



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DEL CUERPO CETÓNICO β -
HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA
AUTOFAGIA EN NEURONAS CORTICALES EN
CULTIVO SOMETIDAS A LA PRIVACIÓN Y
REINTRODUCCIÓN DE GLUCOSA.**

T É S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS**

P R E S E N T A :

KARLA GABRIELA AVILEZ POBLADOR

TUTOR DE TESIS

MARÍA LOURDES MASSIEU TRIGO

Facultad de Medicina



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Técnicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Medicina y al Instituto de Fisiología Celular

A la Dra. Lourdes Massieu, por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio, ser mi tutora, y ser un ejemplo a seguir de mujeres en la ciencia.

A la Biol. Teresa Montes, por su paciencia, enseñanzas, apoyo y asesoría técnica brindada para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, por su tiempo en la revisión de la tesis.

- *Dra. Elena Zambrano*
- *Dra. Marcia Hiriart*
- *Dra. Susana Castro*
- *Dr. Luis Tovar*
- *Dra. Lourdes Massieu*

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento por PAPIIT-UNAM (IN204919) y por CONACYT (A1-S-17357).

Agradecimientos Personales

A mi madre Rosa Gabriela Poblador González, a mi padre Juan Avilez Pérez, y a mi hermano Alejandro Avilez Poblador por todo su apoyo incondicional, su amor y por siempre creer en mí.

Al laboratorio AL-302: Ashley Salcido, Juan Carlos Gómora, Carmen Torres, Perla Coronado, Gabriela Santana, y Lizbeth García.

A mis amigos de la licenciatura en Neurociencias: Nuri Acevedo, Michelle Martínez, Estefanía Santana, Angela Jiménez, Fernando Hernández, Emilio Ruiz y Carlos Zavaleta.

A Rodrigo Cariño Escobar, por todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 LA GLUCOSA EN EL CEREBRO	6
1.2 HIPOGLUCEMIA.....	8
1.3 TIPOS DE AUTOFAGIA	9
1.3.1 <i>Señales de activación de la autofagia</i>	11
1.3.2 <i>Maquinaria de la autofagia</i>	13
1.3.2 <i>Autofagia y SNC</i>	16
1.3.3 <i>Papel de la autofagia durante estados hipoglucémicos</i>	18
1.4 CUERPOS CETÓNICOS.....	21
1.4.1 <i>Transporte y metabolismo de los cuerpos cetónicos en el cerebro</i>	22
1.4.2 <i>Efectos protectores de los cuerpos cetónicos</i>	24
1.4.3 <i>Quiralidad del β-Hidroxibutirato</i>	28
1.4.4 <i>Efectos del D-BHB en la protección inducida por hipoglicemia y privación de glucosa</i> ..	29
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 OBJETIVO GENERAL:	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	32
5. METODOLOGÍA	33
5.1 CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE CORTEZA CEREBRAL OBTENIDAS DE EMBRIONES DE RATAS DE 17-18 DÍAS DE GESTACIÓN	33
5.2 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES	34
5.2.1 <i>Privación de Glucosa:</i>	34
5.2.2 <i>Reintroducción de Glucosa:</i>	34
5.3 INMUNOBLOT.....	34
5.4 INMUNOENSAYO.....	35
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	37
6. RESULTADOS	38
6.1 PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE AMPK E INHIBICIÓN DE MTOR EN LA INICIACIÓN DE LA AUTOFAGIA DESPUÉS DE LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA EN NEURONAS.....	38
6.2 MODULACIÓN DE ULK1 A NIVEL DE TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS POR MTOR	42
6.3 INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA DURANTE LA PRIVACIÓN Y REINTRODUCCIÓN DE GLUCOSA EN NEURONAS	44

7	DISCUSIÓN	47
8	CONCLUSIÓN	50
9	REFERENCIAS.....	51

Abreviaturas

AcAc – Acetoacetato

ADP – Adenosín difosfato

AKT – Proteína cinasa B

AMP – Adenosín monofosfato

AMPK – Cinasa de AMP

ATG – Genes relacionados con la autofagia

ATP – Adenosín trifosfato

β HB – β -Hidroxibutirato

BDH – β -hidroxibutirato deshidrogena

BECN1 – Beclin 1

BHE – Barrera hematoencefálica

GD – Privación de glucosa

GLUT – Transportadores de glucosa

GR – Reintroducción de glucosa

HDACs – Desacetilasas de histonas

HMGCS2 – hidroximetilglutaril-CoA sintasa HMG-CoA sintasa

LAMP2 – Proteína asociada a los lisosomas 2A

LC3 – Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3

MCT – Transportadores de monocarboxilatos

mTOR – Diana de rapamicina en mamíferos

NADP⁺ – Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato oxidada

NAD⁺ – Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidada

NADPH – Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducida

NADH – Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida

NMDA – N-metil-D-aspartato

p70 S6K – Cinasa de la proteína ribosomal S6

PE – Fosfatidiletanolamina

PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinasa

PI3P – Fosfatidilinositol-3-fosfato

ROS – Especies reactivas de oxígeno

SCOT – Succinil-CoA: 3-cetoácido coenzima A transferasa

SN – Sistema nervioso

SQSTM1/p62 – Secuestrosoma-1 o p62

TCA – Ciclo de los ácidos tricarbóxicos

TSC1/TSC2 – Complejo de Esclerosis Tuberosa 1 y 2

ULK1 - Cinasa 1 Tipo Unc-51

4E-BP – Proteína de unión al factor de inicio de la traducción en eucariontes

Listado de figuras y tablas

FIGURA 1: ESQUEMA DE LAS ETAPAS DE LA AUTOFAGIA.	15
FIGURA 2: SINTESIS, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE CUERPOS CETONICOS.	23
FIGURA 3: DIFERENCIAS EN EL CONSUMO DE NAD⁺ DURANTE EL CATABOLISMO DE LA GLUCOSA Y B-HIDROXIBUTIRATO.	24
FIGURA 4: ACTIVIDAD DE LA AMPK Y ULK1 EN NEURONAS CORTICALES IN VITRO EXPUESTAS A GD Y GD/GR CON O SIN D-BHB	39
FIGURA 5: ACTIVIDAD DE mTOR Y ULK1 EN NEURONAS CORTICALES IN VITRO EXPUESTAS A GD Y GD/GR CON O SIN D-BHB.	41
FIGURA 6: MODULACIÓN DE mTOR SOBRE ULK1 EN NEURONAS CORTICALES IN VITRO EXPUESTAS A GD Y GD/GR.	43
FIGURA 7: NIVELES DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA AUTOFAGIA EN NEURONAS CORTICALES IN VITRO EXPUESTAS A GD Y GD/GR CON O SIN D-BHB.	45
FIGURA 8: NIVELES DE SQSTM1/P62 (N=3), COMO ÍNDICE DE FLUJO AUTOFÁGICO, EN NEURONAS CORTICALES IN VITRO EXPUESTAS A GD Y GD/GR CON O SIN D-BHB . 46	
FIGURA 9: EFFECTO DE LA PRIVACIÓN Y REINTRODUCCIÓN DE GLUCOSA (GD/GR) Y EL TRATAMIENTO CON D-BHB SOBRE LA INICIACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN NEURONAS CORTICALES IN VITRO.	50
TABLA 1: EFFECTOS PROTECTORES DE LOS CUERPOS CETÓNICOS.	27

Efecto del cuerpo cetónico beta-hidroxibutirato sobre la activación de la autofagia en neuronas corticales en cultivo sometidas a la privación y reintroducción de glucosa

Resumen

Al ser la glucosa la principal fuente de energía del sistema nervioso, las neuronas son altamente vulnerables a alteraciones en su metabolismo o a interrupciones en su suministro. Una de las principales respuestas celulares inducidas en el cerebro durante la privación de nutrientes es la autofagia. No obstante, su desregulación puede conducir a la muerte neuronal, como se ha observado en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* en nuestro laboratorio, durante eventos de excitotoxicidad y de privación de glucosa. Alternativo a la glucosa, otros sustratos energéticos como los cuerpos cetónicos: acetoacetato, y β -hidroxibutirato (β HB) también pueden ser utilizados como fuente de energía en el cerebro. En estudios anteriores de nuestro laboratorio, se ha demostrado, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, que en condiciones de privación de glucosa existe un defecto en la degradación de autofagosomas que contribuye de manera importante a la muerte neuronal. En estas condiciones, la adición del isómero D del β HB (D- β HB) estimula el flujo autofágico. Sin embargo, todavía se desconoce si el BHB puede regular a la baja señales involucradas en el inicio de la autofagia en neuronas expuestas a privación de glucosa.

La presente tesis tiene como objetivo el investigar el papel de la vía mTOR/AMPK en la activación de la autofagia durante diferentes períodos de privación y

reintroducción de glucosa en neuronas corticales cultivadas, y el posible efecto regulador del cuerpo cetónico D- β HB. Para responder a nuestra pregunta de investigación, Se determinaron los cambios en el estado de fosforilación de las proteínas involucradas en la autofagia: ULK1, mTOR y AMPK, y en la abundancia de BECN1, SQSTM1/p62 y LC3-II/LC3-I, después de los diferentes tratamientos. Los resultados presentados indican que la autofagia se activa en el periodo de privación de glucosa, como sugiere el aumento observado en la activación de AMPK (pAMPK T172) y ULK1 (pULK1 S317) y una disminución de la activación de mTOR (mTOR pS2448). Mientras que, durante la reintroducción de glucosa no se observa una reactivación de la autofagia, sino la degradación de autofagosomas. Finalmente, aunque el D- β HB no mostró algún efecto significativo sobre la iniciación de la autofagia, éste aceleró la degradación autofágica, y por lo tanto restauró el flujo autofágico.

Abstract

As glucose is the main source of energy in the nervous system, neurons are highly vulnerable to dysregulation of its metabolism or disruptions in its supply. One of the main adaptive cell responses induced in the brain during nutrient deprivation is autophagy. Nevertheless, dysregulation of autophagy under acute excitotoxicity and glucose deprivation can lead to neuronal death, as identified in different in vivo and in vitro models in our laboratory. Alternative energy substrates such as ketone bodies: acetoacetate, and β -hydroxybutyrate (β HB) can be used as energy fuel in the brain when glucose is unavailable and protect neurons against cell death. Although, the mechanisms involved in its protective effects are yet to be well understood. In previous studies from our group, it has been shown in both in vitro and in vivo models that under glucose deprivation, impaired autophagosome degradation contributes to neuronal death. In these conditions, addition of the D isomer of β HB (D- β HB) stimulates the autophagic flux. However, whether BHB can downregulate autophagy initiation in neurons exposed to glucose deprivation is still unknown. In the present thesis we aimed to investigate the role of the mTOR/AMPK pathway in the activation of autophagy during periods of glucose deprivation followed by periods of glucose reintroduction in cultured cortical neurons, as well as the possible regulatory effect of the ketone body D-BHB. The changes in total content and phosphorylation status of the autophagy proteins, ULK1, mTOR and AMPK, and in the abundance of BECN1, SQSTM1/p62 and LC3-II/LC3-I, were monitored at different times after glucose deprivation and its reintroduction. Results indicate that autophagy is activated in the glucose deprivation period, as suggested by an

increase in AMPK (pAMPK T172) and ULK1 (pULK1 S317) and a decreased in mTOR (mTOR pS2448). Meanwhile, during glucose reintroduction no reactivation of autophagy was found, but rather degradation of autophagosomes. D-BHB showed no effect on autophagy initiation, but accelerated autophagic degradation, therefore restoring the autophagic flux.

1. Introducción

1.1 La glucosa en el cerebro

El cerebro humano es uno de los órganos metabólicamente más activo, siendo la glucosa la principal fuente de energía. En el sistema nervioso central, el consumo de glucosa representa alrededor del 20% de la glucosa circulante (Mergenthaler et al., 2013), con la mayor parte de la glucosa, aproximadamente 90%, utilizada para la síntesis de ATP (Henderson, 2008).

El metabolismo de la glucosa proporciona la energía necesaria para diversas funciones fisiológicas en el cerebro como el mantenimiento de los potenciales de membrana en reposo, la generación de potenciales de acción y es importante para el reciclaje y la síntesis de diversos precursores de neurotransmisores y neuromoduladores como el glutamato, aspartato, glicina y serina (Ritter, 2017 & Mergenthaler et al., 2013). Por lo que el suministro y la regulación metabólica de la glucosa es crítica para la función fisiológica del cerebro.

Dado que las neuronas no pueden sintetizar glucosa ni almacenarla en forma de glucógeno como en los astrocitos, el cerebro requiere de un suministro continuo de glucosa procedente de la circulación sanguínea. Debido a la naturaleza hidrofílica de la glucosa, esta no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por simple difusión. No obstante, gracias a la existencia de un gradiente de concentración de la glucosa entre la sangre y el cerebro, su transporte es impulsado por medio de difusión facilitada a través de la BHE mediada por los transportadores de glucosa (GLUT) (Mergenthaler et al., 2013).

Entre los principales transportadores de glucosa en el cerebro están GLUT1 y GLUT3. Ambos transportadores se encuentran distribuidos de manera heterogénea en el cerebro, debido a las diferencias en la demanda local de glucosa (Duelli & Kuschinsky, 2001; Koepsell, 2020 & Vultur et al., 2022).

Específicamente, el transportador de glucosa GLUT1 existe en dos isoformas en el cerebro. La isoforma más glicosilada se localiza en las membranas de las células endoteliales cerebrales y asegura el transporte de la glucosa a través de la BHE. Mientras que la isoforma menos glicosilada se expresa en el extremo perivascular de los astrocitos (Duelli & Kuschinsky, 2001). Después de que la glucosa es transportada a los astrocitos por GLUT1, esta se metaboliza a lactato que se transporta por medio de los transportadores de monocarboxilatos (MCTs) a las neuronas para ser utilizado como fuente de energía (Koepsell, 2020).

Por otro lado, GLUT3 es el transportador de glucosa con mayor expresión en neuronas, principalmente en axones y dendritas (Ritter, 2017). La capacidad de transporte de GLUT3 es aproximadamente cinco veces mayor que la de GLUT1 (con una constante de Michaelis-Menten menor para GLUT3 en comparación de GLUT1, es decir el transportador GLUT3 necesita menor concentración de glucosa ($\sim 3\text{mM}$) que GLUT1 ($\sim 10 - 20\text{mM}$) para alcanzar el 50% de la velocidad máxima de reacción), garantizando que las neuronas tengan suministros de glucosa continuos y niveles de glucosa poco variables (Custódio et al., 2021; Duelli & Kuschinsky, 2001; Ritter, 2017 & Mergenthaler et al., 2013).

Además del suministro de energía para llevar a cabo la actividad neuronal, los transportadores cerebrales de glucosa participan en la detección de las concentraciones de glucosa en la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el intersticio cerebral, como un proceso de regulación central de la homeostasis de la glucosa (Koepsell, 2020).

1.2 Hipoglucemia

En condiciones fisiológicas (80- 90mg/dl de glucosa), la tasa de transporte de glucosa de la sangre al cerebro supera la tasa de metabolismo cerebral (Haces del Blanco & Massieu, 2005; & Cryer, 2007). No obstante, existen diversos factores que disminuye la concentración de glucosa en plasma, como la hipoglucemia severa, limitando su metabolismo energético que resulta en daño neuronal en diversas regiones del cerebro, como la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado (Haces del Blanco & Massieu, 2005; Blomqvist et al., 1991 & Cryer, 2007).

Durante la hipoglucemia, diversas defensas fisiológicas se activan para contrarrestar esta respuesta (Cryer, 2007):

1. La disminución en la secreción de insulina de las células β pancreáticas cuando se alcanzan niveles glicémicos de aproximadamente 81mg/dl (4.5mM).
2. El aumento de la secreción de glucagón de las células β pancreáticas y de adrenalina de las células cromafines cuando los niveles glicémicos descienden por debajo del rango fisiológico de 68mg/dl (3.8mM).

3. Si los niveles glicémicos siguen disminuyendo a 54mg/dl (3 mM), se desencadena una serie de síntomas neurogénicos y neuroglucopénicos que provocan la defensa conductual que consiste en la ingesta de alimentos.

Cuando estas defensas no consiguen prevenir el episodio hipoglucémico (<50mg/dl o 2.8 mM), esto resulta en alteraciones en la función cognitiva, convulsiones, coma (<20mg/dl) (Haces del Blanco & Massieu, 2005) y daño neuronal, el último como consecuencia de la liberación excesiva de glutamato y la activación de receptores glutamatérgicos provocando un desbalance en la homeostasis iónica de Na⁺ y Ca²⁺ de las neuronas (Haces del Blanco & Massieu, 2005), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la activación excesiva de la NADPH oxidasa (Suh et al., 2007).

1.3 Tipos de autofagia

La autofagia es un mecanismo altamente conservado en la evolución de supervivencia y homeostasis celular que está presente en células eucariontes, por el cual las células degradan macromoléculas y organelos. Este reciclaje de componentes celulares, a partir de su degradación en el lisosoma, es crucial para obtener elementos para la síntesis de nuevas macromoléculas y moléculas necesarias para el metabolismo normal y homeostático en las células (Gerónimo-Olvera & Massieu, 2019). A su vez, la autofagia promueve la supervivencia celular en condiciones patológicas como son la ausencia de nutrientes o de factores tróficos, el estrés oxidante, la proteotoxicidad causada por la acumulación de proteínas dañadas, el daño mitocondrial y el daño lisosomal, al promover la degradación de proteínas, así como de las moléculas y organelos dañados.

Existen diferentes tipos de autofagia denominados microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas:

- **Microautofagia:**

Es el proceso por el cual el contenido citoplasmático (incluyendo proteínas citosólicas solubles (Sahu et al., 2011)) es degradado en el lisosoma o endosoma por medio de invaginaciones o deformaciones de la membrana lisosomal (Parzych & Klionsky, 2014).

- **Autofagia mediada por chaperonas:**

Este tipo de autofagia, descrita únicamente en células de mamíferos, es altamente específica para proteínas marcadas con un motivo pentapéptido relacionado bioquímicamente con KFERQ (Parzych & Klionsky, 2014). En general, las chaperonas citosólicas despliegan las proteínas marcadas con este motivo y las translocan a la membrana lisosomal para posteriormente ser transportadas al interior del lisosoma para su degradación a través de la proteína asociada a los lisosomas 2A (LAMP2) (Dice, 2007).

- **Macroautofagia:**

Este estudio experimental se centra en la macroautofagia y será referida como autofagia de aquí en adelante en esta tesis.

A diferencia de la microautofagia, la autofagia se distingue debido a que el lugar de secuestro de los componentes celulares se inicia lejos de la membrana limitante del lisosoma e implica la formación de vesículas de secuestro (Parzych &

Klionsky, 2014). En la autofagia, los componentes citoplásmicos como porciones de citoplasma, proteínas y organelos, se aíslan del resto de la célula dentro de una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma que, posteriormente se fusiona con un lisosoma formando un autolisosoma el cual se encarga de la degradación de los componentes celulares contenidos en el autofagosoma (Hurley & Young, 2017), teniendo como función promover el mantenimiento de la homeostasis celular al aumentar el suministro celular de lípidos, aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos que serán usados posteriormente para la formación de proteínas y componentes celulares necesarios para la sobrevivencia celular.

1.3.1 Señales de activación de la autofagia

La autofagia es un mecanismo homeostático de las células que ocurre de manera basal pero que se activa como una respuesta adaptativa o de protección bajo estrés metabólico celular como la privación de nutrientes. Si en estas condiciones la autofagia es deficiente o excesiva puede conducir a la muerte celular (Kroemer, Mariño & Levine, 2010; Gerónimo-Olvera & Massieu, 2019).

En los mamíferos, la detección de aminoácidos, carbohidratos y señales adicionales, como factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno regulan la actividad de dos proteínas cinasas: mTOR que forma parte del complejo mTORC1 y la cinasa de AMP (AMPK), las cuales regulan río arriba la autofagia a través de la fosforilación de ULK1 (Fig. 1).

Específicamente, mTORC1, integra varias vías de señalización para promover distintos procesos anabólicos que involucran el crecimiento celular, como

la síntesis de proteínas y a su vez inhibir el catabolismo celular (Schmeisser & Parker, 2019). Además, mTORC1 se encuentra regulado río arriba por la vía de señalización PI3K/AKT, la cual suprime al Complejo de Esclerosis Tuberosa 1 y 2 (TSC1/TSC2) (Garza-Lombó, Schroder, Reyes-Reyes & Franco, 2018). Esto es de gran relevancia debido a que TSC1/2 es un importante regulador negativo de mTORC1. Por lo que, durante condiciones normales o de exceso de nutrientes, TSC1 se encuentra regulado negativamente, lo que promueve la actividad de mTORC1 quien inhibe la autofagia al fosforilar la Ser757 de ULK1 impidiendo su activación. Esto promueve la síntesis de proteínas al fosforilar a la cinasa de la proteína ribosomal S6 (p70 S6K) y a la proteína de unión al factor de inicio de la traducción en eucariontes (4E-BP). Por el contrario, en condiciones de deficiencia de nutrientes, estrés metabólico o en tratamiento con rapamicina, la inactivación de mTORC1 induce la activación de la autofagia por medio de su incapacidad de fosforilar e inhibir a ULK1 (Fig. 1).

Por otro lado, y opuesto a la actividad de mTORC1, se encuentra la AMPK, que es considerada un sensor en la relación ADP/ATP en la célula (Alers, Loffler, Wesselborg & Stork, 2011). Estados de estrés metabólico, es decir cuando la relación de ADP/ATP es alta, la activación de la AMPK por su fosforilación en la Thr172 da como resultado la iniciación de la autofagia por dos mecanismos diferentes: por un lado la activación de la AMPK bloquea la actividad inhibidora del complejo mTORC1 sobre complejo ULK1 impidiendo su fosforilación en la Ser757, y alternativamente la AMPK activa directamente la autofagia al activar el complejo ULK1 por su fosforilación en la Ser317, para iniciar la formación de autofagosomas

(Hurley & Young, 2017) (Fig. 1). Por lo que la sobreactivación de la AMPK y como consecuencia la inhibición de la vía de mTOR, puede ser una de las responsables de la iniciación de la autofagia y por ende del aumento en la formación de autofagosomas observada durante el estrés metabólico.

1.3.2 Maquinaria de la autofagia

La autofagia es un proceso complejo que se divide en diferentes etapas, entre ellas: la iniciación, nucleación, elongación y maduración del autofagosoma, fusión (formación del autolisosoma) y degradación del cargo.

- **Iniciación:**

El primer paso es la iniciación y ocurre por la activación de la cinasa ULK1 (por ejemplo: en condiciones de deficiencia de nutrientes), la cual es parte de un complejo proteico que contiene a las proteínas ATG13, ATG101 y FIP200 (Kohli & Roth, 2010; Chang N. C., 2020).

- **Nucleación:**

Después de la activación del complejo que contiene a ULK1, esta enzima fosforila y activa a Beclin-1 (BECN1). Los complejos activos ULK1 y BECN1 se reubican en el sitio de iniciación del autofagosoma, llamado el fagóforo, que en la mayoría de los casos corresponde a la membrana del retículo endoplásmico. En este sitio, la nucleación de la vesícula involucra la activación de VPS34, una fosfatidil-inositol 3-cinasa de clase III (PI3K), que ocurre mediante la formación de un complejo que contiene a las proteínas BECN1, UVRAG, AMBRA1, VPS15 y ATG14, y que produce fosfatidil-inositol-3fosfato (PI3P) (Kohli & Roth, 2010; Chang

N. C., 2020). El PI3P es necesario para la nucleación y formación inicial de la membrana del fagóforo al reclutar las proteínas relacionadas con la autofagia con dominios de unión a PI3P (Kocaturk & Gozuacik, 2018).

- Elongación:

La elongación de la membrana autofagosomal depende de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina y del transporte de precursores de membrana mediado por ATG9 (Yang et al., 2015).

En el primer sistema, ATG12 se conjuga covalentemente a la proteína ATG5 por medio de la acción de la enzima tipo E1: ATG7 y de la enzima tipo E2: ATG10 (Kohli & Roth, 2010 & Chang N. C., 2020). Posteriormente, el reclutamiento de la proteína ATG16L1 al dímero formado por ATG12/5 resulta en la formación de un complejo más grande que sirve como ligasas E3, que ancla a la proteína LC3 a la membrana del fagóforo al ligarla covalentemente a la fosfatidiletanolamina (PE) y promueve la elongación de la membrana autofágica (Kocaturk & Gozuacik, 2018; Chang N. C., 2020).

El segundo sistema, involucra la conversión de la forma soluble de LC3/ATG8, conocido como LC3, a la forma asociada a la membrana autofagosomal conocida como LC3-II, que se conjuga con PE. La conversión de LC3 a LC3-II es mediada por la acción de una proteasa: ATG4, que corta a LC3 en LC3-I, luego una enzima tipo E1: ATG7, la enzima tipo E2: ATG3 y el complejo E3: ATG5-ATG12&ATG16L lipidan a LC3-I. resultando en LC3-II (Kohli & Roth, 2010; Chang N. C., 2020). La lipidación y redistribución de la proteína LC3 (LC3-II) al fagóforo

contribuye al aislamiento de los componentes o cargos a degradar dentro la vesícula de doble membrana, que fueron reconocidos anteriormente por un receptor autofágico como el receptor SQSTM1/p62.

- Maduración y degradación de componentes celulares:

Finalmente, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas y su contenido se degrada por la actividad hidrolítica de las enzimas lisosomales. Además, la degradación de SQSTM1/p62 sirve como un indicador de la degradación del contenido cargo, es decir el flujo autofágico (Kroemer, Mariño & Levine, 2010; Chang N. C., 2020).

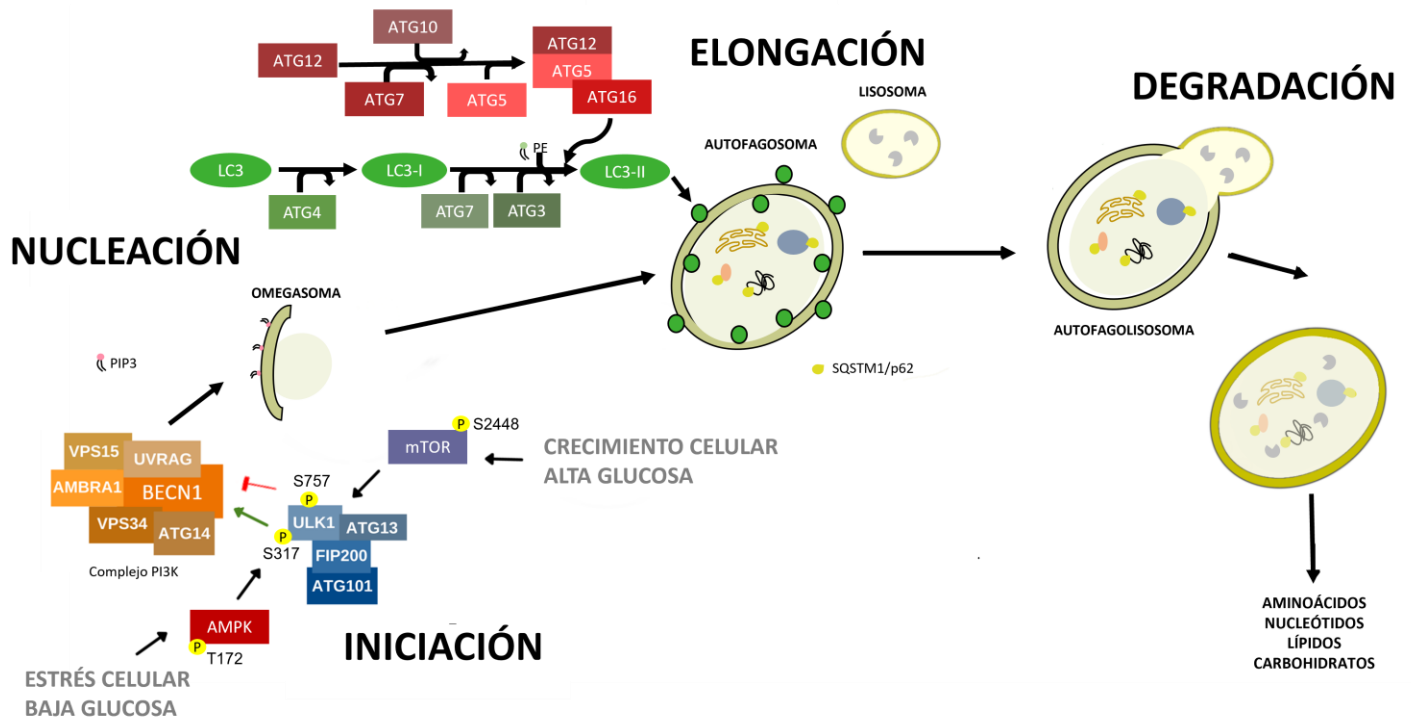


Figura 1: **Esquema de las etapas de la autofagia.** La autofagia comprende diversas etapas: iniciación, nucleación y elongación del fagóforo, maduración del autofagosoma, y degradación del autofagosoma después de su fusión con el lisosoma. (Modificado de Chang N. C., 2020).

1.3.2 Autofagia y SNC

Aunque inicialmente la autofagia fue caracterizada como una vía de degradación inducida para proteger contra la deficiencia de nutrientes, se ha vuelto cada vez más claro que la autofagia también juega un papel importante en la homeostasis de las células que no necesariamente tienen deficiencias de nutrientes. Los defectos en la autofagia se han relacionado con varias enfermedades humanas, incluidas las neurodegenerativas y el cáncer, por lo que ha aumentado el interés en encontrar mecanismos por los cuales se pueda modular la autofagia como un tratamiento potencial para diversas enfermedades (Thellung et al., 2019).

La autofagia es particularmente relevante en el caso de las neuronas para el mantenimiento de la homeostasis neuronal y el reciclamiento de los componentes celulares, ya que al ser células postmitóticas no son reemplazadas después de su pérdida o daño debido a que el proceso de neurogénesis es limitado. Por lo que, es fundamental que las neuronas sean capaces de activar mecanismos que las protejan contra la acumulación de proteínas citosólicas o membranas dañadas como la autofagia (Tooze & Schiavo, 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, las células nerviosas son altamente vulnerables a la alteración o interrupción en el suministro de glucosa, las cuales son un factor importante de la fisiopatología de distintas enfermedades y trastornos cerebrales. Por ejemplo, la interrupción del suministro de glucosa en el cerebro, observado durante la isquemia cerebral contribuye de manera importante al daño cerebral subsecuente. Adicionalmente, se ha observado que estados

hipoglucémicos, asociados al tratamiento con insulina en pacientes con diabetes tipo I, alteran el funcionamiento normal del cerebro. Más aún si la disminución de glucosa llega a ser tan severa que conduzca al estado de coma, se produce daño cerebral irreversible (Languren et al., 2013).

Se han identificado diversos mecanismos que contribuyen a la muerte por privación de glucosa (GD), entre ellos la deficiencia de ATP y la disfunción de la bomba de Na^+/K^+ tanto en modelos *in vivo* e *in vitro*. La GD induce daño excitotóxico debido a la liberación excesiva de glutamato y a la deficiencia en su remoción. La falla energética induce la despolarización de la membrana presináptica, la entrada de Ca^{2+} y la liberación de glutamato. El glutamato no es removido eficientemente del espacio sináptico debido al funcionamiento deficiente o inverso de los transportadores de aminoácidos excitadores dependientes de Na^+ , encargados de capturarlo. El exceso de glutamato sináptico induce la entrada de Ca^{2+} por los receptores a glutamato de tipo NMDA, lo que altera la homeóstasis de Ca^{2+} intracelular y activa diversas enzimas dependientes de calcio como proteasas, fosfatasas y lipasas, y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que contribuye a la muerte neuronal (Páramo et al. 2010, Julio-Amilpas et al. 2015; Langurén et al. 2013). No obstante, las respuestas adaptativas del cerebro ante el estrés energético causado por la GD, entre ellas la autofagia, no se conocen del todo, ni su contribución a la sobrevivencia o daño subsecuente.

Se conoce que el ayuno por 24 a 48 h induce la autofagia en distintas regiones del cerebro posiblemente como una respuesta a la ausencia de nutrientes (Alirezai et al., 2010). Sin embargo, la autofagia también puede contribuir a la

muerte en condiciones agudas de la GD y excitotoxicidad como recientemente identificamos en distintos modelos *in vivo* (Montiel et al. 2020; Torres Esquivel 2020; Montiel et al. en preparación).

La supresión de la autofagia basal debido a la delección de genes esenciales para la formación de autofagosomas como ATG5 o ATG7 se ha relacionado con la inducción de neurodegeneración (Hara et al., 2006), y defectos en la autofagia se han sugerido como factores asociados a la neuropatología de desórdenes neurológicos agudos como el trauma y la isquemia cerebral (Sarkar et al., 2015) y enfermedades neurodegenerativas progresivas como la esclerosis lateral amiotrófica (Valenzuela, Nassif & Hetz, 2018), la enfermedad de Alzheimer (Uddin et al., 2018) y la enfermedad de Parkinson (Zhu et al., 2019). La deficiencia en la respuesta autofágica, observada en enfermedades análogas en animales experimentales, contribuye a la acumulación de agregados de proteínas en distintas regiones del cerebro, y a la formación de cuerpos de inclusión que afectan la función neuronal. Por lo que el actuar sobre las señales reguladoras río arriba de la autofagia como mTOR o la AMPK podrían ejercer mecanismos compensatorios a su desregulación.

1.3.3 Papel de la autofagia durante estados hipoglucémicos

En estudios previos, se ha descrito el papel de la autofagia y su dinámica durante el daño inducido por la GD y reintroducción de glucosa (GR) en neuronas (Gerónimo-Olvera et al. 2017). En este estudio se realizó un curso temporal de la formación de los autofagosomas y la degradación del contenido autofagolisosomal

durante los periodos de GD y GR en neuronas corticales en cultivo, a través del análisis de los cambios en las proteínas BECN1, LC3-II y SQSTM1/p62. Se observó que, las neuronas responden rápidamente a la GD aumentando la formación de autofagosomas, que se acumulan durante la GR, consecuencia de un flujo autofágico deficiente que posiblemente se deba al agotamiento de ATP necesario para la actividad de la bomba de H⁺ lisosomal, resultando en la disminución de la actividad de los lisosomas y su correcta fusión con el autofagosoma. Por lo que, la autofagia defectuosa inducida durante la GD/GR contribuye a la muerte neuronal observada en estas condiciones, ya que al silenciar con RNAs de interferencia a la proteína ATG7, que es esencial para la formación de los autofagosomas, aumenta la viabilidad de las neuronas (Gerónimo-Olvera et al. 2017).

Por otro lado, durante la GR se observó que la actividad de la proteasa activada por calcio, calpaína, promueve la disfunción lisosomal al realizar el corte proteolítico de la proteína de membrana lisosomal, LAMP2, lo que induce un aumento en la permeabilidad de la membrana y la salida de proteasas como la catepsina B al citosol. Esta disfunción lisosomal mediada por calpaína produce una respuesta autofágica defectuosa, lo que contribuye a la muerte neuronal (Gerónimo-Olvera et al. 2017).

De manera similar en un estudio *in vivo*, en donde se induce la GD en el cerebro mediante la administración de una sobredosis de insulina, se observó que la autofagia es activada durante el periodo de hipoglucemia severa, lo que da lugar a la acumulación de autofagosomas debido a una degradación deficiente, evidenciada por un aumento en LC3-II que no se acompaña de una disminución en

el contenido de SQSTM1/p62, tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo (Torres-Esquivel et al. 2020).

En este estudio también se observó que horas después del rescate con glucosa del coma hipoglucémico, la autofagia se activa en el hipocampo de una manera dependiente de activación de AMPK, pero independiente de mTOR, induciendo la fosforilación de ULK1 en la Ser317 (Torres-Esquivel et al. 2020). Estos resultados sugieren que la acumulación de autofagosomas observada en condiciones de GD, puede deberse no sólo a una falla en la degradación lisosomal que conduce a la acumulación de autofagosomas, sino ser consecuencia de la activación de señales río arriba que participan en la iniciación de la autofagia produciendo su activación sostenida por un largo periodo de tiempo. Estos resultados nos llevan a concluir que, durante la privación aguda de glucosa, la autofagia no tiene una función adaptativa sino por el contrario contribuye a la muerte (Torres-Esquivel et al. 2020).

Los efectos deletéreos de la autofagia deficiente o excesiva pueden compensarse utilizando herramientas que atenúen su activación o que mejoren la degradación autofágica. Este es el caso de las neuronas corticales en cultivo en donde se observó que la inhibición del corte proteolítico de LAMP2, a través de la inhibición de la actividad de la calpaína, restablece la función lisosomal y mejora la sobrevivencia celular (Gerónimo-Olvera et al. 2017). Alternativamente, hemos observado que la incubación con un sustrato energético alternativo a la glucosa, como el cuerpo cetónico β -hidroxibutirato (β HB), restaura el flujo autofágico en neuronas de corteza en cultivo y atenúa la activación de la autofagia inducida por la

lesión excitotóxica y por la hipoglicemia severa mejorando la supervivencia neuronal (Gerónimo-Olvera et al. 2017; Montiel et al. 2020; Torres-Esquivel 2020).

1.4 Cuerpos cetónicos

Aunque la glucosa es la principal fuente de energía para el cerebro, en los últimos años se ha reconocido que los cuerpos cetónicos, también pueden ser utilizados como fuente de energía, particularmente en situaciones de ayuno, ejercicio o en dietas altas en grasa y privación de glucosa.

Los cuerpos cetónicos son producidos principalmente por el hígado a partir de la oxidación de ácidos grasos. Durante el ayuno se estimula la lipólisis en los adipocitos lo que lleva a la liberación de ácidos grasos y a la cetogénesis a partir de la producción de aceto-CoA por la beta-oxidación. La cetogénesis requiere la acción de al menos tres enzimas: la acetoacetyl-CoA tiolasa mitocondrial, la hidroximetilglutaril-CoA sintasa HMG-CoA sintasa (HMGCS2) y la HMG-CoA liasa. El primer paso de la cetogénesis es la formación de acetoacetyl-CoA, que se deriva de dos moléculas de acetyl-CoA por la enzima tiolasa, posteriormente se forma HMG-CoA por medio de la HMGCS2, siendo este paso el limitante de la velocidad de reacción, y que está regulado por la insulina y el glucagón. La enzima HMG-CoA liasa posteriormente elimina una acetyl-CoA de la HMG-CoA para producir el acetoacetato. Este a su vez se puede degradar por una reacción espontánea a acetona, que tiene una contribución metabólica mínima debido a su volatilidad, o puede formar el β HB, el cuerpo cetónico más abundante en la circulación humana, por medio de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa (BDH) (Grabacka, Pierzchalska, Dean & Reiss, 2016).

Ya sintetizados el acetoacetato y β HB, son liberados a la circulación sanguínea para su metabolismo en tejidos extrahepáticos, ya que no son utilizados en el hígado al carecer de la enzima succinil-CoA: 3-cetoácido coenzima A transferasa (SCOT) importante para la cetólisis.

1.4.1 Transporte y metabolismo de los cuerpos cetónicos en el cerebro

La captación de cuerpos cetónicos al cerebro se da a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y depende de los transportadores de monocarboxilatos (MCTs), el transportador MCT1 en la BHE, MCT4 en astrocitos y MCT2 (mayor afinidad por el β HB) en neuronas (Fig. 2), sugiriendo que una mayor absorción del BHB se deba a una regulación positiva de la expresión de los MCTs (Jensen, Wodschow, Nilsson & Rungby, 2020). Una vez que el BHB y el acetoacetato son transportados al cerebro, se vuelven a convertir en acetil-CoA, que entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para la generación de ATP. La conversión ocurre dentro de las mitocondrias donde el β HB se transforma en acetoacetato por la BDH produciendo NADH y después el acetoacetato se cataboliza a acetoacetil-CoA por la succinil-CoA: 3-cetoácido coenzima A transferasa (SCOT), y finalmente la acetoacetil-CoA se convierte de nuevo en dos acetil-CoA para ingresar al TCA produciendo NADH utilizado para el transporte de electrones en la mitocondria requerido para la síntesis de ATP (Fig. 2).

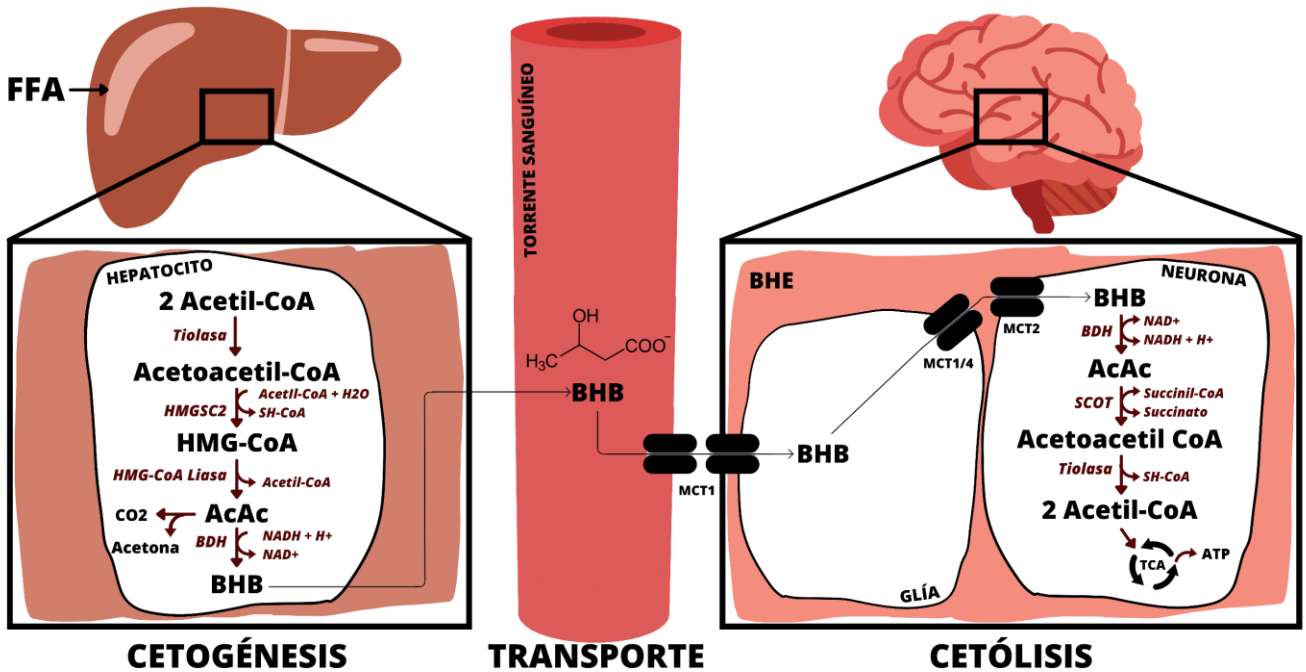


Figura 2: Síntesis, transporte y metabolismo de cuerpos cetónicos. (Jensen, Wodschow, Nilsson & Rungby, 2020)

A diferencia de la glucosa, el catabolismo del β HB y acetoacetato no requiere de la vía glucolítica, por lo tanto, no utiliza ATP y provee de forma directa acetil-CoA mediante su oxidación directa en la mitocondria (García-Rodríguez & Giménez-Cassina, 2021). Además, la oxidación del BHB reduce únicamente una molécula de NAD⁺ en el citosol, mientras que la glucosa reduce cuatro moléculas de NAD⁺ (Elamin, Ruskin, Masino & Sacchetti, 2017), por lo que menos moléculas de NAD⁺ son consumidas para producir ATP en comparación a la glucosa resultando en un aumento del cociente NAD⁺/NADH, lo que constituye una ventaja energética (Fig. 3). Además, el NAD⁺ es una molécula señalizadora y un cosustrato de enzimas que participan en otras rutas como las sirtuínas.

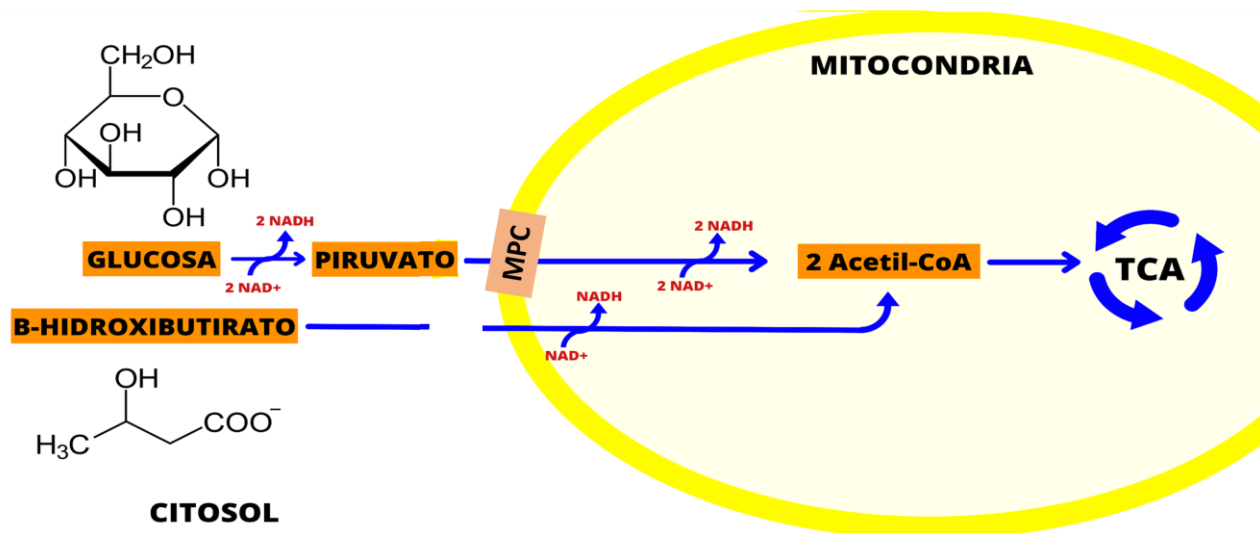


Figura 3: *Diferencias en el consumo de NAD+ durante el catabolismo de la glucosa y β-hidroxibutirato.* (Modificado de Elamin, Ruskin, Masino & Sacchetti, 2017), MPC: Carreador mitocondrial de piruvato. TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

1.4.2 Efectos protectores de los cuerpos cetónicos

Hoy en día, existen numerosos estudios que muestran los efectos protectores de los cuerpos cetónicos en el SN, debido a que son una fuente de energía alternativa en el cerebro durante estados deficientes de nutrientes y pueden compensar el hipometabolismo de la glucosa asociado al envejecimiento y a las enfermedades neurodegenerativas (Yang, Shan, Zhu, Wu & Wang, 2019). En distintas enfermedades y trastornos neurológicos, como la epilepsia (Simeone, Simeone & Rho, 2017), la enfermedad de Alzheimer (Hertz, Chen & Waagepetersen, 2015) y de Parkinson (Norwitz, Hu & Clarke, 2019), los cuerpos cetónicos, en especial el βHB se ha utilizado como tratamiento coadyuvante, surgiéndose como una herramienta terapéutica, recientemente denominada como cetoterapéutica, que actualmente representa un área de investigación muy activa.

La neurocetoterapéutica propone básicamente dos alternativas para elevar los niveles de los cuerpos cetónicos:

- 1) promover la producción endógena de cuerpos cetónicos utilizando los lípidos almacenados en el tejido adiposo y la cetogénesis hepática y,
- 2) utilizando la administración exógena de los cuerpos cetónicos.

Dentro de la primera alternativa se encuentran la dieta cetogénica, el consumo de triglicéridos de cadena media, la restricción calórica y el ayuno intermitente. La segunda alternativa comprende tratamientos basados en la administración intravenosa, parenteral, u oral de los cuerpos cetónicos o sus derivados como los ésteres del BHB (Camberos-Luna et al. 2020).

Ambas intervenciones aumentan los niveles de cuerpos cetónicos en sangre y favorecen su utilización como combustible energético en tejidos extrahepáticos como el cerebro. No obstante, existen diversos factores que las diferencian, uno es que el enfoque endógeno requiere del uso de tratamientos continuos o crónicos antes de que se estimule la cetogénesis y se observen niveles elevados de estos en sangre. De igual forma, se ha observado que esta intervención regula a la alta la expresión de MCTs, importantes en el transporte de cetonas a las células. Mientras que, en el enfoque exógeno se observa una rápida elevación de cetonas en la sangre, aproximadamente entre 30 minutos hasta 6 horas de la administración exógena, pero al igual que el enfoque endógeno el mantenimiento del metabolismo de cetonas requiere de administraciones repetidas (Camberos-Luna et al. 2020).

Debido a que la administración exógena de cuerpos cetónicos tiene menores efectos secundarios (como la acidosis metabólica e hipercolesterolemia) y no requiere de muchos esfuerzos para seguir dietas estrictas y poco apetecibles por grandes periodos de tiempo, el abandono por parte de los pacientes de este tipo de intervención es muy poca a diferencia de la intervención endógena.

En general, la reducción del consumo de glucosa en una dieta cetogénica da lugar a un cambio hacia el metabolismo de grasas, mejorando la disponibilidad y utilización de la energía. El uso de cuerpos cetónicos como principal fuente de energía aumentan la razón de NAD^+/NADH y disminuyen la razón de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Elamin et al. 2017 & Veech, 2004), los cuales son esenciales para modular el metabolismo celular y mantener la homeostasis redox celular (Tabla 1).

Varios estudios han mostrado que los cuerpos cetónicos tienen una gran diversidad de efectos sobre las células y especialmente las neuronas. Los cuerpos cetónicos dan lugar a respuestas inmediatas al modular canales iónicos, transportadores y receptores, y neurotransmisores como el GABA; así como respuestas adaptativas a largo plazo, ya sea al modular la expresión genética o la regulación epigenética al inhibir las deacetilasas de histonas (HDACs) y aumentar la expresión de genes relacionados con la neuroprotección como son el BDNF, genes relacionados con respuestas antioxidantes como SOD, CAT y GSH, y genes que atenúan la neuroinflamación y la neurodegeneración (Field et al., 2021, García-Rodríguez & Giménez-Cassina, 2021, & Newman & Verdin, 2017) (Tabla 1).

De la misma manera, y a lo que nos concierne, los efectos de la dieta cetogénica y la administración exógena de cuerpos cetónicos, pueden proteger al cerebro de la hipoxia, excitotoxicidad, hipoglucemia y enfermedades neurodegenerativas (Camberos-Luna et al., 2020) (Tabla 1).

Sin embargo, los mecanismos subyacentes de los efectos neuroprotectores de los cuerpos cetónicos aún no se han dilucidado completamente.

Acción	Cuerpo Cetónico	Mecanismo	Relevancia Terapéutica / Fisiológica	Autores
Antioxidante	Dieta Cetogénica (MCT) / BHB BHB / AcAc BHB	Aumento en la razón NAD ⁺ /NADH Reducción en la razón NADP ⁺ /NADPH Aumento de eficiencia en la producción de ATP Disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación Regulación a la alta de enzimas SOD, CAT y GSH Mejora en la estructura y función mitocondrial: producción de energía y mejor balance redox.	Neurodegeneración, EA, Parkinson, longevidad y condiciones fisiológicas Privación de glucosa, hipoglucemia Isquemia Cerebral, Hipoglucemia Daño renal Lesión Cerebral Traumática	Elamin et al. 2017 Veech, 2004 Kashiwaya et al. 2000 Xin et al. 2018 Julio-Amilpas et al. 2015 Camberos-Luna 2016 Suzuki et al. 2001 Wei et al. 2014 Davis et al. 2008
Antiinflamación	BHB	Inhibición del inflamósoma NLRP3, al inhibir la salida de K ⁺ Reducción de la expresión de IL-1 β y TNF- α Activación del receptor GPR109a	Enfermedades mediadas por NLRP3 Depresión / Trastornos relacionados con el estrés Enfermedad de Parkinson	Youm et al. 2015 & Freeman & Ting, 2015. Yamanashi et al. 2017 Fu et al. 2015
Autofagia	BHB	Promueve el flujo autofágico: reducción de la relación de LC3-III/LC3-I y de SQSTM1/p62. Regulación de la autofagia Inhibe AKT, promueve expresión de FOXO y activa a la AMPK	EA, Privación de glucosa Hipoglucemia, Excitotoxicidad mediada por NMDA Condiciones Fisiológicas	Hu et al. 2017 Camberos-Luna et al. 2016 Torres-Esquivel et al. 2020 & Montiel et al. 2020 Newman & Verdin, 2017
Genética - Epigenética	BHB	B-hidroxitubirilación de la H3K9, asociado a promotores de genes transcripcionalmente activos. Inhibición de la Deacetilasas de histonas de clase I (HDACs), dando lugar a la expresión de genes como: FOXO3A, MT2, BDNF	Condiciones fisiológicas - relevancia en trastornos metabólicos (Diabetes Tipo I (inducida por estreptozocina)) Protección estrés oxidante Ejercicio - Aumento en bioenergética Neuroprotección	Xie et al. 2016 Shimazu et al. 2013 Sleiman et al. 2016 Hu et al. 2018
Neurotransmisión	BHB AcAc	Promueve síntesis de GABA Eleva la transcripción de las subunidades GRIN2A and GRIN2B de los NMDAR, restaurando la función sináptica mediada por NMDAR Inhibe los transportadores de glutamato (VGLUT) por inhibición competitiva con el Cl ⁻ , disminuyendo la liberación de glutamato	Epilepsia Autismo Epilepsia	Yudkoff et al. 2005 & 2007 Qin, Ma & Yan, 2021 Juge, et al. 2010

Tabla 1: Efectos protectores de los cuerpos cetónicos.

1.4.3 Quiralidad del β -Hidroxibutirato

La quiralidad es la propiedad que tiene una molécula de no superponerse a su imagen especular mediante traslaciones o rotaciones (Liu, Tian & Jiang, 2017).

La quiralidad puede tener efectos bioquímicos y biofísicos importantes debido a su interacción con otras biomoléculas. Por ejemplo, la quiralidad puede afectar: la velocidad de disolución, su transporte y/o captación, ya que se pueden unir de manera diferente a su transportador; su metabolismo, afectando su unión al sitio activo de las enzimas que la metabolizan, su toxicidad, etcétera (Di & Kerns, 2016).

El β HB es una molécula quiral en su grupo 3'-OH, es decir existen dos enantiómeros de este compuesto, el S/L- β HB y el R/D- β HB. Este último enantiómero es el único que es producido metabólicamente en el organismo de mamíferos en condiciones normales mediante la restricción calórica, el ejercicio, o la dieta cetogénica. Esta especificidad quiral se debe a la enzima BDH1, que cataliza el paso final de la síntesis del BHB, dando como resultado que el D- β HB pueda ser fácilmente catabolizado en acetil-CoA y ATP en el cerebro (Newman & Verdin, 2017).

No obstante, aunque el L- β HB no es un producto fisiológico del metabolismo de los mamíferos, este puede actuar como un intermediario transitorio en la β -oxidación (Lincoln, Des Rosiers & Brunengraber, 1987). De igual forma, puede unirse a los receptores celulares del D- β HB, pero con menos afinidad (Mierziak, Burgberger & Wojtasik, 2021). Finalmente, se ha encontrado evidencia de que el L-

β HB es un sustrato preferente para la síntesis de esteroides y ácidos grasos, y menos preferente para el metabolismo oxidativo, a diferencia del D- β HB (Webber & Edmond, 1977).

1.4.4 Efectos del D-BHB en la protección inducida por hipoglucemia y privación de glucosa

Dos modelos experimentales que han sido relevantes para investigar los mecanismos detrás de la protección del β HB y sus posibles efectos sobre la autofagia, son el modelo *in vivo* de hipoglucemia severa inducida por insulina y el modelo *in vitro* de GD/GR. Estos modelos experimentales están ligados a una reducción de la disponibilidad de glucosa para las neuronas favoreciendo el uso de otras fuentes de energía. Durante la hipoglucemia prolongada, los cuerpos cetónicos pueden sustituir a la glucosa y promover un estado energético favorable en el organismo, previniendo la muerte neuronal.

A lo que nos concierne, en estudios de GD en neuronas corticales *in vitro*, se ha investigado el rol neuroprotector del isómero D del β HB.

A nivel general, la administración del BHB actúa mejorando la supervivencia neuronal al reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y evitando la disminución de los niveles de ATP al preservar y estimular su producción (Julio-Amilpas et al. 2015). Estos hallazgos resaltan la importancia de β HB como neuroprotector en condiciones de estrés metabólico y su posible uso como un tratamiento ante eventos que limiten el aporte metabólico y energético a las neuronas.

De igual forma se ha estudiado la relación del BHB con la autofagia en este modelo experimental en neuronas corticales *in vitro* (Camberos-Luna, 2016). En condiciones control se observa una rápida formación de autofagosoma durante la GD detectado por el aumento de LC3-II, seguida de la degradación del contenido del autofagosoma, evidenciada por la disminución de la proteína SQSTM1/p62, cuando se reintroduce la glucosa. Mientras que, en presencia de D- β HB, la formación de autofagosomas disminuye significativamente (se reducen los niveles de LC3-II) y la tasa de degradación de SQSTM1/p62 es mayor. Los resultados sugieren que el D- β HB suplementado en este modelo promueve un flujo autofágico eficiente en las neuronas tanto durante la GD como GR, evitando la acumulación de autofagosomas y mejorando la supervivencia neuronal.

La reducción en los niveles de autofagosomas observada en las neuronas privadas de glucosa y suplementadas con D- β HB, podría ser consecuencia de la regulación de señales involucradas en la iniciación de la autofagia como la vía AMPK/mTOR.

Recientemente se investigó la dinámica de la autofagia en el cerebro de ratas sometidas a un periodo corto de coma hipoglucémico seguido de una infusión de glucosa, así como el posible efecto neuroprotector del β HB y su relación con la dinámica de la autofagia (Torres-Esquivel, 2020). En este estudio, se observó que en las ratas sometidas al coma hipoglucémico y rescatadas con glucosa, los niveles de LC3-II aumentaron en la corteza cerebral y en el hipocampo. Dicho aumento no se acompañó de una disminución en los niveles de SQSTM1/p62, sugiriendo la acumulación de autofagosomas en ambas áreas, posiblemente por una autofagia

defectuosa. Al evaluar el efecto del BHB administrado inmediatamente después del coma, se observó una reducción de los niveles de LC3-II y SQSTM1/p62, reestableciendo el flujo autofágico y mejorando la supervivencia neuronal. De igual forma, se observó un aumento en la fosforilación de activación de ULK1 en la S317 inducida por AMPK después de rescatar a las ratas del coma hipoglucémico al administrar glucosa. No obstante, los niveles de ULK1 S317 mostraron una reducción significativa por el tratamiento con β HB en las mismas condiciones, lo que sugiere la atenuación de las señales involucradas en la iniciación de la autofagia. Estos resultados, destacan la importancia del tratamiento con BHB en la modulación y en el restablecimiento de la dinámica autofágica después de un evento de estrés energético en neuronas.

2. Planteamiento del problema

De acuerdo con las observaciones descritas anteriormente la administración de BHB a ratas después del coma hipoglucémico y la incubación con β HB en neuronas en cultivo expuestas a la privación de glucosa, estimula el flujo autofágico evitando la acumulación de autofagosomas. Por otra parte, la fosforilación de ULK1 en la S317 por la AMPK, disminuye en las ratas tratadas con β HB después del coma hipoglucémico sugiriendo una menor activación de la autofagia. En el presente estudio nos propusimos investigar en el modelo in vitro de privación y reintroducción de glucosa en neuronas corticales, el papel de la vía de mTOR/AMPK en la activación de la autofagia, así como el efecto del cuerpo cetónico β HB sobre la activación de la autofagia a través de esta vía.

3. Hipótesis

La inhibición de la vía de mTOR y la activación de la AMPK participarán en la iniciación de la autofagia durante la privación y reintroducción de glucosa en neuronas corticales primarias cultivadas. El β HB promoverá un estado energético favorable que atenuará la activación de la autofagia a través de la vía de mTOR y AMPK, evitando que la autofagia se active de forma excesiva o disfuncional lo que favorecerá la supervivencia neuronal.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

- Conocer el papel de la vía de mTOR y AMPK en la iniciación de la autofagia durante la privación y reintroducción de glucosa en neuronas corticales cultivadas y su posible regulación por β HB.

4.2 Objetivos específicos:

- Someter a neuronas de corteza cerebral en cultivo a diferentes periodos de GD y GR en presencia o ausencia de β HB.
- Determinar los cambios en el contenido total de proteínas que participan en la iniciación de la autofagia: ULK1, BECN1, mTOR, AMPK, SQSTM1/p62, y LC3-II/LC3-I y en el estado de fosforilación de ULK1, mTOR y AMPK durante las condiciones control y experimentales.

5. Metodología

5.1 Cultivo primario de neuronas de corteza cerebral obtenidas de embriones de ratas de 17-18 días de gestación

Los cultivos primarios neuronales de corteza se prepararon a partir de embriones de rata de 17-18 días de gestación (E17-18), los cuales fueron manejados de acuerdo con los criterios de ética y de manejo de animales del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y al protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IFC (CICUAL LMT160-20).

Se extrajo la corteza cerebral de los embriones y las células se suspendieron en medio Neurobasal ((Gibco, NY, USA) conteniendo 25 mM de D-glucosa, 0.22 mM de piruvato de sodio, aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas) suplementado con 1% de B27, 1% de B27 sin antioxidantes (Gibco, NY, USA), 0.02 mg/ml de gentamicina (Gibco, NY, USA) y 0.5 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Las células fueron sembradas en cajas de Petri de 35 mm, previamente recubiertas con Poli-L-lisina a 5 µg/ml, a una densidad de 2.2×10^5 células / cm². A los 4 días *in vitro* (DIV) se añadió citosina-D-arabinosa 0.54 µM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) para evitar la proliferación de células gliales.

Las células se cultivaron durante 10 DIV a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ / 95% de aire.

5.2 Tratamientos experimentales

5.2.1 Privación de Glucosa:

A los 10 DIV, las células se expusieron a la GD con o sin D-βhidroxibutirato 10 mM (D-βHB, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), durante diferentes períodos de tiempo: 0.5 h, 1 h y 2 h. La GD se realizó al eliminar el medio Neurobasal y sustituirlo por medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY, USA) sin glucosa con o sin D-BHB

5.2.2 Reintroducción de Glucosa:

Para los experimentos de GR, primero se realizó la GD por 120 minutos con o sin D-βHB (10 mM). Seguido del periodo de GD, el medio sin glucosa (DMEM) se reemplazó por el medio Neurobasal en el que se cultivaron originalmente las células (período de reperfusión de glucosa, GR) con o sin D-βHB (5 mM) durante diferentes períodos de tiempo: 2 h, 4 h, 8 h, y 16 h.

5.3 InmunoBlot

Después de los tratamientos previamente descritos, las células fueron lavadas con PBS 0.1M y se realizó el raspado de células sobre hielo con 100 µl de buffer de lisis: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, SDS 1%, Tritón X-100 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, NaPPi 5mM, Na₃VO₄ 2mM y 2mg/ml de buffer de lisis con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche complete). Posteriormente, el raspado de células obtenido fue sonicado y centrifugado a 4,000 g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante (proteínas) fue desnaturalizado en buffer de Laemmli 2x y β-mercaptoetanol. Por medio del ensayo de Lowry se realizó la cuantificación de proteínas (kit DC Protein Assay, Bio-Rad, CA, USA).

Se corrieron 20 µg de proteína en geles de acrilamida (10% o 16%) obtenido de las condiciones control y de las distintas condiciones experimentales por medio de SDS-PAGE. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas en los geles de acrilamida a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF, Millipore, Massachusetts, USA).

5.4 Inmunoensayo

Las membranas se bloquearon en TBS/BSA 5% durante 1hr y se incubaron con anticuerpos primarios específicos contra las diferentes proteínas autofágicas: ULK1, pULK1 S317, pULK1 S757, BECN1, mTOR, p-mTOR S2448, AMPK, p-AMPK T174, SQSTM1/p62 y LC3. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra actina.

Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con TBS x 10 minutos y finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (anti-conejo / anti-ratón) en TBS + leche descremada al 5%.

Geles 10%:

- AMPK

Anticuerpo primario - 1:1000 x 1 hr.

Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:1000 x 1hr.

- p-AMPK T174

Anticuerpo primario - 1:1000 x 1 hr.

Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:1000 x 1hr.

- mTOR
 - Anticuerpo primario - 1:2000 x 1 hr.
 - Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:4000 x 1hr.
- p-mTOR
 - Anticuerpo primario - 1:1000 toda la noche a 4°C.
 - Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:2000 x 1hr.
- ULK1
 - Anticuerpo primario - 1:1500 x 1 hr.
 - Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:5000 x 1hr.
- p-ULK1 S757
 - Anticuerpo primario - 1:2000 toda la noche a 4°C.
 - Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:5000 x 1hr.
- p-ULK1 S317
 - Anticuerpo primario - 1:1500 toda la noche a 4°C.
 - Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:5000 x 1hr.
- BECN1
 - Anticuerpo primario - 1:5000 x 1 hr.
 - Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:5000 x 1hr.
- Actina
 - Anticuerpo primario - 1:9000 x 20 minutos.
 - Anticuerpo secundario anti-ratón – 1:9000 x 20 minutos.

Geles 16%:

- LC3

Anticuerpo primario - 1:6000 x 1 hr.

Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:6000 x 1hr.

- SQSTM1/p62

Anticuerpo primario - 1:2000 x 1 hr.

Anticuerpo secundario anti-conejo – 1:2000 x 1hr.

Finalmente, la inmunorreactividad se detectó por quimioluminiscencia con el sustrato de HRP *Luminata* (Millipore, Massachusetts, USA) utilizando el escáner C-Digit Blot (LI-COR Biosciences), y fue cuantificada mediante densitometría utilizando ImageJ.

5.5 Análisis Estadísticos

Los datos son expresados como la media \pm error estándar, con una n = 3 - 9 diferentes cultivos primarios de embriones de ratas E17 por condición experimental. Las diferencias entre los tratamientos experimentales y control fueron evaluadas mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía ($p < 0.05$), seguido de una prueba post-hoc de comparación múltiple de Fisher. Todos los análisis estadísticos y las gráficas obtenidas se realizaron en GraphPad Prism 7.

6. Resultados

6.1 Papel de la activación de AMPK e inhibición de mTOR en la iniciación de la autofagia después de la privación de glucosa en neuronas

En estudios previos del laboratorio se observaron dos fases de formación de autofagosomas (transformación de LC3-I a LC3-II), una durante la GD y otra durante la GR (Gerónimo-Olvera et al. 2017). Dicho aumento se debe, por lo menos en parte, a la acumulación de autofagosomas debido a su falla en la degradación (aumento de SQSTM1/p62). Sin embargo, a la fecha, en este modelo *in vitro* de GD y GD/GR, no se conoce si la formación de autofagosomas puede deberse a la activación de la autofagia de una forma dependiente de la vía de mTOR/AMPK. Para conocer el mecanismo de activación de la autofagia, se determinaron los niveles de fosforilación de AMPK en la treonina 172 (T172) y de mTOR en la serina 2448 (S2448). Ambas fosforilaciones son de activación, y son señales involucradas en la activación e inhibición de la autofagia, respectivamente. Así mismo, se evaluaron los niveles de fosforilación de ULK1, una proteína del complejo de iniciación de la autofagia que es blanco de AMPK y mTOR. Cuando es fosforilada en la S317 por AMPK se activa, y cuando es fosforilada en la S757 por mTOR se inactiva ya que se interrumpe su interacción con AMPK.

Los resultados muestran que durante la GD tienden a aumentar los niveles de p-AMPK T172 en comparación con las células control, que se vuelve significativa a las 0.5 h y después de 2 h de GD. Durante la GR se observó el pico máximo en los niveles de p-AMPK T172 a las 2 h, mientras que entre las 4 h y 16 h después de la GR los niveles de p-AMPK disminuyen a valores que, si bien son más altos que

los niveles control, no son estadísticamente diferentes a éstos (Fig. 4A). Esto indica que la AMPK se activa fundamentalmente durante la GD y las primeras horas de la GR para después volver a los valores basales. Por otro lado, se puede observar que en presencia de D-βHB el nivel de p-AMK se mantuvo elevado durante la GD y las primeras 2 h de la RG y no tuvo un efecto diferente al inducido por la GD o la GR. Lo que sugiere que el BHB no altera la activación de la AMPK.

En relación con la activación de ULK1 por fosforilación dependiente de AMPK (p-ULK1 S317), se observó que, durante la GD, hay un aumento en los niveles de p-ULK1S317 en comparación con las células control, que es significativo a la 1 h de GD y coincide con el aumento en la fosforilación de AMPK.

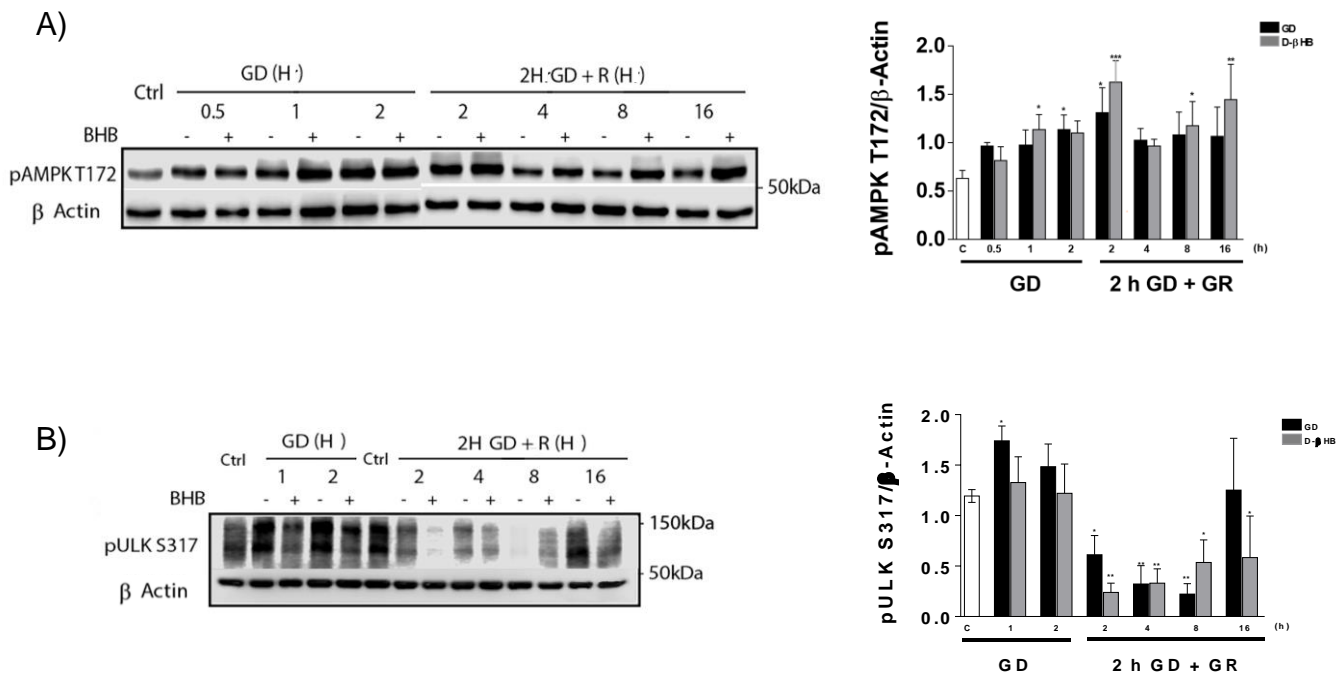


Figura 4: Actividad de la AMPK y ULK1 en neuronas corticales in vitro expuestas a GD y GD/GR con o sin D-βHB. A) Niveles de fosforilación de AMPK T172 (n=5). B) Niveles de fosforilación de ULK1 S317 (n=3). Las barras representan la media ± el error estándar. Los datos se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, y ****p<0.0001 vs control

Sin embargo, durante la GR se observa una disminución notable en la fosforilación de ULK1 S317 durante las primeras horas y tiende a recuperarse a las 16 h de la GR (Fig. 4B), lo que sugiere que no hay nueva formación de autofagosomas en la etapa GR. El D-βHB, mostró una tendencia a disminuir la fosforilación de ULK1 S317 durante la GD y durante las 2 y 16 h de GR (Fig. 4B).

Respecto a la actividad de mTOR, se observó una disminución en los niveles de p-mTOR S2448 durante la GD alcanzando una reducción significativa a las 2 h. Durante la GR se observa que los niveles de p-mTOR S2448 se reestablecen a los niveles control a las 2 h de GR y vuelven a disminuir entre las 4 y 8 h de GR y con una recuperación a las 16 h de GR (Fig. 5A). Estos resultados sugieren que la cinasa mTOR se inhibe rápidamente durante la GD, recupera su actividad durante las primeras horas de la GR para inhibirse nuevamente en etapas más tardías. Al comparar los tratamientos con y sin D-βHB durante la GD y la GR, no se observó alguna diferencia significativa (Fig. 5A), sugiriendo que el cuerpo cetónico no afecta la inhibición de mTOR.

En cuanto a la inhibición de ULK1 dependiente de mTOR, se observó una disminución significativa en los niveles de p-ULK1 S757 a partir de las 2 h de GD y entre las 4 a las 8 h de GR, que corresponden a la inhibición de mTOR en esos tiempos. Esto podría sugerir la iniciación de la autofagia dependiente de mTOR en tiempos largos de GD y durante la GR (Fig. 5B). El D-BHB no tuvo efecto sobre la fosforilación de ULK S757 a excepción de las 16 h en donde se observa una disminución con respecto a la GD, que sin embargo no muestra una disminución correspondiente en la fosforilación de mTOR.

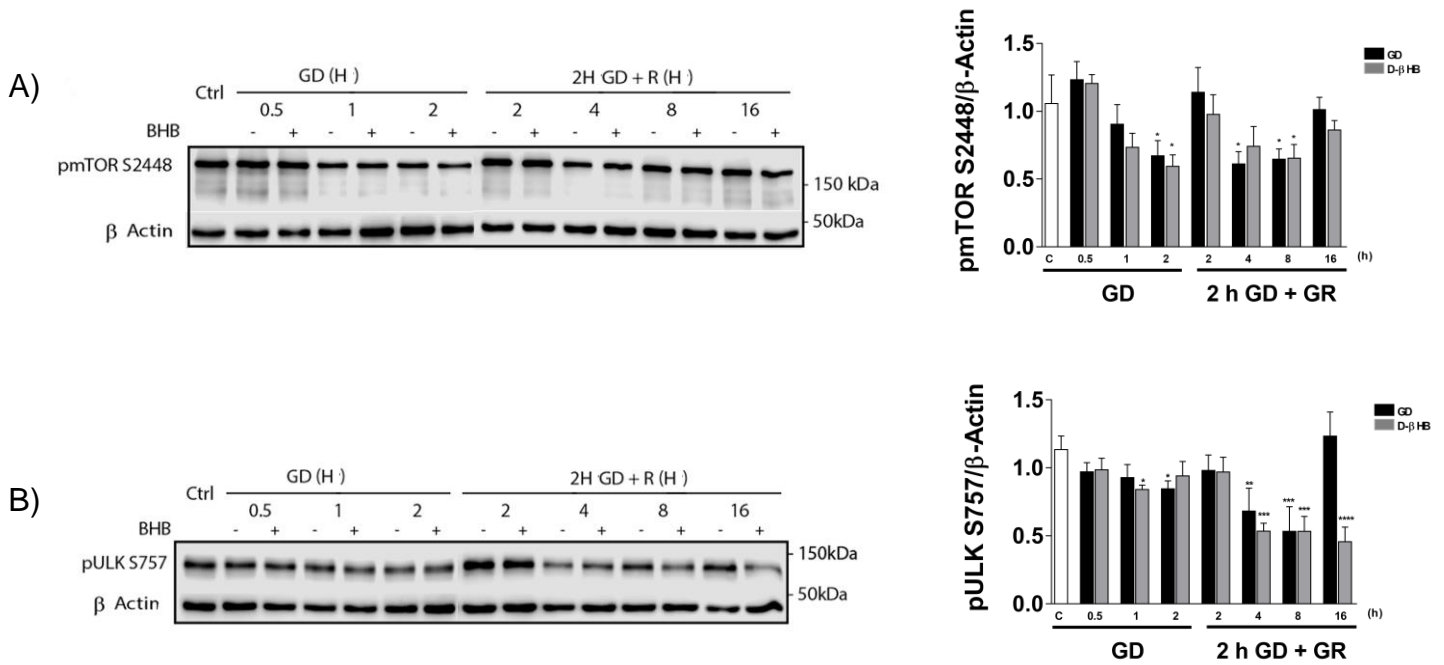


Figura 5: Actividad de mTOR y ULK1 en neuronas corticales in vitro expuestas a GD y GD/GR con o sin D-βHB. A) Niveles de fosforilación de mTOR S2448 (n=4). B) Niveles de fosforilación de ULK1 S357 (n=5). Las barras representan la media ± el error estándar. Los datos se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, y ****p<0.0001 vs control

En conjunto, los resultados sugieren que, durante la GD hay un aumento en las señales de activación de la autofagia, ya que tiende a aumentar la fosforilación activadora de AMPK (p-AMPK T172) lo que promueve el inicio de la autofagia al fosforilar a ULK1 en la S317. De misma forma, en el caso de mTOR, se observa una disminución en su fosforilación activadora (p-mTOR S2448) después de 2 h de GD, sugiriendo la disminución de su actividad, que corresponde con una disminución en la fosforilación inhibitoria de ULK1 (p-ULK1 S757).

Además, durante la GR, p-mTOR S2448 disminuye entre las 4 y 8 h lo que se acompaña de una disminución correspondiente en la fosforilación de ULK S757. Estos resultados sugieren que la activación tardía (durante la GR) de la autofagia depende de la inhibición de mTOR. Es importante mencionar que durante la GR la

fosforilación de ULK en S317 disminuye notablemente, lo que sugiere que la autofagia no se activa por la vía de AMPK durante en esta etapa.

Por otro lado, el D- β HB podría atenuar la iniciación de la autofagia activada durante la GD ya que disminuye p-ULKS317, aunque este efecto no es significativo estadísticamente.

6.2 Modulación de ULK1 a nivel de traducción de proteínas por mTOR

Además del cambio observado en la fosforilación de ULK1 dependiente de AMPK y mTOR, se observó que los niveles totales de ULK1 disminuyeron significativamente durante 4 y 8 h de GR. Esto concuerda con estudios que han mostrado que los niveles de ULK1 disminuyen después de 2 h de la privación de factores de crecimiento y aminoácidos, como un mecanismo para limitar la autofagia y mantenerla bajo umbrales fisiológicos, que se debe a sistemas de degradación por proteasomas, por autofagia y a nivel de traducción de proteínas, siendo esta última la que persiste en periodos prolongados de privación de nutrientes (Nazio et al., 2016/2017 & Allavena et al., 2016).

A pesar de la disminución en los niveles totales de ULK1, también se ha observado que, durante la privación de nutrientes, el RNAm de ULK1 se transcribe activamente y, después se traduce tras la reactivación de mTOR, al ser éste un activador de la traducción. Esto sugiere un papel importante de mTOR en la modulación de ULK1 generando periodos de autofagia seguidos por periodos de traducción de proteínas, gracias a la restauración de aminoácidos (Nazio et al., 2017).

Esta modulación de mTOR sobre ULK1 se puede observar a partir de las 4 h de GR. Durante las 4 y 8 h de GR se observó una disminución en los niveles totales de ULK1 que coinciden con una disminución en la activación de mTOR (p-S2448) (Fig 6), mientras que a partir de las 16 h de GR se observa un incremento en los niveles totales de ULK1 que de nuevo coinciden con un aumento en los niveles de p-mTOR S2448. Esto sugiere que durante la GR mTOR probablemente esté modulando la actividad de ULK1 a nivel de síntesis de proteínas.

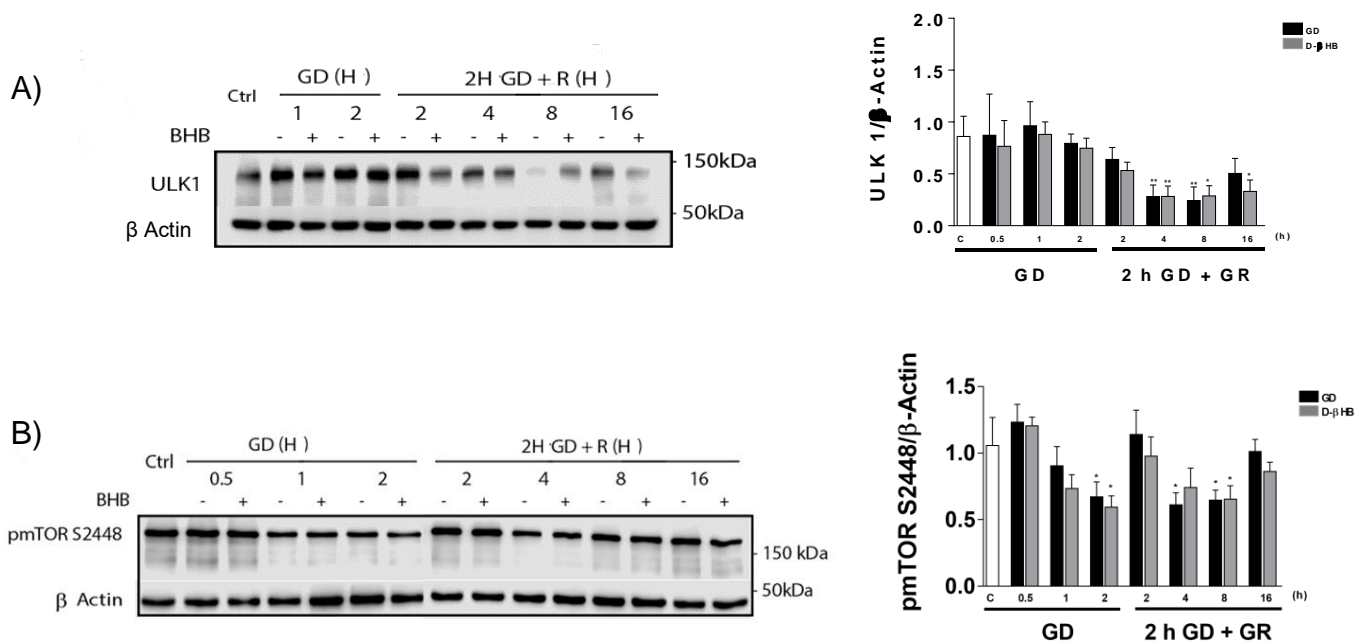


Figura 6: **Modulación de mTOR sobre ULK1 en neuronas corticales in vitro expuestas a GD y GD/GR.** A) Niveles totales de ULK1 (n=6). B) Niveles de fosforilación de mTOR S2448 (n=4). Las barras representan la media \pm el error estándar. Los datos se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, y **** $p < 0.0001$ vs control

6.3 Inducción de la autofagia durante la privación y reintroducción de glucosa en neuronas

Para corroborar la nucleación y elongación de la autofagia a diferentes tiempos después de la GD y la GR, se analizaron los niveles de BECN1 y LC3-II, los cuales están involucrados en la elongación y formación de autofagosomas.

Primero, se observó que los niveles de BECN1 no cambian durante la GD y durante las 2 h de primeras de la GR, y empiezan a disminuir a partir de las 4 h de la GR (Fig. 7A). Además, durante la GR, se observó una mayor disminución en los niveles de BECN1 cuando a las neuronas se les trató con D- β HB.

En cuanto a los niveles de LC3-II, el cual nos da un índice de formación de autofagosomas, se observa que los niveles de LC3-II aumentan durante la GD, y disminuyen durante la GR (Fig. 7B). El D- β HB no modificó el aumento en la transformación de LC3-I a LC3-II inducida durante la GD, aunque mostró una tendencia a disminuir los niveles de LC3-II a las 2 y 16 h de GR.

Estos resultados sugieren que la autofagia se induce durante la GD ya que hay un aumento en los niveles de LC3-II, y se degradan durante la fase de GR al observarse una disminución de BECN1 y LC3-II en comparación de la fase de GD. En experimentos previos del laboratorio se demostró que el D- β HB disminuye los niveles de BECN1 y la lipidación de LC3-II tanto durante la GD como la GR, sugiriendo que abate la formación de los autofagosomas. Sin embargo, en este trabajo, aunque no se encontró diferencias significativas entre los grupos sin y con

D-βHB, el D-βHB tuvo una mayor disminución en los niveles de BECN1 y una tendencia a disminuir los niveles de LC3-II a las 2 y a las 16 h de GR.

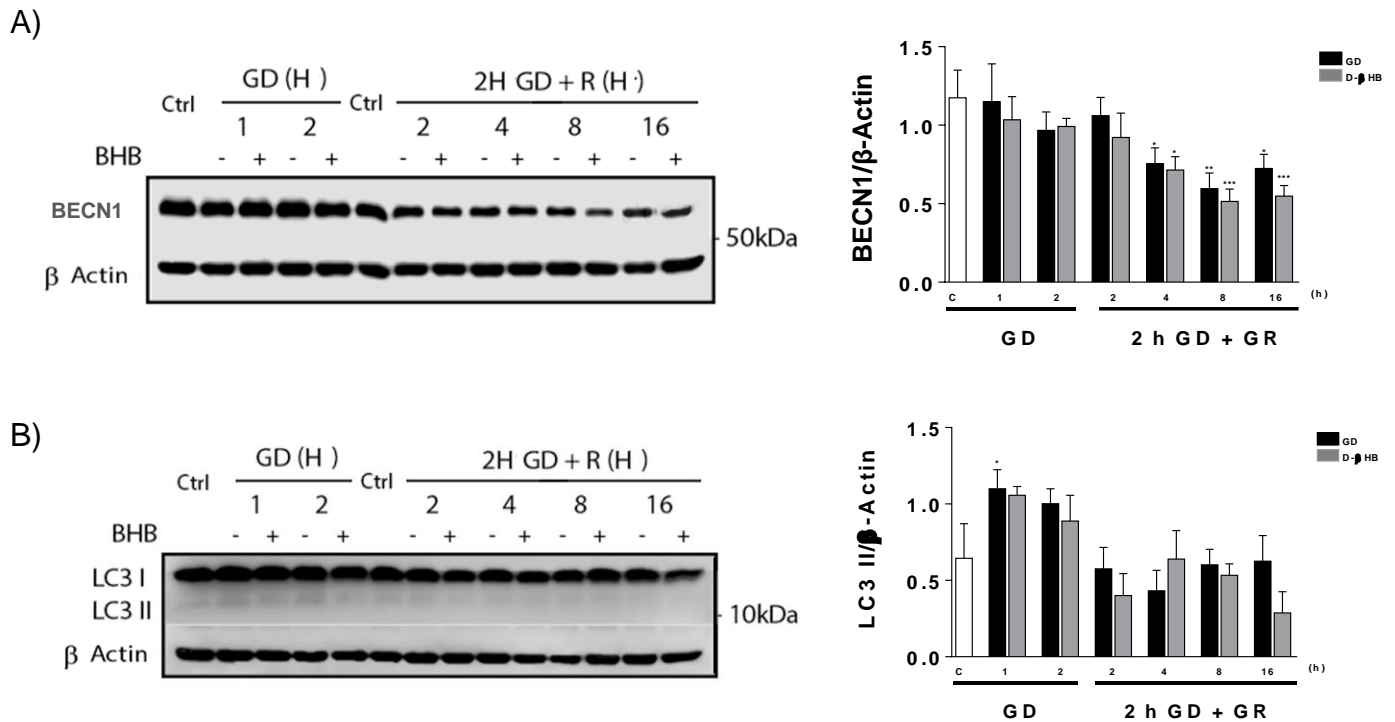


Figura 7: Niveles de proteínas relacionadas con la autofagia en neuronas corticales *in vitro* expuestas a GD y GD/GR con o sin D-βHB. A) Niveles de BECN1 (n=3). B) Niveles de LC3-II (n=3). Las barras representan la media ± el error estándar. Los datos se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs control.

Por último, en un estudio previo del laboratorio se reportó que el tratamiento con D-βHB en neuronas corticales *in vitro* expuestas a GD/GR estimula el flujo autofágico, ya que induce la degradación de SQSTM1/p62, la cual es contrarrestada en presencia de cloroquina, un inhibidor de la degradación autofágica. Además, este efecto correlaciona con un aumento en la supervivencia de las neuronas (Camberos-Luna et al., 2016). Teniendo en cuenta estos resultados previos, se determinaron los niveles de SQSTM1/p62 durante la GD y la GR (Fig. 8).

Se observó que durante la GD los niveles de SQSTM1/p62 no cambian significativamente a comparación del control. Mientras que, durante el inicio de la GR (2hrs GD/GR) los niveles de SQSTM1/p62 disminuyen y posteriormente durante la GR aumentan progresivamente y recuperan sus niveles (8 y 16 h GD/GR). No obstante, se observa que cuando se agrega D-βHB a las neuronas, los niveles de SQSTM1/p62 disminuyen más a las 2 y 16 h de GR, lo que coincide con la tendencia en los niveles de LC3-II de disminuir observada en presencia de D-βHB.

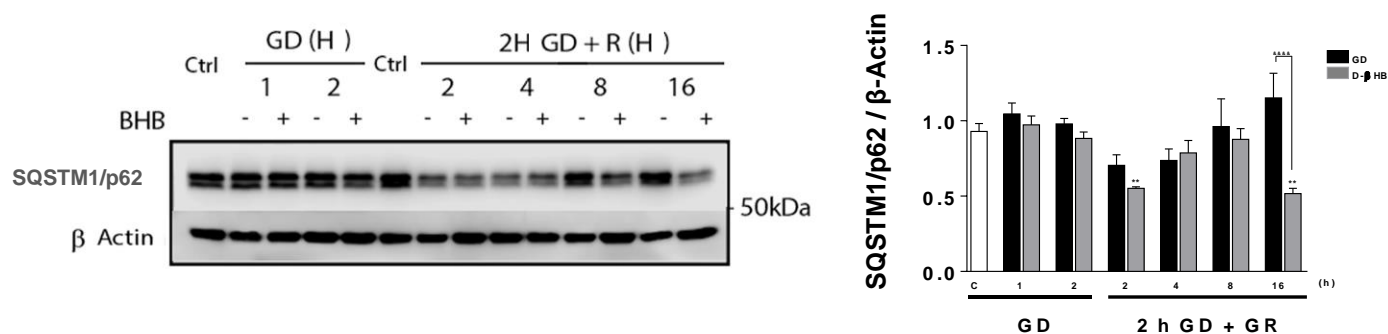


Figura 8: Niveles de SQSTM1/p62 (n=3), como índice de flujo autofágico, en neuronas corticales in vitro expuestas a GD y GD/GR con o sin D-βHB. Las barras representan la media ± el error estándar. Los datos se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Fisher. *p<0.05 y **p<0.01 vs control. &&&p<0.0001 vs sin BHB.

En conjunto, estos resultados sugieren que la autofagia aumenta durante la privación de glucosa, dando lugar a la formación de autofagosomas. Mientras que, durante la GR ya no se forman nuevos autofagosomas, pero aquellos que se formaron durante la GD se degradan entre las 2 y 4 h de la GR. En las etapas más tardías de la GR (16 h) se recuperan los niveles basales de autofagia y en las células que fueron incubadas con D-βHB hay mayor degradación (menor BECN1, LC3-II SQSTM1/p62) y menor acumulación de autofagosomas.

7 Discusión

Aunque se sabe que la autofagia es una vía de degradación inducida para proteger contra la deficiencia de nutrientes, su activación deficiente o excesiva puede conducir a la muerte celular (Gerónimo-Olvera & Massieu, 2019). Diversos estudios han relacionado la autofagia deficiente o excesiva con diversas enfermedades, entre ellas enfermedades neurodegenerativas (Park et al, 2020). Por tal motivo, han incrementado los esfuerzos para encontrar mecanismos para modular la autofagia.

A lo que nos concierne, varios estudios han demostrado que la autofagia se encuentra desregulada tras episodios de isquemia e hipoglucemia, lo que sugiere su papel en el daño neuronal agudo. A pesar de que en resultados previos del laboratorio se había descrito que en neuronas corticales *in vitro* expuestas a GD y GR ocurre un incremento muy rápido en el número de autofagosomas debido a deficiencias en su degradación (Gerónimo-Olvera et al., 2017), aún se desconocía si la autofagia es activada durante la GD o la GR y si dicha activación está mediada por las proteínas AMPK y mTOR, que son importantes sensores de los niveles energéticos de la célula y que participan en las señales de activación de la autofagia.

Como primeros resultados, se muestra que la GD activa la autofagia y esto podría deberse a la activación de la AMPK ya que aumentan sus niveles de fosforilación en la T179, y a la inhibición de la cinasa mTOR como sugiere la disminución en la fosforilación de la S2448. Además, en consecuencia, de esta actividad aumentada de AMPK, se observó la activación de ULK1 debida a su

fosforilación en S317. La activación de ULK1 es de suma importancia en el inicio de la autofagia, al formar parte del complejo proteico formado por ATG13/ATG101/FIP200, que junto con BECN1 se reubican en el sitio donde empezará a formarse el autofagosoma. La activación de la autofagia durante la GD posiblemente sea un mecanismo adaptativo para obtener energía debido al estrés metabólico al que fueron sometidas las neuronas.

En cuanto al papel de mTOR, en la activación de la autofagia durante la GD aparentemente éste no es muy relevante ya que únicamente disminuyen marginal, aunque significativamente los niveles de p-mTOR a las 2 h de GD, lo que coincide con la disminución de p-ULK S757. Durante la GR los niveles de p-AMPK bajan a los niveles control, lo que sugiere que ya no está activada y notoriamente los niveles totales de ULK1 y de pULK317 disminuyen de manera importante sugiriendo su degradación, por lo que en esta etapa no hay una activación de la autofagia dependiente de AMPK. Sin embargo, entre las 4 y 8 h de la GR la fosforilación de mTOR S2448 y la de ULK1 en la S757 disminuyen significativamente lo que sugiere que hay una inhibición de esta cinasa, la cual podría contribuir a la activación de la autofagia en etapas tardía de la RG en las células que sobreviven.

En la investigación de Gerónimo-Olvera et al. (2017), además de observar la acumulación de autofagosomas (aumento en LC3-II) durante la GD, también se mostró que durante la GR la autofagia se vuelve deficiente debido a una disfunción lisosomal que da lugar a la acumulación de los autofagosomas y que contribuye de manera importante a la muerte neuronal.

En un estudio previo se demostró que la presencia del D- β HB disminuye la transformación de LC3-I a LC3-II, los niveles de BECN1 y los niveles de SQSTM1/p62 (Cambreros-Luna, et al. 2016), tanto en el periodo de GD como de GR, siendo el último periodo donde tuvo mayor efecto en la disminución de estos marcadores. Esto sugiere que, los autofagosomas que se formaron durante el periodo de GD son degradados rápidamente gracias a la estimulación del flujo autofágico que se promueve con el tratamiento de D- β HB, posiblemente por una mejora en el estado energético de las neuronas. Corroborando estos resultados, en este mismo trabajo se encontró que el D- β HB promueve la degradación de autofagosomas y evita su acumulación, ya que se observó una tendencia a disminuir los niveles de BECN1 a partir de las 4 h de GR, y de SQSTM1/p62 y LC3-II, a las 2 y 16 h de la GR, siendo en los tiempos tardíos de la GR (16 h) donde se observa una reducción significativa de SQSTM1/p62 con el tratamiento con D- β HB.

Estimular el flujo autofágico sería el principal mecanismo a través del cual el D- β HB evita la acumulación de autofagosomas durante la GR, ya que el D- β HB tuvo un efecto marginal sobre la actividad de AMPK. No obstante, se observó una tendencia a disminuir p-ULK S317 a las 2 y 16 h de GR, lo que podría sugerir una tendencia del D- β HB a disminuir la iniciación de la autofagia a estos tiempos probablemente porque mejore el estado energético de las neuronas, como se ha observado previamente en este modelo experimental (Julo-Amilpas et al. 2015), y por lo tanto atenúe la estimulación de la formación de autofagosomas. En el caso de la activación de mTOR, el D- β HB también tuvo un efecto sobre la p-ULK1 S757,

únicamente a las 16 h sugiriendo que mantiene un menor nivel de autofagia a este tiempo en las células que sobreviven.

8 Conclusión

El presente trabajo muestra que la GD en neuronas corticales cultivadas *in vitro* activa la autofagia posiblemente como mecanismo de obtención de energía debido al estrés metabólico al que fueron sometidas las neuronas. Además, la activación de la autofagia en estas condiciones es dependiente de señales que involucran la actividad de AMPK/mTOR/ULK1 durante la GD, mientras que, en las fases tardías de la GR está mediada principalmente por la inhibición de mTOR. Por otro lado, se muestra que el D-βHB tiende disminuir esta activación de la autofagia al disminuir la fosforilación de ULK1 S317 y al estimular el flujo autofágico, posiblemente por ser un sustrato energético alternativo y mejorar el estado energético de las neuronas.

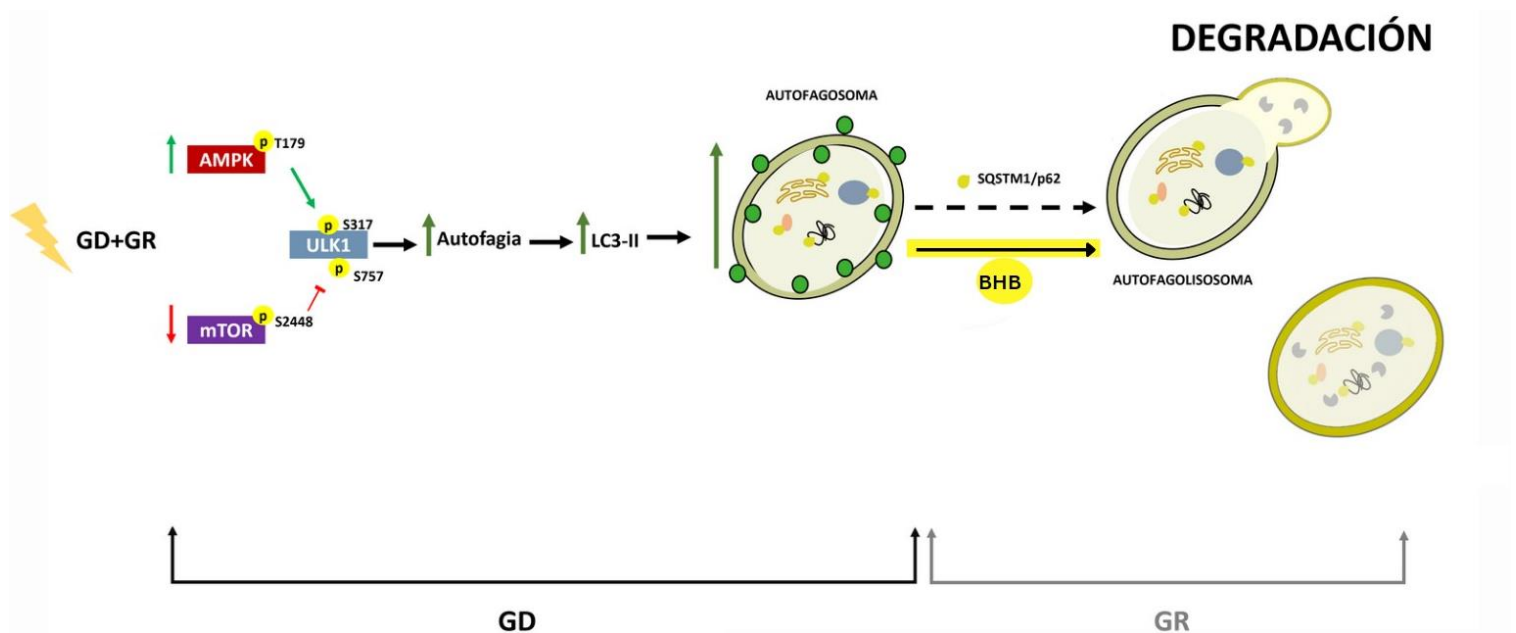


Figura 9: Efecto de la privación y reintroducción de glucosa (GD/GR) y el tratamiento con D-βHB sobre la iniciación de la autofagia en neuronas corticales *in vitro*. La autofagia se activa durante la GD debido a señales dependientes de AMPK/mTOR/ULK1. Esta activación aumenta los niveles de LC3-II y como consecuencia un aumento en la formación de autofagosomas. Debido a que no se observa una disminución en los niveles de SQSTM1/p62 durante la GD, es probable que los autofagosomas se acumulen debido a una disminución en el flujo autofágico. El tratamiento con D-βHB redujo los niveles de autofagosomas al estimular el flujo autofágico, que se observa como una reducción en los niveles de SQSTM1/p62.

9 Referencias

- Alers, S., Loffler, A., Wesselborg, S., & Stork, B. (2011). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular And Cellular Biology*, 32(1), 2-11. doi: 10.1128/mcb.06159-11
- Alirezaei, M., Kemball, C. C., Flynn, C. T., Wood, M. R., Whitton, J. L., & Kiosses, W. B. (2010). Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy*, 6(6), 702–710. doi.org/10.4161/auto.6.6.12376
- Allavena, G., Boyd, C., Oo, K. S., Maellaro, E., Zhivotovsky, B., & Kaminsky, V. O. (2016). Suppressed translation and ULK1 degradation as potential mechanisms of autophagy limitation under prolonged starvation. *Autophagy*, 12(11), 2085–2097. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1226733>
- Blomqvist, G., Gjedde, A., Gutniak, M., Grill, V., Widén, L., Stone-Elander, S., & Hellstrand, E. (1991). Facilitated transport of glucose from blood to brain in man and the effect of moderate hypoglycaemia on cerebral glucose utilization. *European journal of nuclear medicine*, 18(10), 834–837. <https://doi.org/10.1007/BF00175064>
- Camberos-Luna, L., Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., & Massieu, L. (2016). The Ketone Body, β -Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons. *Neurochemical Research*, 41(3), 600-609. doi: 10.1007/s11064-015-1700-4

- Chang N. C. (2020). Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 138. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00138>
- Cryer P. E. (2007). Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *The Journal of clinical investigation*, 117(4), 868–870. <https://doi.org/10.1172/JCI31669>
- Custódio, T. F., Paulsen, P. A., Frain, K. M., & Pedersen, B. P. (2021). Structural comparison of GLUT1 to GLUT3 reveal transport regulation mechanism in sugar porter family. *Life science alliance*, 4(4), e202000858. <https://doi.org/10.26508/lisa.202000858>
- Davis, L. M., Pauly, J. R., Readnower, R. D., Rho, J. M., & Sullivan, P. G. (2008). Fasting is neuroprotective following traumatic brain injury. *Journal of neuroscience research*, 86(8), 1812–1822. <https://doi.org/10.1002/jnr.21628>
- Di, L. (2016). Chapter 3 - In Vivo Environments Affect Drug Exposure. In E. H. Kerns (Ed.), *Drug-Like Properties* (2nd ed., pp. 15–28). essay, Academic Press.
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4), 295–299. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>
- Duelli, R., & Kuschinsky, W. (2001). Brain Glucose Transporters: Relationship to Local Energy Demand. *Physiology*, 16(2), 71-76. doi: 10.1152/physiologyonline.2001.16.2.71

- Elamin, M., Ruskin, D., Masino, S., & Sacchetti, P. (2017). Ketone-Based Metabolic Therapy: Is Increased NAD⁺ a Primary Mechanism? *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 10. doi: 10.3389/fnmol.2017.00377
- Field, R., Field, T., Pourkazemi, F., & Rooney, K. (2021). Ketogenic diets and the nervous system: a scoping review of neurological outcomes from nutritional ketosis in animal studies. *Nutrition research reviews*, 1–14. Advance online publication. doi.org/10.1017/S0954422421000214
- Freeman, L. C., & Ting, J. P.-Y. (2015). The pathogenic role of the inflammasome in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neurochemistry*, 136, 29–38. doi.org/10.1111/jnc.13217
- Fu, S.-P., Wang, J.-F., Xue, W.-J., Liu, H.-M., Liu, B.-R., Zeng, Y.-L., et al. (2015b). Anti-inflammatory effects of BHBA in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models are mediated by GPR109A-dependent mechanisms. *J. Neuroinflammation* 12:9. doi: 10.1186/s12974-014-0230-3
- García-Rodríguez, D., & Giménez-Cassina, A. (2021). Ketone bodies in the brain beyond fuel metabolism: From excitability to gene expression and cell signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.732120>
- Garza-Lombó, C., Schroder, A., Reyes-Reyes, E., & Franco, R. (2018). mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival. *Current Opinion In Toxicology*, 8, 102-110. doi: 10.1016/j.cotox.2018.05.002

- Gerónimo-Olvera, C., & Massieu, L. (2019). Autophagy as a Homeostatic Mechanism in Response to Stress Conditions in the Central Nervous System. *Molecular Neurobiology*, 56(9), 6594-6608. doi: 10.1007/s12035-019-1546-x
- Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., Castro-Obregón, S., & Massieu, L. (2017). Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2911-e2911. doi: 10.1038/cddis.2017.299
- Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M., & Reiss, K. (2016). Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *International Journal Of Molecular Sciences*, 17(12), 2093. doi: 10.3390/ijms17122093
- Haces Del Blanco, Ma. L, Massieu L. (2005). Mechanisms involved in neuronal damage associated to hypoglycemia. *Arch. Neuroscience*. 10(2);83-91
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889. doi.org/10.1038/nature04724
- Henderson, S. (2008). Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5(3), 470-480. doi: 10.1016/j.nurt.2008.05.004
- Hertz, L., Chen, Y., & Waagepetersen, H. (2015). Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism, β -amyloid toxicity, and astrocyte function. *Journal Of Neurochemistry*, 134(1), 7-20. doi: 10.1111/jnc.13107

- Hu, L. T., Zhu, B. L., Lai, Y. J., Long, Y., Zha, J. S., Hu, X. T., Zhang, J. H., & Chen, G. J. (2017). HMGCS2 promotes autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein through ketone body-mediated mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications*, 486(2), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.069>
- Hu, E., Du, H., Zhu, X., Wang, L., Shang, S., Wu, X., Lu, H., & Lu, X. (2018). Beta-hydroxybutyrate Promotes the Expression of BDNF in Hippocampal Neurons under Adequate Glucose Supply. *Neuroscience*, 386, 315–325.
- Hurley, J., & Young, L. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual Review Of Biochemistry*, 86(1), 225-244. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044820
- Jensen, N., Wodschow, H., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(22), 8767. doi: 10.3390/ijms21228767
- Juge, N., Gray, J. A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R. H., Nicoll, R. A., & Moriyama, Y. (2010). Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*, 68(1), 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.002>
- Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, E., Gerónimo-Olvera, C., & Massieu, L. (2015). Protection of Hypoglycemia-Induced Neuronal Death by β -Hydroxybutyrate Involves the Preservation of Energy Levels and Decreased Production of Reactive Oxygen Species. *Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(5), 851-860. doi: 10.1038/jcbfm.2015.1

- Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., & Veech, R. L. (2000). D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5440–5444. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5440>
- Kocaturk, N. M., & Gozuacik, D. (2018). Crosstalk between mammalian autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00128>
- Koepsell H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 472(9), 1299–1343. doi.org/10.1007/s00424-020-02441-x
- Kohli, L., & Roth, K. A. (2010). Autophagy. *The American Journal of Pathology*, 176(3), 1065–1071. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090850>
- Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2), 280-293. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Languren, G., Montiel, T., Julio-Amilpas, A., & Massieu, L. (2013). Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochemistry international*, 63(4), 331–343. doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.018
- Lincoln, B. C., Des Rosiers, C., & Brunengraber, H. (1987). Metabolism of S-3-hydroxybutyrate in the perfused rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, 259(1), 149–156. [doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90480-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90480-2)

- Liu, K. S., & Jiang, L. (2017). Chapter 24 - Frontier of Inorganic Synthesis and Preparative Chemistry (I) Biomimetic Synthesis. In D. L. Tian (Ed.), *Modern Inorganic Synthetic Chemistry* (2nd ed., pp. 687–721). essay, Elsevier.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends In Neurosciences*, 36(10), 587-597. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001
- Mierziak, J., Burgberger, M., & Wojtasik, W. (2021). 3-Hydroxybutyrate as a Metabolite and a Signal Molecule Regulating Processes of Living Organisms. *Biomolecules*, 11(3), 402. doi.org/10.3390/biom11030402
- Montiel, T., Montes-Ortega, L. A., Flores-Yáñez, S., & 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. *Current Pharmaceutical Design*, 26(12), 1377–1387. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200115103646>
- Nazio, F., Carinci, M., Valacca, C., Bielli, P., Strappazzon, F., Antonioli, M., Ciccocanti, F., Rodolfo, C., Campello, S., Fimia, G. M., Sette, C., Bonaldo, P., & Cecconi, F. (2016). Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *The Journal of cell biology*, 215(6), 841–856. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605089>
- Nazio, F., & Cecconi, F. (2017). Autophagy up and down by outsmarting the incredible ULK. *Autophagy*, 13(5), 967–968. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1285473>

- Newman, J. C., & Verdin, E. (2017). B-hydroxybutyrate: A signaling metabolite. *Annual Review of Nutrition*, 37(1), 51–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064916>
- Norwitz, N., Hu, M., & Clarke, K. (2019). The Mechanisms by Which the Ketone Body D-β-Hydroxybutyrate May Improve the Multiple Cellular Pathologies of Parkinson's Disease. *Frontiers In Nutrition*, 6. doi: 10.3389/fnut.2019.00063
- Páramo, B., Hernández-Fonseca, K., Estrada-Sánchez, A. M., Jiménez, N., Hernández-Cruz, A., & Massieu, L. (2010). Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 167(4), 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.074>
- Park, H., Kang, J. H., & Lee, S. (2020). Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3369. <https://doi.org/10.3390/ijms21093369>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460–473. doi: 10.1089/ars.2013.5371
- Qin, L., Ma, K. & Yan, Z. Rescue of histone hypoacetylation and social deficits by ketogenic diet in a Shank3 mouse model of autism. *Neuropsychopharmacol.* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01212-1>
- Ritter S. Monitoring and Maintenance of Brain Glucose Supply: Importance of Hindbrain Catecholamine Neurons in This Multifaceted Task. In: Harris RBS, editor. *Appetite and Food Intake: Central Control*. 2nd edition. Boca Raton

- (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017. Chapter 9. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453140/> doi:
10.1201/9781315120171-9
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., & Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental cell*, 20(1), 131–139. doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.003
- Sarkar, C., Zhao, Z., Aungst, S., Sabirzhanov, B., Faden, A. I., & Lipinski, M. M. (2014). Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy*, 10(12), 2208–2222. doi.org/10.4161/15548627.2014.981787
- Schmeisser, K., & Parker, J. (2019). Pleiotropic Effects of mTOR and Autophagy During Development and Aging. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00192
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C. A., Lim, H., Saunders, L. R., Stevens, R. D., Newgard, C. B., Farese, R. V., de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., & Verdin, E. (2013). Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, 339(6116), 211–214. <https://doi.org/10.1126/science.1227166>
- Shen, C. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187-214. doi: 10.1016/b978-0-12-802823-0.00008-0

- Simeone, T., Simeone, K., & Rho, J. (2017). Ketone Bodies as Anti-Seizure Agents. *Neurochemical Research*, 42(7), 2011-2018. doi: 10.1007/s11064-017-2253-5
- Sleiman, S. F., Henry, J., Al-Haddad, R., El Hayek, L., Abou Haidar, E., Stringer, T., Ulja, D., Karuppagounder, S. S., Holson, E. B., Ratan, R. R., Ninan, I., & Chao, M. V. (2016). Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body β -hydroxybutyrate. *eLife*, 5, e15092. doi.org/10.7554/eLife.15092
- Suh, S. W., Gum, E. T., Hamby, A. M., Chan, P. H., & Swanson, R. A. (2007). Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *The Journal of clinical investigation*, 117(4), 910–918. <https://doi.org/10.1172/JCI30077>
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato, T., Matsuura, A., & Hiraide, A. (2001). Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Japanese journal of pharmacology*, 87(2), 143–150. <https://doi.org/10.1254/jjp.87.143>
- Thellung, S., Corsaro, A., Nizzari, M., Barbieri, F., & Florio, T. (2019). Autophagy Activator Drugs: A new opportunity in neuroprotection from misfolded protein toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 901. <https://doi.org/10.3390/ijms20040901>
- Tooze, S. A., & Schiavo, G. (2008). Liaisons dangereuses: autophagy, neuronal survival and neurodegeneration. *Current opinion in neurobiology*, 18(5), 504–515. doi.org/10.1016/j.conb.2008.09.015

- Torres-Esquivel, C., Montiel, T., Flores-Méndez, M., & Massieu, L. (2020). Effect of β -Hydroxybutyrate on Autophagy Dynamics During Severe Hypoglycemia and the Hypoglycemic Coma. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, *14*. doi: 10.3389/fncel.2020.547215
- Uddin, M., Stachowiak, A., Mamun, A., Tzvetkov, N., Takeda, S., & Atanasov, A. et al. (2018). Autophagy and Alzheimer's Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications. *Frontiers In Aging Neuroscience*, *10*. doi: 10.3389/fnagi.2018.00004
- Valenzuela, V., Nassif, M., & Hetz, C. (2018). Unraveling the role of motoneuron autophagy in ALS. *Autophagy*, *14*(4), 733-737. doi: 10.1080/15548627.2018.1432327
- 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, leukotrienes, and essential fatty acids*, *70*(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.09.007>
- Vulturar, R., Chiş, A., Pintilie, S., Farcaş, I. M., Botezatu, A., Login, C. C., Sitar-Taut, A.-V., Orasan, O. H., Stan, A., Lazea, C., Al-Khzouz, C., Mager, M., Vinţan, M. A., Manole, S., & Damian, L. (2022). One Molecule for Mental Nourishment and More: Glucose Transporter Type 1—Biology and Deficiency Syndrome. *Biomedicines*, *10*(6), 1249. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061249>
- Wei, T., Tian, W., Liu, F., & Xie, G. (2014). Protective effects of exogenous β -hydroxybutyrate on paraquat toxicity in rat kidney. *Biochemical and*

biophysical research communications, 447(4), 666–671.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.074>

Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., Qi, S., Li, J., Colak, G., Chen, Y., Xia, C., Peng, C., Ruan, H., Kirkey, M., Wang, D., Jensen, L. M., Kwon, O. K., Lee, S., Pletcher, S. D., ... Zhao, Y. (2016). Metabolic regulation of gene expression by histone lysine β -hydroxybutyrylation. *Molecular Cell*, 62(2), 194–206. doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.036

Xin, L., Ipek, Ö., Beaumont, M., Shevlyakova, M., Christinat, N., Masoodi, M., Greenberg, N., Gruetter, R., & Cuenoud, B. (2018). Nutritional ketosis increases NAD⁺/NADH ratio in healthy human brain: An in vivo study by 31P-Mrs. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00062>

Yamanashi, T., Iwata, M., Kamiya, N. et al. Beta-hydroxybutyrate, an endogenous NLRP3 inflammasome inhibitor, attenuates stress-induced behavioral and inflammatory responses. *Sci Rep* 7, 7677 (2017). doi.org/10.1038/s41598-017-08055-1

Yang, X., Yu, D.-D., Yan, F., Jing, Y.-Y., Han, Z.-P., Sun, K., Liang, L., Hou, J., & Wei, L.-X. (2015). The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell & Bioscience*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0005-2>

Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Wu, J., & Wang, Q. (2019). Ketone Bodies in Neurological Diseases: Focus on Neuroprotection and Underlying Mechanisms. *Frontiers In Neurology*, 10. doi: 10.3389/fneur.2019.00585

- Youm, Y. H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T. D., Kang, S., Horvath, T. L., Fahmy, T. M., Crawford, P. A., Biragyn, A., Alnemri, E., & Dixit, V. D. (2015). The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature medicine*, 21(3), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nm.3804>
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Lazarow, A., Luhovyy, B., et al. (2005). Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochem. Int.* 47, 119–128. doi: 10.1016/j.neuint.2005.04.014
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Melø, T. M., Nissim, I., Sonnewald, U., & Nissim, I. (2007). The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: relationship to the anticonvulsant effect. *Annual review of nutrition*, 27, 415–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093722>
- Zhu, Z., Yang, C., Iyaswamy, A., Krishnamoorthi, S., Sreenivasmurthy, S., & Liu, J. et al. (2019). Balancing mTOR Signaling and Autophagy in the Treatment of Parkinson's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(3), 728. doi: 10.3390/ijms20030728