, excessive autophagy can lead to cell death, and its inhibition can prevent acute ischemic brain injury (Carlioni et al., 2008; Fu et al., 2016; Wang et al., 2018). Autophagy dynamics during severe hypoglycemia *in vivo* has not been investigated, neither its role in selective neuronal death. Hence, we have studied the changes in autophagy markers during severe hypoglycemia (SH) without glucose infusion (GI), and during GI after SH or a brief period of coma. We also investigated whether D-BHB treatment in animals subjected to coma is associated with the preservation of functional autophagy, as we have previously observed *in vitro* (Camberos-Luna et al., 2016). We have evaluated the changes in the abundance of proteins involved in autophagosome formation and maturation, Beclin1 (BECN1), p-ULK1, ATG7, ATG12–ATG5, and LC3-II, and in SQSTM1/p62 as a marker of autophagy degradation. The role of AMPK and mTOR in autophagy activation was also investigated. Results suggest that in the cerebral cortex SH induced the accumulation of autophagosomes, which persisted 6 h after GI likely due to deficient autophagy degradation, and recovered at 24 h. In contrast, in the hippocampus, autophagosomes accumulated after SH but no change was observed after GI.

In animals exposed to the hypoglycemic coma, significant autophagosome accumulation was observed at 24 h after GI in both brain regions. Besides, AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 S317 was observed at this time in animals subjected to coma, suggesting autophagy activation. When D-BHB was administered after the coma, SQSTM1/p62 degradation was enhanced and ULK1 S317 phosphorylation was reduced, increasing cell survival. Data suggest that D-BHB attenuates autophagy activation and restores the autophagic flux promoting cell survival.

MATERIALS AND METHODS

Three-month-old male Wistar rats (280–320 g) were used throughout the study. They were obtained from the Instituto de Fisiología Celular (IFC) animal house, at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications No. 80-23 Revised 1996) of the National Institute of Health was followed and animals were handled accordingly and with the approval of the Animal Care Committee (CICUAL) of the IFC (protocol number LMT160-20). The number of animals used was optimized and all efforts were made to minimize their suffering. Experiments are reported according to the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments). Animals were kept with food and water *ad libitum* and under standard dark/light cycle and temperature conditions and housed in individual cages. A sample size of three to seven animals per group was used. Animals were randomly distributed among the different groups and at least one animal from each experimental group was included per experiment. Seventy-three animals were used for western blot, 28 for histology and immunocytochemistry determinations, and 21 for BHB blood determinations, as indicated in figure legends.

Induction of Severe Hypoglycemia Without Glucose Infusion (SH)

Severe hypoglycemia (SH) was induced in the home cage in non-anesthetized animals partially fasted overnight (food restricted to four pellets) and during the experimental period. They received a single intraperitoneal injection of 32 U/kg human insulin (Lilly, Humulin 70/30, Indianapolis, IN, USA). Blood glucose was monitored from a blood sample obtained from the tail vein before (basal levels) and at 0.5, 1, 2, and 3 h after insulin injection using a standard glucometer (Abbott Laboratories, Bedford, MA, USA). One-hour after insulin administration, animals reached SH (<40–30 mg/dl) and were euthanized 2 h later (Figure 1A). Brains were extracted and prepared for western blotting.

Induction of Severe Hypoglycemia With Glucose Infusion (SH + GI)

Animals were subjected to SH and rescued with GI. They were partially fasted overnight and during the whole experimental period. To monitor electrical brain activity through electroencephalogram (EEG) recording, 1 week before

hypoglycemia animals were implanted with epidural electrodes under 2.0 to 3.0% isoflurane anesthesia. Meloxicam (1 mg/kg i.p.) was administered post-surgery as an anti-inflammatory. Animals were intraperitoneally (i.p.) injected (between 9:00 and 11:00 am) with 32 U/kg insulin to induce hypoglycemia. Blood glucose was monitored before (time 0) and at 0.5, 1, 2, 3, 6, 7, and 27 h after insulin. To determine basal brain electrical activity, EEG recording started 30 min before insulin administration and continued during the whole hypoglycemic and GI periods until the normal electrical activity was completely recovered (Figure 1B). Animals were rescued with glucose after the loss of the righting reflex (RR), which precedes the coma state (Haces et al., 2010) by an intraperitoneal (i.p.) bolus of 0.3 ml of 25% glucose in Krebs–Henseleit buffer. Immediately after, an intravenous (i.v.) infusion (25% glucose at 1.5 ml/h during 3 h) was administered through the tail vein using a perfusion pump (Harvard Apparatus 22, South Natick, MA, USA). None of the animals from this group showed EEG isoelectricity (indicative of the hypoglycemic coma). From these animals, one subgroup was euthanized at 6 h after GI (9 h after an insulin injection) and a second subgroup at 24 h after GI (27 h after an insulin injection; Figure 1B). Brains were extracted and prepared for western blotting.

Induction of Hypoglycemic Coma With Glucose Infusion (Coma)

Animals subjected to coma (Coma), were equally treated as those from the SH + GI group, but after the loss of the RR, hypoglycemia was left to progress to the state of coma (EEG isoelectricity). After 5 min of isoelectricity animals received an i.p. bolus of 0.3 ml of 25% glucose as described for the SH + GI group, and 12 min afterward an intravenous (i.v.) infusion (25% glucose at 1.5 ml/h during 3 h) was administered through the tail vein as described above. The coma period ranged from 6 to 12 min (mean = 8.9 ± 0.34). A minimum period of 6 min coma was chosen because according to our previous studies, shorter coma periods produce very limited neuronal death or none. Therefore, animals showing coma periods of 5 min or less were discarded. Conversely, a maximum period of 12 min coma was selected because respiratory failure can be observed in animals showing longer coma periods. From these animals, one subgroup was euthanized at 6 h and a second subgroup at 24 h after GI (Figure 1C). Brains were extracted and prepared for western blot analysis (6 and 24 h) and histology (24 h). Animals showing seizures were also discarded.

Control animals were treated in parallel with the rest of the experimental groups. They were partially fasted overnight and during the duration of the experimental period and received vehicle solution (0.1% acetic acid) instead of insulin. Glucose was measured at different times after vehicle injection.

Treatment With D-BHB (Coma + BHB)

Animals exposed to coma were either treated (Coma + BHB) or non-treated (Coma) with 250 or 500 mg/kg total dose of D-BHB (Cat. 298360, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) divided into two intraperitoneal (i.p.) administrations. The first administration of D-BHB (125 or 250 mg/kg) was given 10 min

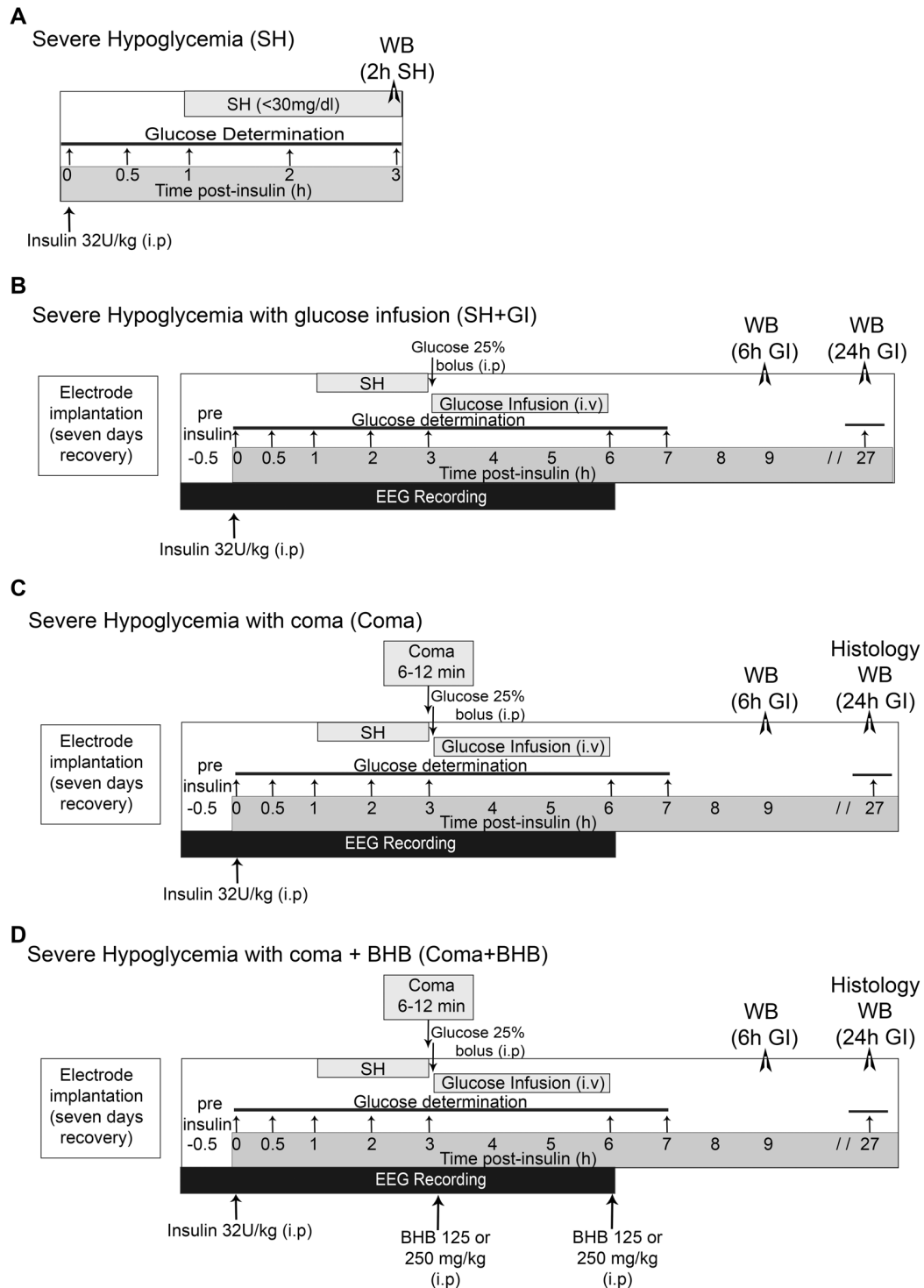


FIGURE 1 | Induction severe hypoglycemia and the hypoglycemic coma. **(A)** Severe hypoglycemia (SH) group. SH was induced by the intraperitoneal (i.p.) injection of insulin (32 U/kg) and animals were euthanized 2 h after they reached 30 mg/dl blood glucose. **(B)** SH + GI group. Animals were implanted with electrodes 1 week before the induction of hypoglycemia for electroencephalogram (EEG) recording and were subjected to SH with glucose infusion (GI). Insulin was injected (i.p.) and 2 h after animals reached SH, they were rescued with glucose before they fell into the coma state. **(C)** Coma group. Animals were treated identically as those from the SH + GI, but SH was left to progress to the coma state for 6–12 min and immediately after they were rescued with glucose. **(D)** Coma + BHB group. Animals were treated identically as the Coma group, but they received two doses of either 125 or 250 mg/kg D isomer of β -hydroxybutyrate (D-BHB; i.p.), the first 10 min after the onset of glucose infusion after the coma and the second at the end of glucose infusion. Animals were euthanized 6 or 24 h after GI in groups **(B–D)**.

after glucose i.v. the infusion was started and the second at the end of the glucose infusion (3 h after the coma). Animals were euthanized at 6 or 24 h GI as indicated in **Figure 1D**. Brains were extracted and prepared for western blotting (6 and 24 h) and histology (24 h).

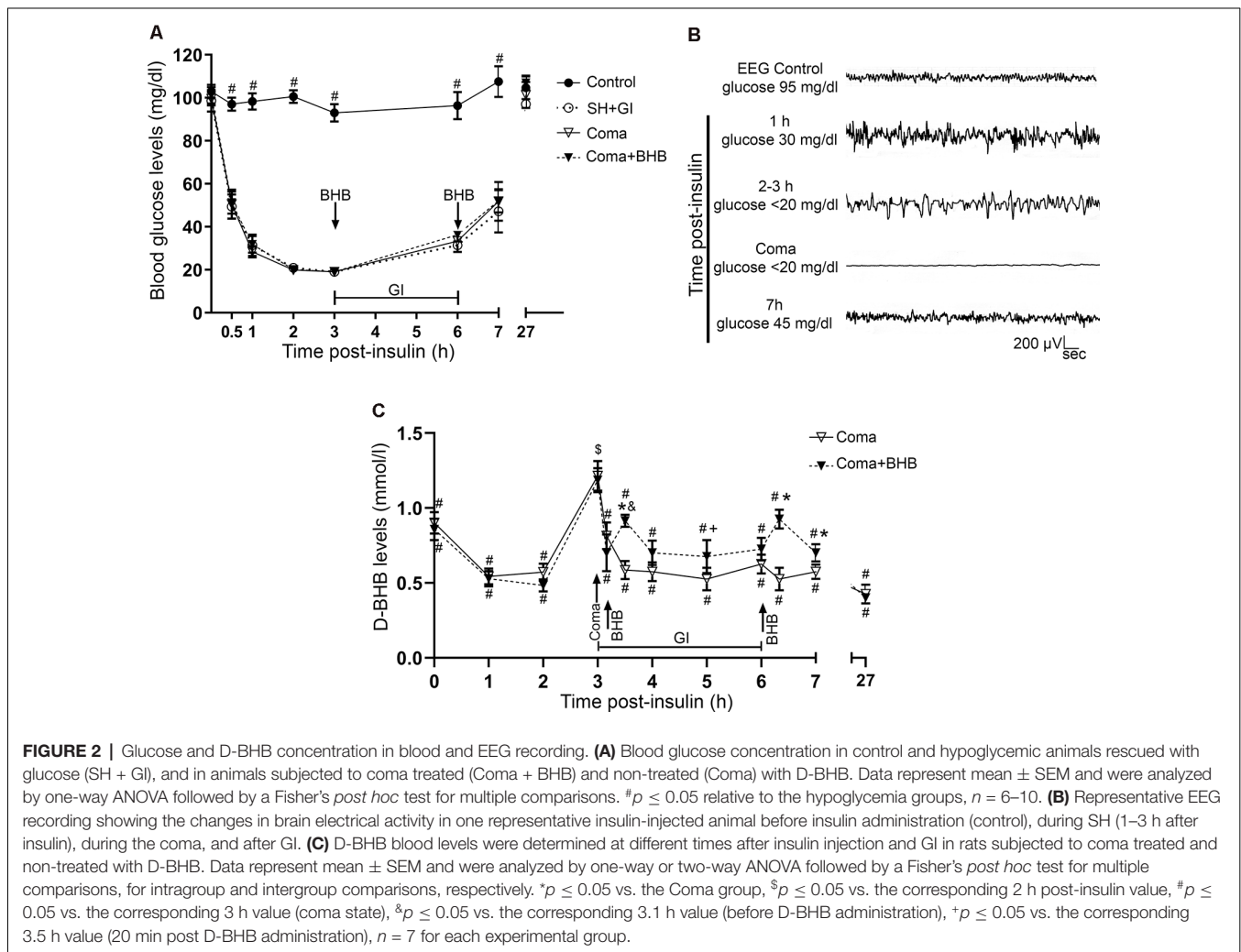
Determination of D-BHB in Blood

Blood samples were obtained from the tail vein (seven animals per group) and D-BHB was measured using blood glucose and ketone monitoring system (FreeStyle Optium Neo, Abbott Diabetes Care, Limited, Witney, Oxon, UK) and keto strips (FreeStyle Optium β -ketone). Samples were obtained from intact control and fasted animals at different times throughout the experimental period. D-BHB was also determined in blood samples from animals of the Coma and the Coma + BHB groups, before (time 0) and at different times after insulin injection (1 and 2 h), at the time the animals reached the coma, at different times after recovery with glucose or glucose + D-BHB (250 mg/kg), and after the second administration of D-BHB (250 mg/kg), as indicated in **Figure 2C**. Animals from these groups were identically treated during the hypoglycemia period

before recovery and were randomly assigned to each one of the treatments.

SDS-PAGE and Western Blots

The hippocampus and parietal cortex were dissected and homogenized in 1:10 weight/volume lysis buffer containing: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 1%, Triton X-100 1%, Sodium deoxycholate 0.5%, PMSF 1 mM, NaPPi 5 mM, Na_3VO_4 2 mM and Complete protease inhibitor cocktail (Roche complete, 1162600, USA), pH 7.5. Proteins were determined by the Lowry method and samples were denaturated in Laemmli buffer. Thirty to forty micrograms of protein was resolved in 10–16% SDS-PAGE and then electroblotted to PVDF membranes. Membranes were blocked in TBS/milk 5% for 1 h and incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies: LC3 (1:5,000, Cat. PD014, MBL International Woburn, USA); ATG5 (1:1,000, Cat. S6133158, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), p-ULK1 S317 (1:500, MB59600629, My BioSource, San Diego, CA, USA); BECN1 (1:2,000, Cat. 3738), ATG7 (1:1,000, Cat. 2631S), ULK1 (1:6,000, Cat. 8054), p-ULK1 S757 (1:6,000, Cat. 14202), mTOR (1:1,000, Cat. 2983S), p-mTOR S2448 (1:1,000, Cat.



2971), AMPK (1:1,000, Cat. 2532), SQSTM1/p62 (1:2,500, Cat. 5114), were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); Actin (1:7,000, Cat. MAB1501 Chemicon Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was used as loading control. The reactions of primary antibodies were detected using the respective horseradish peroxidase, goat anti-rabbit, or goat anti-mouse secondary antibody (Cat. 115035-003 and 115035-062 respectively, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Immunoreactivity was detected by chemiluminescent HRP substrate (LuminataTM Forte, Cat. WBLUF0100, Merck Millipore), using a C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, UK). The optical density of the bands of interest was measured using the ImageJ program. Data were calculated as the protein/actin ratio.

Histology

Twenty-four hours after the treatments, animals from each group ($n = 4-7$) were anesthetized with an overdose of pentobarbital and intracardially perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 mM phosphate buffer; brains were extracted and transferred to a 20–30% sucrose gradient (24 and 72 h, respectively). Coronal brain sections of 20 and 40 μm were obtained in a cryostat (LEICA CM1510S) for histological analysis.

Fluoro-Jade B Staining

Slides were covered for 5 and 2 min with 80 and 70% ethanol respectively, they were washed and covered with 0.06% potassium permanganate for 10 min. Sections were incubated for 20 min with 0.0004% FJB (Cat. AB310, Chemicon), dried at 50°C, rinsed with xylol, and covered with permount (Julio-Amilpas et al., 2015). They were observed under an epifluorescence microscope Nikon Eclipse Ci (using AT-EGFP/F filter) and FJB-positive cells were counted in both hemispheres. In the parietal cortex total FJB-positive cells were counted bilaterally in 15 sections separated by 200 μm . In the case of the hippocampus, six sections were used and cells were counted in a 200 μm^2 area of the crest and the inferior blade of the dentate gyrus using the ImageJ program. Data are reported as the total number of positive cells in both subregions. Cell damage was confirmed by the presence of pyknotic cells after Nissl staining of adjacent sections.

Immunohistochemistry

Brain sections were permeabilized by 30 min (PBS/Triton-X100 0.9%), washed for 10 min in PBS, and incubated with citrates buffer 0.1% at 58°C for 20 min. They were incubated in PBS/glycine 0.1% for 15 min and then blocked 1 h in PBS/BSA 5%/goat serum 2%/Tween 0.5%/Triton 0.9% at room temperature. Afterward, sections were incubated in primary antibodies against LC3 (1:300) or SQSTM1/p62 (1:200, Cat. ab56416, Abcam, Cambridge, UK) in PBS/BSA 1%/Triton X-100 0.3%/Tween-20 0.05%, for 48 h at 4°C. The slides were washed in PBS and incubated for 2 h with secondary antibody Alexa 488 anti-rabbit and Dry-Light 488 anti-mouse (1:300 Cat. 111-545-144 and 115-485-166 respectively, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Subsequently, cell nuclei were stained

with Hoechst 0.001% (Cat. 33258, Sigma–Aldrich). Slides were incubated in Sudan Black B (Cat. 199664, Sigma–Aldrich) for 3 min to decrease background fluorescence. Images were obtained using a confocal microscope ZEISS LSM800 for LC3, SQSTM1/p62, and Hoechst. Images were acquired and processed using the ZEN 3.1 program from Zeiss. Confocal stacks composed from 28 to 35 slices (0.3 μm) were acquired and the maximum projection was obtained from each image (x - y , x - z , and y - z orientations) from three independent experiments.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by the Student's t -test when a comparison between two groups was made, or one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test for multiple comparisons when more than two groups were compared. The time-course in D-BHB blood levels in the Coma and the Coma + BHB groups was compared by two-way ANOVA followed by a Fisher's LSD multiple comparison test, and the intragroup comparisons were made by one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test for multiple comparisons.

RESULTS

Glucose Concentration and Electroencephalogram Recording

Blood glucose levels were measured and electrical brain activity was recorded at different times after insulin injection and GI. Results show a mean basal blood glucose concentration close to 100 mg/dl in all groups. In control animals, glucose concentration was constant during the experimental period (**Figure 2A**). In hypoglycemic animals (SH + GI, Coma, and Coma + BHB) glucose concentration declined close to 30 mg/dl after 1 h insulin administration and decreased further to 20 mg/dl during the next 2 h before GI. At the end of the GI, glucose levels reached 30 mg/dl and 1 h later they raised to 55 mg/ml; control values were recovered at 24 h. No significant differences were found in blood glucose concentration between the experimental groups (**Figure 2A**). **Figure 2B** shows a representative EEG recording obtained before, during, and after the hypoglycemic coma. After 2–3 h insulin administration, electrical brain activity declined to show the high amplitude and low-frequency waves as previously reported (Julio-Amilpas et al., 2015). At this time glucose concentration declined below 20 mg/dl; animals were drowsy and lost their RR. In animals exposed to coma, electrical brain activity was completely suppressed and recovered 1 h after GI. Animals rescued with glucose plus D-BHB (either 250 or 500 mg/kg) showed similar changes in brain electrical activity (not shown).

Autophagy Dynamics During Hypoglycemia and Glucose Infusion in Animals Subjected to Severe Hypoglycemia or the Hypoglycemic Coma

The changes in the content of LC3-II and SQSTM1/p62 were determined 2 h after the induction of hypoglycemia and 6 and

Parietal Cortex

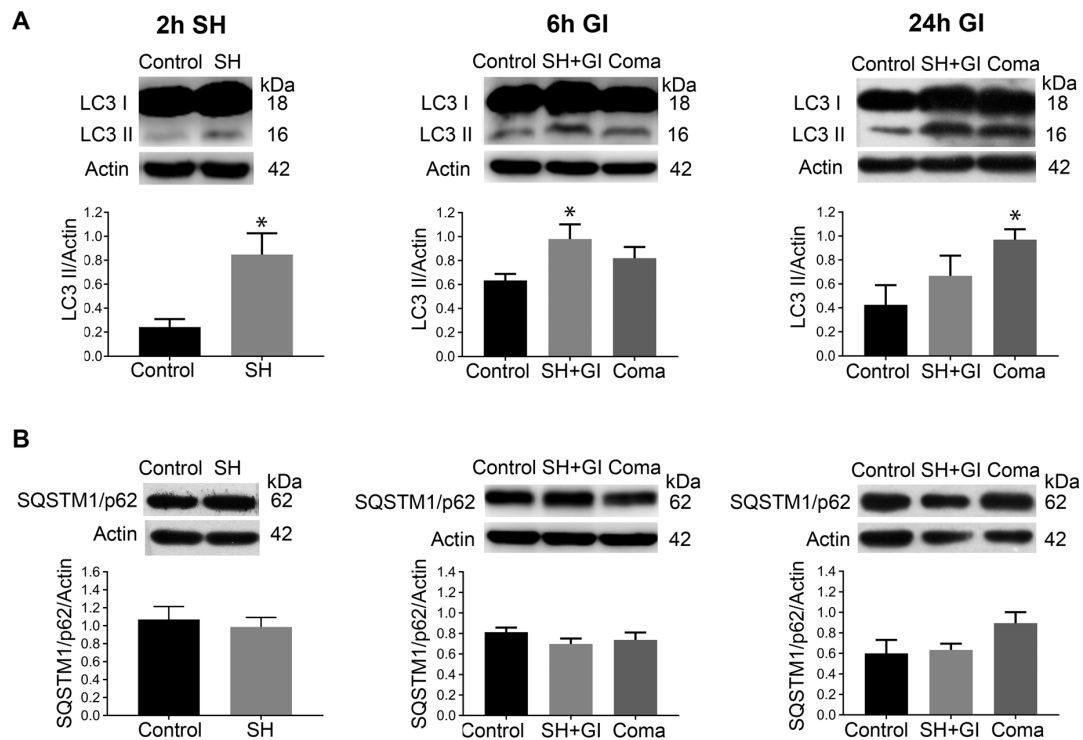


FIGURE 3 | Autophagy dynamics in the parietal cortex induced by severe hypoglycemia and the hypoglycemic coma at different times. Changes in **(A)** LC3-II/Actin and **(B)** SQSTM1/p62/Actin 2 h after SH (2 h SH) and 6 and 24 h after glucose infusion (6 h GI and 24 h GI). Bars represent mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's *post hoc* test for multiple comparisons. For the 2 h group, a Student's *t*-test was used for statistical analysis. * $p \leq 0.05$ vs. control, $n = 4-6$ for the 2 and 24 h groups and $n = 3$ for the 6 h groups.

24 h after GI in rats exposed to SH + GI or the hypoglycemic coma. In the parietal cortex 2 h after SH, the transformation of LC3-I to LC3-II notably increased, while no change in SQSTM1/p62 was observed. At 6 h after GI, LC3-II remained significantly elevated and returned to control levels at 24 h in the SH + GI group (Figure 3A). As the increase in LC3-II was not accompanied by a decrease in SQSTM1/p62 (Figure 3B), results suggest that the autophagic flux is blocked and that increased LC3-II results from autophagosome accumulation. In animals subjected to coma, LC3-II showed a moderate non-significant increase at 6 h after GI, but it increased notably at 24 h. As in the case of SH + GI, augmented LC3-II was not accompanied by a decline in SQSTM1/p62, suggesting autophagic flux impairment at 24 h after GI (Figures 3A,B). In agreement with these observations, LC3 immunoreactivity increased 24 h after GI in the Coma group (Figure 5C).

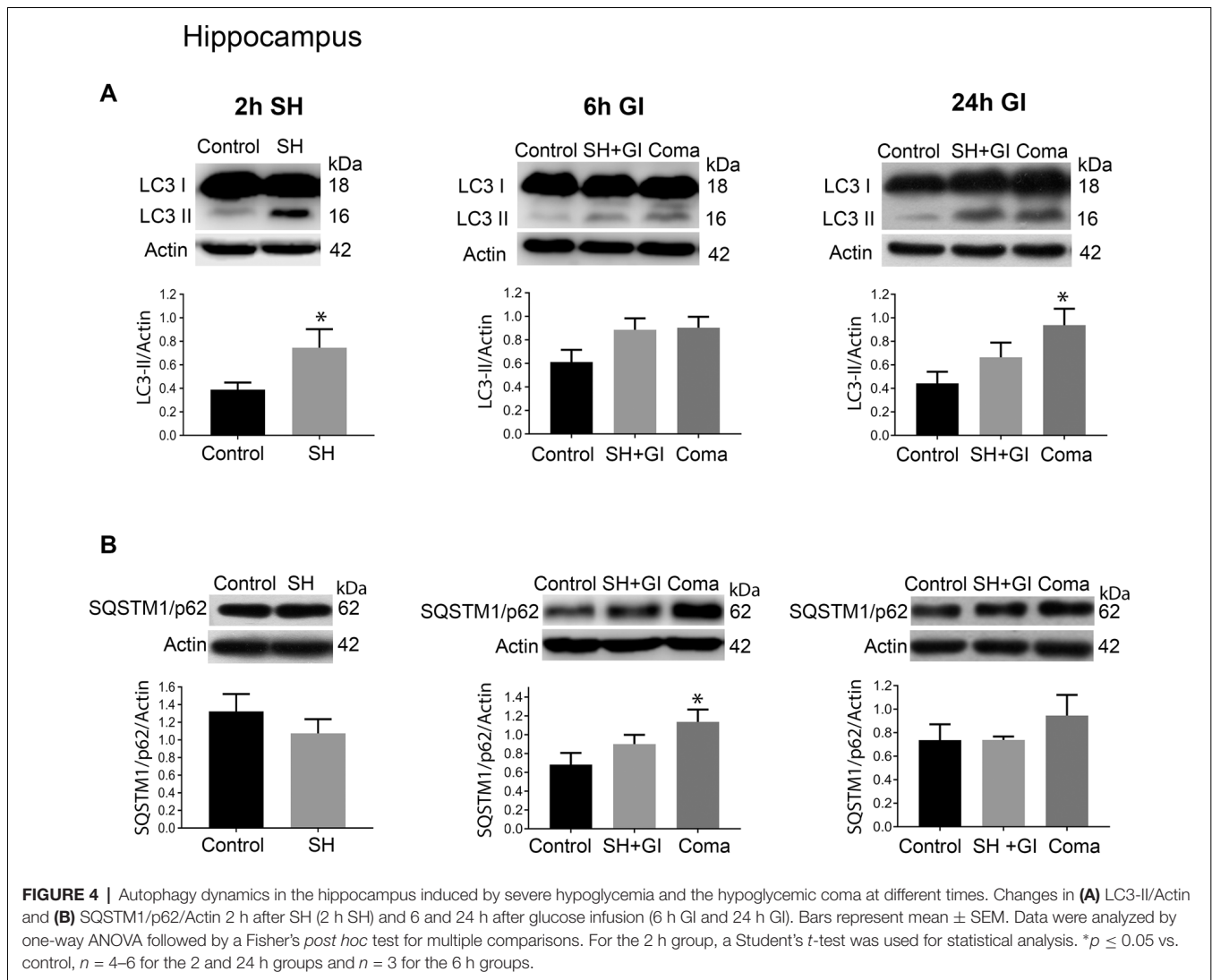
Similar to the parietal cortex in the hippocampus LC3-II significantly increased 2 h after hypoglycemia, while no significant change in SQSTM1/p62 was found (Figures 4A,B). In rats subjected to SH + GI, no significant change in LC3-II or SQSTM1/p62 was observed at 6 h and 24 h (Figure 4B). In contrast, in the Coma group, a significant increase in LC3-II was found at 24 h after GI, while SQSTM1/p62 content showed no reduction suggesting deficient

autophagic degradation. In agreement with these observations, augmented immunoreactivity against LC3 was observed in brain sections from animals exposed to coma, in the inferior blade (not shown) and the crest of the dentate gyrus at 24 h after GI (Figure 6C).

Altogether, these data suggest that autophagosomes accumulate during the hypoglycemic period due to deficient autophagic degradation. After GI the autophagic flux is restored in the SH + GI group, while in rats experiencing a period of coma autophagosomes accumulate at 24 h, likely due to impaired autophagic flux. No changes in the LC3-I band were observed at 2 h or 6 h in the SH + GI and Coma groups (data not shown), while at 24 h there was a slight significant increase in the LC3-I band in the hippocampus of rats experiencing coma but not in the cortex (Supplementary Figure S2).

D-BHB Administration After the Hypoglycemic Coma Stimulates the Autophagic Flux and Increases Cell Survival

In a previous study, we have reported that D-BHB stimulates the autophagic flux and prevents neuronal death in cortical cultured neurons exposed to glucose deprivation and glucose



reintroduction (Camberos-Luna et al., 2016). Hence, we aimed to test whether the KB exerts the same effect in the hypoglycemia model. Rats exposed to the hypoglycemic coma were recovered with glucose and D-BHB 250 mg/kg (two doses of 125 mg/kg) and were analyzed at 6 and 24 h. D-BHB treatment did not affect 6 h on LC3-II or SQSTM1/p62 in the cortex or the hippocampus (data not shown). However, at 24 h D-BHB reduced the increase in LC3-II induced by coma in both brain regions, while no change in SQSTM1/p62 was found (**Supplementary Figures S1A,B**). These results are consistent with immunohistochemistry data, showing reduced LC3 immunoreactivity in rats treated with D-BHB (**Supplementary Figures S1A,B**). When 500 mg/kg D-BHB (two administrations of 250 mg/kg each) was administered, the transformation of LC3-I to LC3-II significantly diminished relative to animals exposed to coma in both the cortex and the hippocampus (**Figures 5A, 6A**). Also, a significant reduction of SQSTM1/p62 was observed in D-BHB-treated rats (**Figures 5B, 6B**), suggesting that at higher doses D-BHB

stimulates the autophagic flux in both regions. In agreement with these results, immunohistochemistry analysis showed reduced immunoreactivity to LC3 and SQSTM1/p62 in the parietal cortex and the dentate gyrus of animals treated with 500 mg/kg of D-BHB (**Figures 5C, 6C**). Confocal Z-stacks images show that LC3 and SQSTM1/p62 are present in the cytoplasm surrounding the nucleus and also in neurites. In animals subjected to coma LC3 and SQSTM1/p62 immunoreactivity augment, while in D-BHB-treated animals, immunofluorescence is less intense and more diffuse. Orthogonal images from the *x-z* and *y-z* orientations confirm that LC3 and SQSTM1/p62 are located in the cytoplasm.

D-BHB treatment did not affect LC3-I in the cortex relative to the control and Coma groups and did not reduce the increase in LC3-I induced by the coma in the hippocampus (**Supplementary Figure S2**).

Then we tested the effect of D-BHB administration on cell survival. In previous studies, we have reported that a short period of coma induces neuronal death in the cerebral

Parietal Cortex

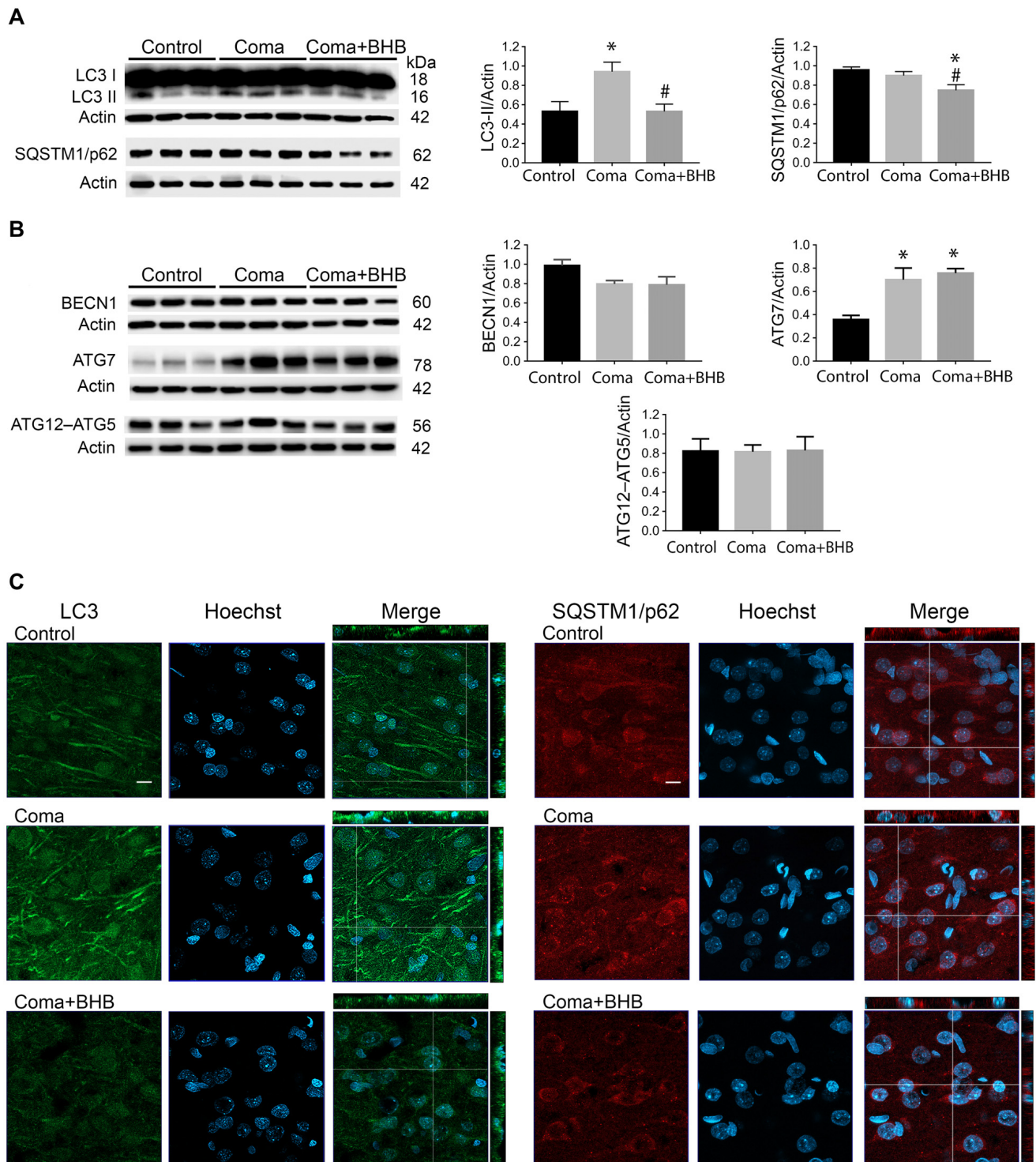


FIGURE 5 | Effect of D-BHB on autophagy-related proteins in the parietal cortex 24 h after the hypoglycemic coma. Changes in **(A)** LC3-II/Actin and SQSTM1/p62/Actin, **(B)** BECN1/Actin, ATG7/Actin, and ATG12-ATG5/Actin. **(C)** Confocal representative images of immunoreactivity to LC3 and SQSTM1/p62 in animals treated and non-treated with D-BHB (500 mg/kg). Orthogonal images (x-z upper) and y-z (right) orientations are shown. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Fisher *post hoc* test for multiple comparisons. * $p \leq 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. coma, $n = 4-5$ control, $n = 5-6$ Coma, $n = 5$ Coma + BHB. Scale bar = 10 μ m.

Hippocampus

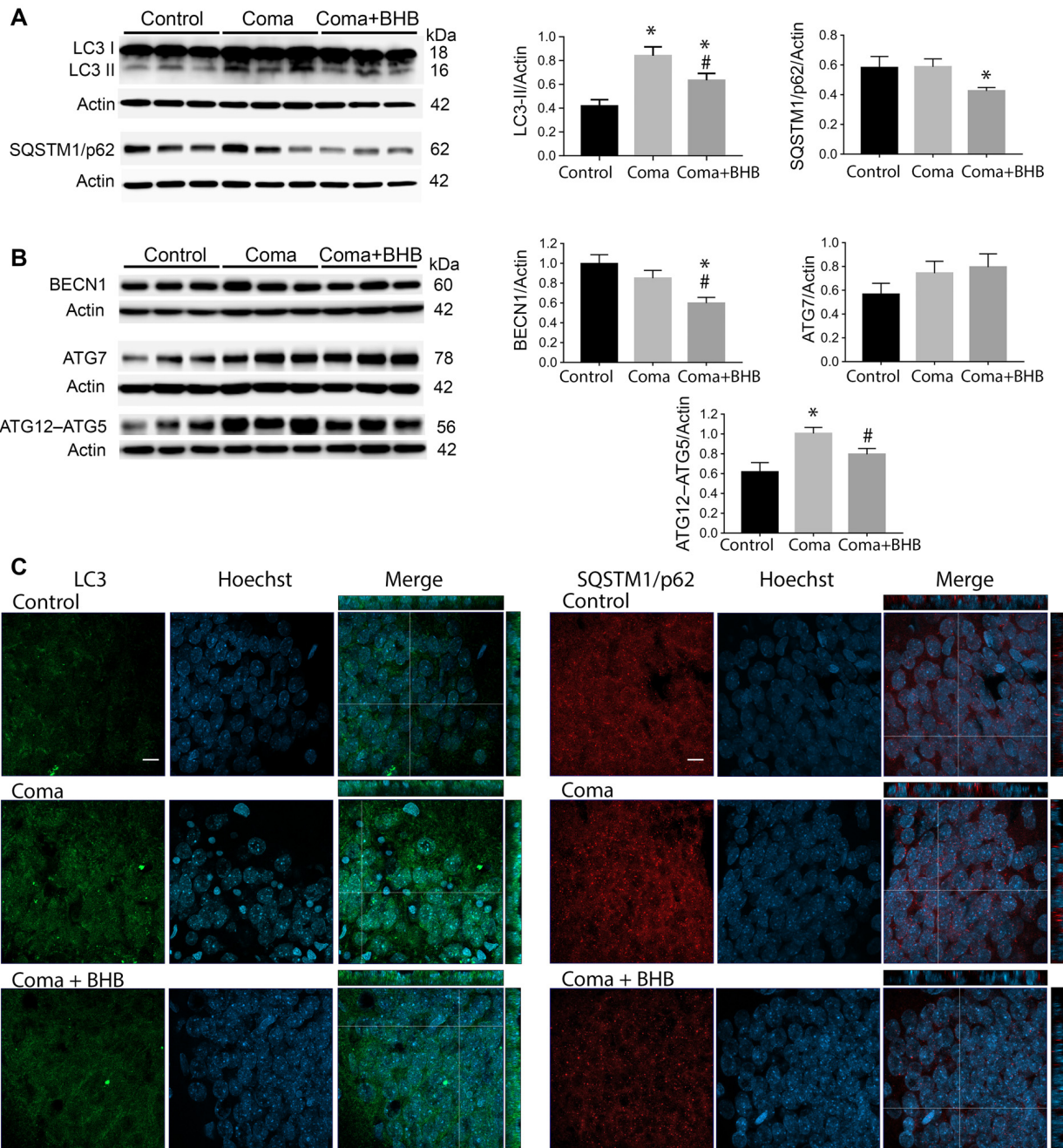
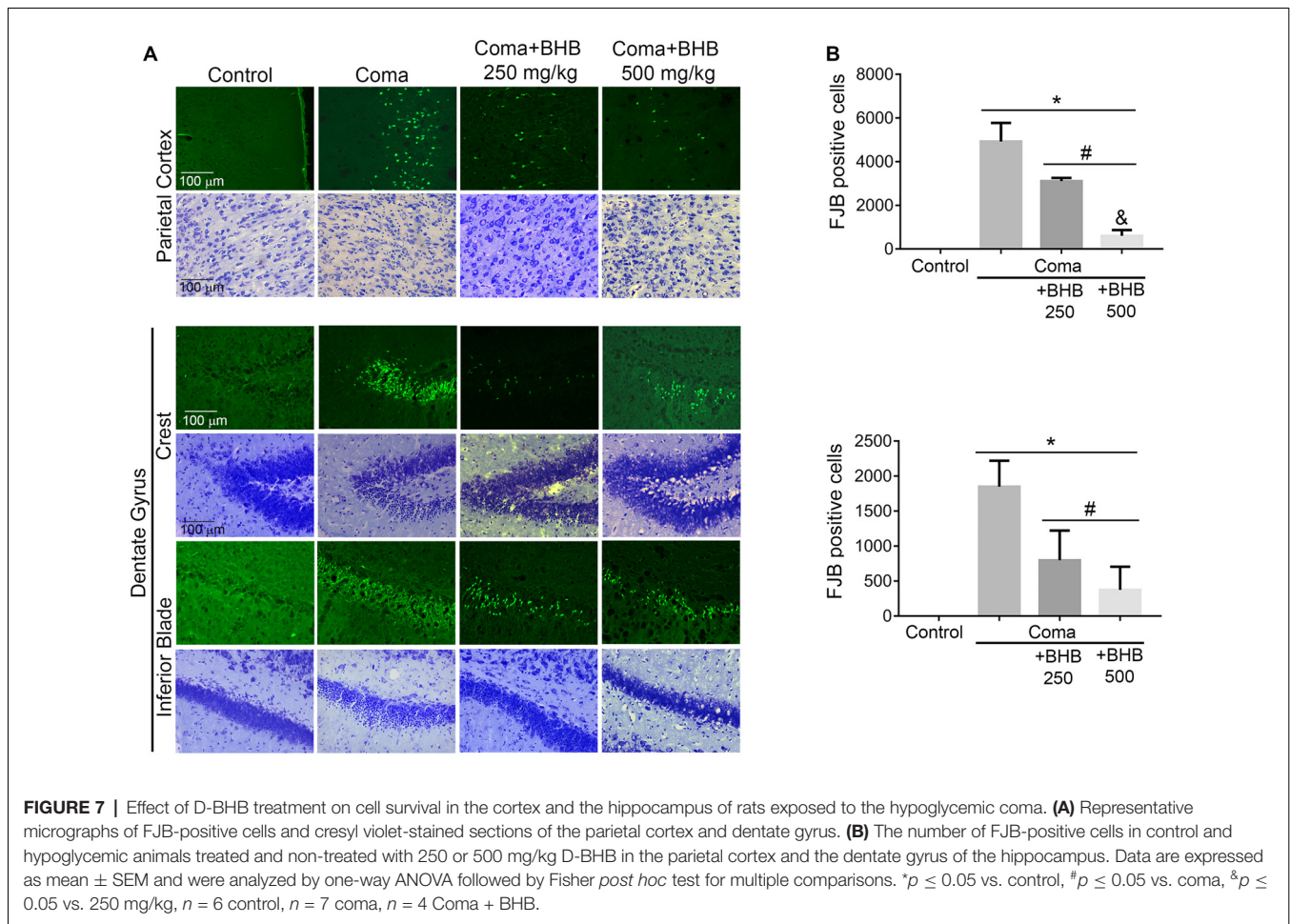


FIGURE 6 | Effect of D-BHB on autophagy-related proteins in the hippocampus 24 h after the hypoglycemic coma. **(A)** Changes in LC3-II/Actin and SQSTM1/p62/Actin, **(B)** BECN1/Actin, ATG7/Actin, and ATG12-ATG5. **(C)** Confocal representative images of immunoreactivity to LC3 and SQSTM1/p62 in animals treated and non-treated with D-BHB (500 mg/kg). Orthogonal images (x-z upper) and y-z (right) orientations are shown. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Fisher *post hoc* test for multiple comparisons. * $p \leq 0.05$ relative to control, # $p < 0.05$ relative to coma, $n = 4-5$ control, $n = 5-6$ Coma, $n = 5$ Coma + BHB. Scale bar = 10 μ m.

cortex and the dentate gyrus (Languren et al., 2019). FJB and cresyl violet staining were used to evidence neuronal damage. At 24 h after glucose infusion, degenerating cells labeled with FJB were observed in the parietal cortex, mainly

in the superficial and medium layers (II-IV), and in the hippocampus, primarily in the crest and the inferior blade of the dentate gyrus (Figure 7A). Adjacent cresyl violet-stained sections showed dark shrunk cells with pyknotic



nuclei in the same location where FJB-positive cells were present (Figure 7A).

D-BHB treatment reduced the number of FJB-positive cells in both cerebral regions (Figure 7B). In the parietal cortex, protection by D-BHB was dose-dependent. A 36% reduction in the number of FJB-labelled cells was observed when animals were treated with two doses of 250 mg/kg D-BHB after the hypoglycemic coma. When 500 mg/kg D-BHB was used, the number of FJB-positive cells was reduced by 87% (Figure 7B). Accordingly, cresyl violet-stained sections of animals treated with D-BHB showed cells with a light cytoplasm and morphologically similar to those in control animals. In the hippocampus, the number of degenerating cells was reduced by 57 and 80%, when animals were treated with 250 or 500 mg/kg of D-BHB, respectively, although no significant difference was found between the two doses (Figure 7B). These results demonstrate that D-BHB can reduce neurodegeneration when administered post the hypoglycemic coma and that a 500 mg/kg total dose is more effective.

D-BHB blood levels were determined at different times in intact control animals, fasted animals, and animals subjected to coma treated and non-treated with D-BHB. As expected, fasting-induced a significant increase in D-BHB blood levels to

0.9 ± 0.075 mM relative to intact controls (0.6 ± 0.057), and these levels were maintained throughout the whole experimental period, recovering control values 27 h later (0.56 ± 0.13 ; not shown). One-hour after insulin administration, when glucose blood levels decreased close to 30 mg/dl, D-BHB decayed to 0.5 mM (Figure 2C). When glucose further decreased below 20 mg/dl and animals reached the coma state, D-BHB blood concentration significantly increased up to 1.2 mM but declined soon after the coma to 0.8–0.7 mM (Figure 2C). To this stage, both animal groups showed a similar behavior suggesting they similarly reacted to insulin. During recovery, 30 min after animals were rescued with glucose alone, D-BHB decreased further (0.58 ± 0.059) and its levels remained low and statistically different from the coma value during the whole glucose infusion period. In contrast, in animals rescued with glucose and D-BHB (250 mg/kg), KB levels did not decline but significantly increased to 0.91 ± 0.040 after 20 min, and progressively declined to 0.7 mM during the glucose infusion period (Figure 2C). Twenty minutes after the second administration of D-BHB its blood levels increased again but rapidly declined after 30 min. Twenty-four hours after glucose infusion, D-BHB levels declined close to control values in both groups (Figure 2C). Altogether, these results suggest that D-BHB

endogenous production is stimulated during the coma state, but is rapidly consumed during GI. Under these conditions, the exogenous administration D-BHB during the recovery period significantly increases its blood levels relative to animals rescued with glucose alone.

Autophagy Initiation After the Hypoglycemic Coma

To investigate whether the elevation of LC3-II induced by the hypoglycemic coma is associated with autophagy induction, the changes in autophagy initiation proteins were determined. In the parietal cortex, no significant changes in BECN1 were observed. The antibody used against ATG5, detects a 56 kDa band corresponding to the ATG12–ATG5 conjugate and a 32 kDa band corresponding to ATG5 alone. In the present conditions, the 32 kDa band showed a very low intensity and is not shown. No changes were detected in the ATG12–ATG5 conjugate relative to control rats, suggesting no activation of autophagy at this time (Figure 5B). However, a significant increase in ATG7 was found. In the hippocampus no changes in BECN1 were observed, ATG7 showed a trend to increase and ATG12–ATG5 conjugate was significantly elevated, suggesting increased autophagosome formation (Figure 6B).

Then we tested the effect of D-BHB on autophagy initiation proteins and observed no change in BECN1, ATG7, and ATG12–ATG5 conjugate in the parietal cortex relative to the Coma group (Figure 5B), while in the hippocampus D-BHB treatment induced no change in ATG7 content, but produced

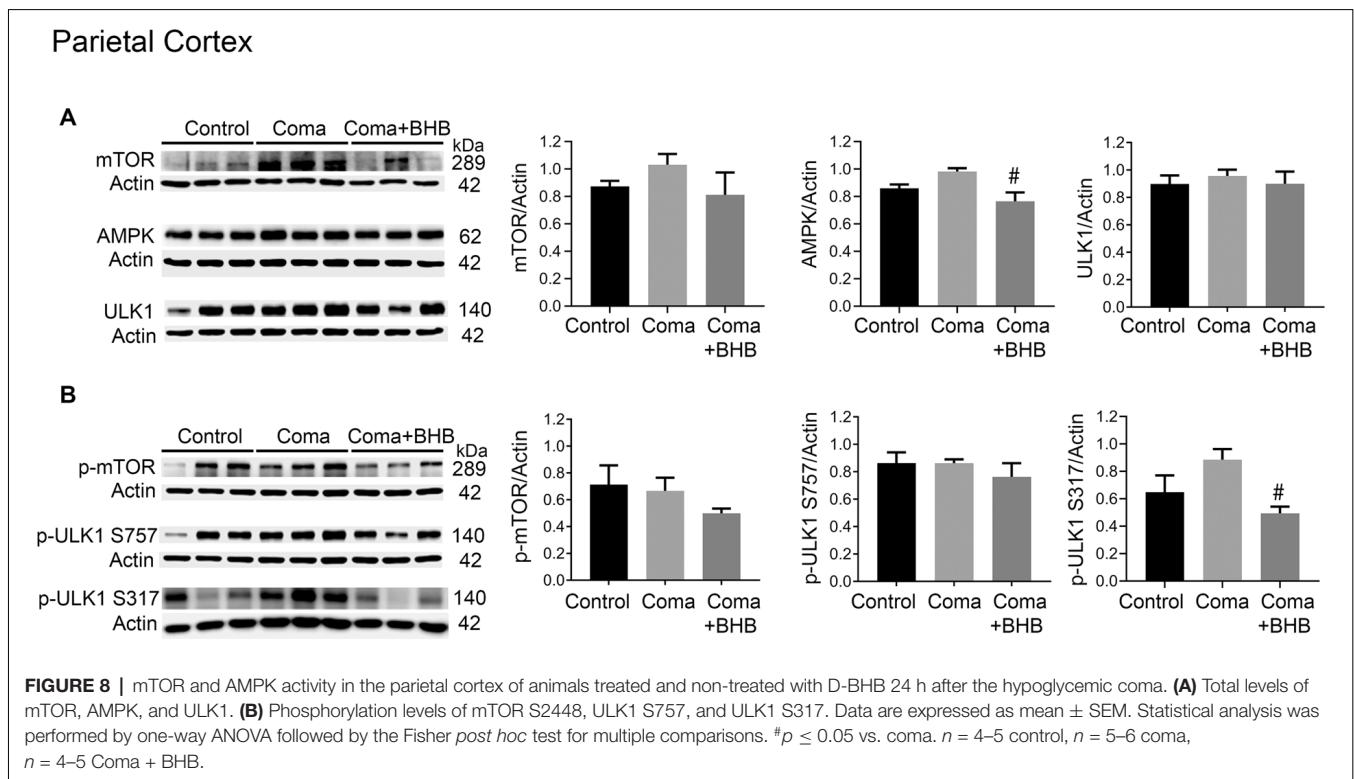
a significant decrease in BECN1 and ATG12–ATG5 conjugate compared to the Coma group (Figure 6B). These results suggest that D-BHB inhibits autophagy initiation in the hippocampus.

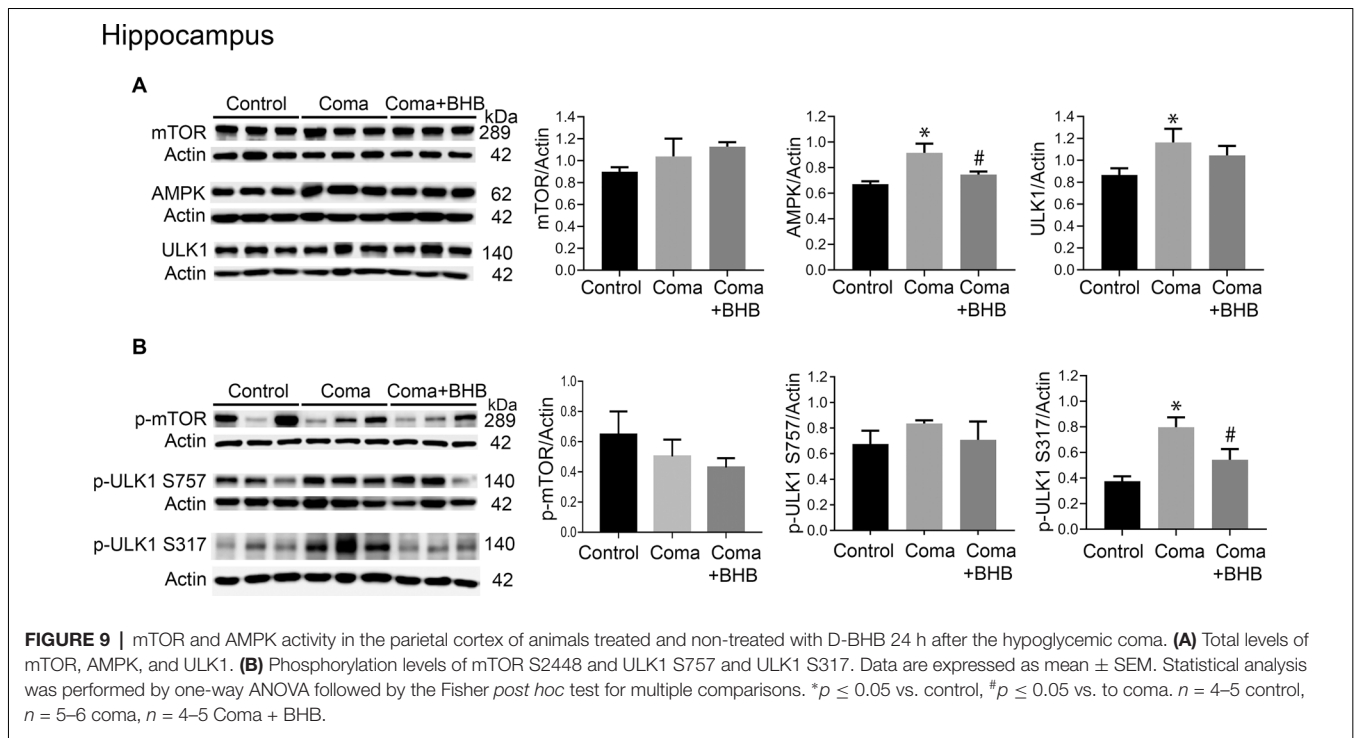
Role of mTOR and AMPK Activation on Autophagy Initiation After the Hypoglycemic Coma

Activation of AMPK and inhibition of the mTOR complex leads to autophagy initiation. Therefore, the levels of phosphorylation of the downstream target of these two kinases, ULK1 were determined 24 h after the coma as an index as of their activity. No significant changes in total mTOR, p-mTOR S2448, total ULK1, and p-ULK1 S757 were found in the cortex (Figures 8A,B), suggesting that mTOR activity is not inhibited at this time. Total AMPK showed no change and p-ULK1 S317 tended to increase (Figures 8A,B). In the hippocampus no changes in total mTOR, p-mTOR S2448 and p-ULK S757 were present, but a significant increase in total ULK1 was found (Figures 9A,B). In contrast, total AMPK and p-ULK1 S317 significantly increased after the coma (Figures 9A,B). Overall, these results agree with those of ATG proteins and suggest that at 24 h autophagy is initiated mainly in the hippocampus in an AMPK activity-dependent manner.

Effect of D-BHB on mTOR and AMPK Activation After the Hypoglycemic Coma

The effect of 500 mg/kg of D-BHB was tested in mTOR and ULK1 phosphorylation. No changes in p-mTOR S2448 and





p-ULK1 S757 were found neither in the cortex nor the hippocampus of D-BHB-treated animals as compared to the Coma group (**Figures 8B, 9B**). D-BHB treatment decreased total AMPK and prevented the increase in p-ULK1 S317 induced by the hypoglycemic coma in both brain regions, suggesting that in D-BHB-treated rats AMPK is less activated (**Figures 8A,B, 9A,B**). Altogether, these results suggest that D-BHB treatment attenuates autophagy activation.

DISCUSSION

Under nutrient-limiting conditions, cells activate autophagy to restore cell homeostasis (Mizushima et al., 2010). However, during conditions of severe energy failure such as ischemia, hypoxia, and cerebral trauma, neuronal death can result from dysfunctional (Carloni et al., 2008; Sarkar et al., 2014) or excessive autophagy (Shi et al., 2012). In contrast, it has been reported that during mild hypoxia and ischemic preconditioning, autophagy is activated to protect cells by removing damaged organelles and proteins (Sheng et al., 2012; Sun et al., 2018). We have previously reported that glucose depletion in cortical cultured neurons activates autophagy, but after glucose reintroduction deficient autophagic degradation is triggered due to calpain-mediated lysosomal dysfunction contributing to neuronal death (Geronimo-Olvera et al., 2017).

Evidence about autophagy dynamics in an *in vivo* model of severe hypoglycemia is still lacking. We have addressed this question and the present findings suggest for the first time, that autophagosomes accumulate during a period of SH relative to control animals, likely due to deficient autophagic degradation in the parietal cortex and the hippocampus. When glucose

was infused after SH a significant increase in autophagosome formation relative to controls animals was observed at 6 h, but it was statistically significant only in the parietal cortex. This increase was transient and returned to control values at 24 h, suggesting that basal levels of autophagy were restored at this time. In contrast, animals experiencing a period of coma showed a non-significant elevation in LC3-II at 6 h relative to control values, but at 24 h LC3-II further and significantly increased. The increase in LC3-II was not different from the SH group but it was different to control rats in both brain regions, suggesting that autophagy does not recover basal values when rats experience a period of coma. As no decrease in SQTSM1/p62 was observed, it is suggested that autophagosome accumulation results from deficient autophagic flux. On the other hand, it was observed that LC3-I abundance significantly increased in the hippocampus but not in the cortex, suggesting the up-regulation of this protein after GI or its deficient degradation, possibly due to impaired proteasomal activity (Gao et al., 2010). Further experiments are needed to identify the mechanism involved.

The differential autophagy dynamics observed after SH and the hypoglycemic coma might be related to the duration and the intensity of energy failure. Early studies revealed that the levels of phosphocreatine and ATP are not altered during non-coma hypoglycemia, while isoelectricity triggers a severe unbalance of the energy state leading to energy depletion (Ferrendelli and Chang, 1973; Lewis et al., 1974). On the other hand, previous studies have shown that GI after non-coma SH increases ROS production and 3-nitrotyrosine protein residues, but neuronal death is limited to a few scattered cells in the cerebral cortex (Haces et al., 2010; Amador-Alvarado et al., 2014; Julio-Amilpas et al., 2015). In contrast, it is well known that GI after the

coma induces oxidative stress and severe oxidative damage, which is highly involved in neuronal death in the cortex and the hippocampus (Suh et al., 2003, 2007). Thus, it is feasible that non-coma hypoglycemia transiently activates autophagy to remove damaged organelles and other cellular components to reestablish cell homeostasis and prevent neuronal death, while the excessive accumulation of oxidatively damaged molecules after the coma, will exacerbate autophagosome formation and impair the autophagic flux.

On the other hand, the present results indicate that autophagy is activated in the hippocampus 24 h after GI in an AMPK-dependent mTOR-independent manner in rats exposed to coma. A moderate increase in ATG7 and a significant elevation in the ATG12–ATG5 conjugate relative to the control group were found. As these proteins are essential for autophagosome formation and elongation, respectively, these results suggest that autophagy is activated in the hippocampus 24 after GI. In agreement with these results, a significant increase in p-ULK1 S317 was found relative to control animals suggesting that autophagy is initiated by AMPK activation. In the cortex, autophagy initiation was not so evident. A significant elevation of ATG7 was found but neither in ATG12–ATG5 conjugate nor in p-ULK1 S317, although a trend to augment was observed. The differences observed in autophagy activation in the cortex and the hippocampus, might be related to the high energy demand of the latter, due to its role in synaptic plasticity and its high vulnerability to hypoglycemic injury (Auer et al., 1984).

The mechanisms leading to AMPK activation in the present conditions were not explored and need further investigation. The stimulation of calcium-calmodulin kinase β (CAMKK β) by increased intracellular calcium might be involved, as calcium homeostasis is lost during severe energy deprivation (Sun et al., 2016). Also, liver kinase B1 (LKB1), an upstream AMP kinase, might have a role as its levels of phosphorylation increase after brain ischemia (Li et al., 2007). Also, AMPK activity can be stimulated by reactive oxygen and nitrogen species, and CAMKK β and LKB1 can be activated by nitric oxide and peroxynitrite, respectively (Cardaci et al., 2012; Li et al., 2013; Xia et al., 2018).

It is well known that during glucose limiting conditions other energy substrates can be used by the brain, such as the KB. Increasing evidence supports the protective effect of KB exogenous intake or ketosis induction against acute brain injury (Camberos-Luna and Massieu, 2020). We have previously shown that D-BHB administration during hypoglycemia prevents ROS production in the cortex and the hippocampus and diminishes neuronal death (Julio-Amilpas et al., 2015). Here, we investigated whether the administration of D-BHB post-hypoglycemic coma reduces neuronal damage and improves autophagic flux, as previously observed in cortical cultured neurons (Camberos-Luna et al., 2016). According to the results, a total dose of 250 mg/kg D-BHB reduced the increase in LC3-II but was unable to stimulate the degradation of SQSTM1/p62. In contrast, 500 mg/kg of D-BHB significantly reduced LC3-II and SQSTM1/p62 in the parietal cortex and the hippocampus, suggesting the improvement of autophagic cargo degradation. These observations correlated with a reduced number of

FJB-positive cells in both brain regions, suggesting that the protective effect of D-BHB is associated at least in part, with the re-establishment of the autophagic flux, as previously reported (Camberos-Luna et al., 2016; Montiel et al., 2020). Importantly, results also show that D-BHB treatment attenuates autophagosome formation in the hippocampus at late stages after GI, supporting the idea that dysfunctional and/or excessive autophagy contributes to neuronal death.

The decrease in LC3-II and SQSTM1/p62 induced by D-BHB treatment can also result from diminished autophagy activation. According to the results, D-BHB did not affect BECN1, ATG7, and ATG12–ATG5 conjugate in the parietal cortex, thus it mainly improved autophagic degradation in this cerebral region. However, in the hippocampus, D-BHB prevented the phosphorylation of ULK1 S317 by AMPK suggesting less AMPK activation. This result correlated with diminished BECN1 and ATG12–ATG5 conjugate supporting that D-BHB attenuates the initiation of autophagy in this region. These results agree with recent findings in the rat striatum after NMDA-induced excitotoxicity (Montiel et al., 2020). Decreased activation of AMPK by D-BHB treatment is possibly related to improved mitochondrial metabolism and ATP synthesis and decreased ROS production (Maalouf et al., 2007; Julio-Amilpas et al., 2015; Marosi et al., 2016).

According to the determination of D-BHB blood levels, fasting-induced mild ketosis as it increased D-BHB up to 0.9 mM. However, it rapidly declined after insulin administration suggesting it is consumed by the brain during hypoglycemia. Results also indicate that during severe hypoglycemia, when animals reach the coma, the endogenous KB production is stimulated but declines soon after the coma. Animals from both groups behaved similarly during the hypoglycemia period before glucose recovery suggesting the similarly reacted to insulin. However, it remains to be determined whether a differential response to insulin affects neuronal survival and autophagy. According to the present data, the exogenous administration of D-BHB immediately after the coma, was able to increase its levels close to fasting values. Notably, D-BHB concentration declined 30 min after its first and second administration, suggesting its utilization during the recovery period. These results agree with a previous study showing that D-BHB administration during hypoglycemia before the coma, increases its levels close to fasting values providing the brain with an alternative substrate to glucose (Julio-Amilpas et al., 2015).

The contribution to neuronal survival of the endogenous D-BHB production and utilization, resulting from insulin administration, cannot be disregarded. In the present experimental conditions, it possibly contributes to the limited neuronal death associated with a brief period of coma (Haces et al., 2010; Languren et al., 2019), as compared to longer periods (30–60 min), where neuronal death is extensive and distributed in the cortex and all layers of the hippocampal formation (Auer et al., 1984; Suh et al., 2007). Nonetheless, according to the present data, additional D-BHB exogenous supplementation during GI, associates with improved cell survival, as a lower number of degenerating cells were observed in D-BHB-treated rats, and this effect was dose-dependent.

The protective effect of exogenous KB administration against acute brain injury has been demonstrated in several *in vivo* models (Suzuki et al., 2001, 2002; Haces et al., 2008; Julio-Amilpas et al., 2015; Montiel et al., 2020), and this study adds new knowledge about the role of autophagy as a possible mechanism involved. Protection protocols using ketosis induction by diet approaches as the ketogenic diet or medium-chain triglycerides supplementation, rely on the up-regulation of monocarboxylate transporters to favor KB oxidation by the brain. In contrast, the exogenous administration of KB or KB derivatives rapidly increases their blood concentration but require repetitive or continuous administration to sustain elevated KB blood levels (Camberos-Luna and Massieu, 2020). It remains to be determined whether there is an up-regulation of MCT transporters in the present conditions, which can facilitate KB uptake in the brain, as it has been reported after ischemia and cerebral trauma (Tseng et al., 2003; Prins et al., 2004; Zhang et al., 2005; Prins and Giza, 2006; Prins, 2008; Moreira et al., 2009), and recently after severe hypoglycemia in female rats (Uddin et al., 2020).

In conclusion, the present study reports for the first time, that autophagy follows different dynamics during glucose recovery in animals experiencing SH or hypoglycemic coma, and that it is differentially activated in the cortex and the hippocampus as a response to the initial energy failure and recovery. Also, results support that D-BHB treatment is associated with the stimulation of the autophagic flux in the cortex and the hippocampus and with the attenuation of autophagy in the latter. These effects might be involved in the protective effect exerted by D-BHB against hypoglycemic neuronal death. These data increase our knowledge about the adaptive brain responses to severe hypoglycemia, and the role of D-BHB as alternative energy fuel to glucose in the modulation of these responses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

REFERENCES

- Amador-Alvarado, L., Montiel, T., and Massieu, L. (2014). Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metab. Brain Dis.* 29, 711–719. doi: 10.1007/s11011-014-9508-5
- Auer, R. N., Wieloch, T., Olsson, Y., and Siesjo, B. K. (1984). The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol.* 64, 177–191. doi: 10.1007/BF00688108
- Camberos-Luna, L., and Massieu, L. (2020). Therapeutic strategies for ketosis induction and their potential efficacy for the treatment of acute brain injury and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 133:104614. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104614
- Camberos-Luna, L., Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., and Massieu, L. (2016). The ketone body, β -hydroxybutyrate stimulates the autophagic flux and prevents neuronal death induced by glucose deprivation in cortical cultured neurons. *Neurochem. Res.* 41, 600–609. doi: 10.1007/s11064-015-1700-4
- Cardaci, S., Filomeni, G., and Ciriolo, M. R. (2012). Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *J. Cell Sci.* 125, 2115–2125. doi: 10.1242/jcs.095216
- Carloni, S., Buonocore, G., and Balduini, W. (2008). Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol. Dis.* 32, 329–339. doi: 10.1016/j.nbd.2008.07.022
- Cryer, P. E. (2005). Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure and its component syndromes in diabetes. *Diabetes* 54, 3592–3601. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3592
- Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J., and Guan, K. L. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 7, 643–644. doi: 10.4161/auto.7.6.15123
- Ferrendelli, J. A., and Chang, M. M. (1973). Brain metabolism during hypoglycemia. Effect of insulin on regional central nervous system glucose and energy reserves in mice. *Arch. Neurol.* 28, 173–177. doi: 10.1001/archneur.1973.00490210053006
- Fu, L., Huang, L., Cao, C., Yin, Q., and Liu, J. (2016). Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy. *Brain Res.* 1650, 103–111. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.035
- Gao, Z., Gammoh, N., Wong, P.-M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Jiang, X. (2010). Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome. *Autophagy* 6, 126–137. doi: 10.4161/auto.6.1.10928

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) from Instituto de Fisiología Celular (protocol number IFC LMT16020).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CT-E, TM, and MF-M performed all the experiments. CT-E performed all western blot, histology, and immunohistochemistry analysis. CT-E and LM analyzed all data and wrote the article. CT-E, TM, and LM conceived the study, designed the experiments, and participated in all discussions.

FUNDING

The present work was supported by PAPIIT-UNAM grant IN204919 and CONACyT grant A1S-17357 to LM. CT-E is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and she was a recipient of CONACyT fellowship (573885).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ruth Rincón Heredia for her assistance in confocal imaging analysis, Claudia Rivero Cerecedo for animal care at the Bioterium of IFC, and Ana Maria Escalante and Francisco Pérez for Computer facilities.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.547215/full#supplementary-material>.

- Geronimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., Castro-Obregon, S., and Massieu, L. (2017). Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis.* 8:e2911. doi: 10.1038/cddis.2017.299
- Haces, M. L., Hernández-Fonseca, K., Medina-Campos, O. N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., and Massieu, L. (2008). Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp. Neurol.* 211, 85–96. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.12.029
- Haces, M. L., Montiel, T., and Massieu, L. (2010). Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non-coma model of insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165, 28–38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.003
- Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, E., Geronimo-Olvera, C., and Massieu, L. (2015). Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β-hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 851–860. doi: 10.1038/jcbfm.2015.1
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141. doi: 10.1038/ncb2152
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717–1721. doi: 10.1126/science.290.5497.1717
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884. doi: 10.1038/nature04723
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425–434. doi: 10.1083/jcb.200412022
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., et al. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036. doi: 10.1038/nature03029
- Langren, G., Montiel, T., Ramirez-Lugo, L., Balderas, I., Sanchez-Chavez, G., Sotres-Bayon, F., et al. (2019). Recurrent moderate hypoglycemia exacerbates oxidative damage and neuronal death leading to cognitive dysfunction after the hypoglycemic coma. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 39, 808–821. doi: 10.1177/0271678X17733640
- Lewis, L. D., Ljunggren, B., Ratcheson, R. A., and Siesjo, B. K. (1974). Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia, related to blood glucose and to EEG. *J. Neurochem.* 23, 673–679. doi: 10.1111/j.1471-4159.1974.tb04390.x
- Li, J., Zeng, Z., Viollet, B., Ronnett, G. V., and McCullough, L. D. (2007). Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke* 38, 2992–2999. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.490904
- Li, L., Chen, Y., and Gibson, S. B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell. Signal.* 25, 50–65. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.020
- Maalouf, M., Sullivan, P. G., Davis, L., Kim, D. Y., and Rho, J. M. (2007). Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145, 256–264. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.11.065
- Marosi, K., Kim, S. W., Moehl, K., Scheibye-Knudsen, M., Cheng, A., Cutler, R., et al. (2016). 3-hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.* 139, 769–781. doi: 10.1111/jnc.13868
- Masuda, R., Monahan, J. W., and Kashiwaya, Y. (2005). D-beta-hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J. Neurosci. Res.* 80, 501–509. doi: 10.1002/jnr.20464
- Melo, T. M., Nehlig, A., and Sonnewald, U. (2006). Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem. Int.* 48, 498–507. doi: 10.1016/j.neuint.2005.12.037
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., and Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313–326. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028
- Montiel, T., Montes-Ortega, L. A., Flores-Yáñez, S., and Massieu, L. (2020). Treatment with the ketone body D-β-hydroxybutyrate attenuates autophagy activated by NMDA and reduces excitotoxic neuronal damage in the rat striatum *in vivo*. *Curr. Pharm. Des.* 26, 1377–1387. doi: 10.2174/1381612826666200115103646
- Moreira, T. J., Pierre, K., Maekawa, F., Repond, C., Cebere, A., Liljequist, S., et al. (2009). Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1273–1283. doi: 10.1038/jcbfm.2009.50
- Newman, J. C., and Verdin, E. (2014). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrin. Metab.* 25, 42–52. doi: 10.1016/j.tem.2013.09.002
- Prins, M. L. (2008). Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1–16. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600543
- Prins, M. L., Lee, S. M., Fujima, L. S., and Hovda, D. A. (2004). Induction of monocarboxylate transporter 2 expression and ketone transport following traumatic brain injury in juvenile and adult rats. *Dev. Neurosci.* 28, 447–456. doi: 10.1159/000094170
- Prins, M. L., Lee, S. M., Fujima, L. S., and Hovda, D. A. (2004). Increased cerebral uptake and oxidation of exogenous betaHB improves ATP following traumatic brain injury in adult rats. *J. Neurochem.* 90, 666–672. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02542.x
- Puchowicz, M. A., Zechel, J. L., Valerio, J., Emancipator, D. S., Xu, K., Pundik, S., et al. (2008). Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1907–1916. doi: 10.1038/jcbfm.2008.79
- Sarkar, C., Zhao, Z., Aungst, S., Sabirzhanov, B., Faden, A. I., and Lipinski, M. M. (2014). Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy* 10, 2208–2222. doi: 10.4161/15548627.2014.981787
- Sheng, R., Liu, X.-Q., Zhang, L.-S., Gao, B., Han, R., Wu, Y.-Q., et al. (2012). Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy* 8, 310–325. doi: 10.4161/auto.18673
- Shi, R., Weng, J., Zhao, L., Li, X.-M., Gao, T.-M., and Kong, J. (2012). Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci. Ther.* 18, 250–260. doi: 10.1111/j.1755-5949.2012.00295.x
- Sou, Y. S., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., et al. (2008). The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell* 19, 4762–4775. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0309
- Suh, S. W., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., et al. (2003). Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J. Neurosci.* 23, 10681–10690. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-33-10681.2003
- Suh, S. W., Gum, E. T., Hamby, A. M., Chan, P. H., and Swanson, R. A. (2007). Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 117, 910–918. doi: 10.1172/JCI30077
- Sun, F., Xu, X., Wang, X., and Zhang, B. (2016). Regulation of autophagy by Ca²⁺. *Tumour Biol.* 37, 15467–15476. doi: 10.1007/s13277-016-5353-y
- Sun, Y., Zhu, Y., Zhong, X., Chen, X., Wang, J., and Ying, G. (2018). Crosstalk between autophagy and cerebral ischemia. *Front. Neurosci.* 12:1022. doi: 10.3389/fnins.2018.01022
- Suzuki, M., Suzuki, M., Kitamura, Y., Mori, S., Sato, K., Dohi, S., et al. (2002). Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 36–43. doi: 10.1254/jjp.89.36
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A., et al. (2001). Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 87, 143–150. doi: 10.1254/jjp.87.143
- Tseng, M. T., Chan, S. A., and Schurr, A. (2003). Ischemia-induced changes in monocarboxylate transporter 1 reactive cells in rat hippocampus. *Neurol. Res.* 25, 83–86. doi: 10.1179/016164103101200978
- Uddin, M. M., Ibrahim, M. M. H., Aryal, D., and Briski, K. P. (2020). Sex-dimorphic moderate hypoglycemia preconditioning effects on hippocampal

- CA1 neuron bio-energetic and anti-oxidant function. *Mol. Cell. Biochem.* 473, 39–50. doi: 10.1007/s11010-020-03806-7
- Wang, J. F., Mei, Z. G., Fu, Y., Yang, S. B., Zhang, S. Z., Huang, W. F., et al. (2018). Puerarin protects rat brain against ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway. *Neural Regen. Res.* 13, 989–998. doi: 10.4103/1673-5374.233441
- Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P., and Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* 22, 43–61. doi: 10.1038/cr.2011.152
- Xia, G., Zhu, T., Li, X., Jin, Y., Zhou, J., and Xiao, J. (2018). ROS-mediated autophagy through the AMPK signaling pathway protects INS-1 cells from human islet amyloid polypeptide-induced cytotoxicity. *Mol. Med. Rep.* 18, 2744–2752. doi: 10.3892/mmr.2018.9248
- Yin, Z., Pascual, C., and Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell* 3, 588–596. doi: 10.15698/mic2016.12.546
- Zhang, F., Vannucci, S. J., Philp, N. J., and Simpson, I. A. (2005). Monocarboxylate transporter expression in the spontaneous hypertensive rat: effect of stroke. *J. Neurosci. Res.* 79, 139–145. doi: 10.1002/jnr.20312

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Torres-Esquivel, Montiel, Flores-Méndez and Massieu. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.