



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“EFECTO DEL D-BETA-HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA  
AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA LESIÓN EXCITOTÓXICA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ING. LUIS ANGEL MONTES ORTEGA

DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# “EFECTO DEL D-BETA-HIDROXIBUTIRATO SOBRE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA LESIÓN EXCITOTÓXICA”

---

## AGRADECIMIENTOS

Ésta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo en el laboratorio AL-302, del Departamento de Neuropatología Molecular en la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se agradece ampliamente la colaboración y asesoría técnica de la Bióloga Teresa Montiel Montes en la realización de éste trabajo en todos sus procedimientos experimentales.

Este proyecto de investigación fue financiado por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PA-PIIT, proyecto IN205416) otorgado a Lourdes Massieu.

## ÍNDICE

1	RESUMEN .....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	Neurotransmisión Glutamatérgica .....	2
2.2	Excitotoxicidad .....	6
2.3	Autofagia .....	9
2.3.1	Iniciación.....	10
2.3.2	Nucleación.....	11
2.3.3	Elongación y maduración del autofagosoma.....	12
2.3.4	Fusión con el lisosoma y degradación.....	12
2.3.5	Reformación del lisosoma.....	13
2.4	Autofagia inducida por excitotoxicidad.....	14
2.4.1	Participación de los receptores NMDA en la activación de la autofagia.....	14
2.4.2	Papel de la autofagia como una respuesta de sobrevivencia ante la excitotoxicidad.....	16
2.4.3	Papel de la autofagia en la muerte excitotóxica.....	17
2.5	Cuerpos Cetónicos .....	23
2.5.1	Beta-Hidroxibutirato (D-BHB).....	25
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
4	HIPÓTESIS .....	28
5	OBJETIVOS.....	28
5.1	Objetivo General.....	28
5.2	Objetivos Particulares .....	28
6	MÉTODOS.....	29
6.1	Animales .....	29
6.2	Modelo de excitotoxicidad inducida por la administración de NMDA.....	29
6.2.4	Efecto del D-BHB sobre la autofagia.....	30
6.2.5	Efecto de la cloroquina.....	30
6.3	Western blotting.....	31
6.4	Análisis estadístico .....	32

7	RESULTADOS .....	33
7.1	Inducción de la autofagia por la inyección de NMDA .....	33
7.2	Efecto de la administración sistémica de D-BHB sobre los marcadores de autofagia después de la administración de NMDA. ....	35
7.3	Efecto de la infusión continua de D-BHB sobre los marcadores de autofagia después de la inyección de NMDA .....	37
7.4	Efecto de la cloroquina pre-NMDA en los marcadores de autofagia .....	39
8	DISCUSIÓN .....	41
9	CONCLUSIONES .....	46
10	PERSPECTIVAS .....	47
11	REFERENCIAS .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Modulación alostérica de los receptores NMDA.....	5
Figura 2.	Proceso excitotóxico.....	7
Figura 3.	Autofagia y su regulación.....	10
Figura 4.	Proteínas que participan en las etapas de la autofagia.....	13
Figura 5.	Papel de la autofagia en la sobrevivencia y muerte de la célula.....	23
Figura 6.	Metabolismo y transporte de los cuerpos cetónicos.....	24
Figura 7.	El NMDA promueve la autofagia en el estriado de rata a las 24h.....	33
Figura 8.	El NMDA promueve una autofagia aberrante en la corteza de rata a las 24h..	34
Figura 9.	La administración sistémica del D-BHB no afecta la autofagia inducida por NMDA en el estriado.....	35
Figura 10.	La administración sistémica del D-BHB disminuye la acumulación de autofagosomas inducida por NMDA en la corteza.....	36
Figura 11.	La infusión epidural por 24 h de D-BHB promueve el flujo autofágico en el estriado.....	37
Figura 12.	La infusión epidural por 24 h de D-BHB promueve el flujo autofágico en la corteza.....	38
Figura 13.	La cloroquina bloquea el flujo autofágico en el estriado.....	39
Figura 14.	La cloroquina no afecta la autofagia inducida por NMDA en la corteza.....	40
Figura 15.	Conclusión.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valores de EC50 ( $\mu\text{M}$ ) de la unión de los agonistas a la subunidad GluN2 del NMDAr. Adaptado de (Traynelis et al, 2010).....	4
Tabla 2.	La autofagia es inducida por la estimulación de los receptores a Glu.....	15
Tabla 3.	La autofagia contribuye al daño excitotóxico.....	17
Tabla 4.	El bloqueo del flujo contribuye a la muerte celular.....	20

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3-MA	3-metiladenina
ANOVA	Análisis de Varianza
ADP	Adenosín difosfato
AMBRA1	Molécula activada en autofagia regulada por BECN1
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Cinasa activada por adenosín monofosfato
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
APV	Ácido 2-Amino-5 fosfonovaleriánico
Asp	Aspartato (D)
ATG	Proteínas relacionadas a la autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
Barkor	Regulador clave relacionado con la autofagia asociado a BECN1
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BECN1	Beclina 1
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CaMKK	Calcio/calmodulina
Cl <sup>-</sup>	Cloro
CoA	Coenzima A
CQ	Cloroquina
CTRL	Control
DAG	Diacilglicerol
DAPK1	Kinasa asociada a la muerte 1
D-BHB	D-Beta-hidroxibutirato
DEPTOR	Proteína con dominio DEP de interacción con mTOR
EAAT	Transportador de aminoácidos excitadores dependiente de Na <sup>+</sup>
FIP200	Proteína que interactúa con la familia de cinasas de adhesión focal
Glu	Glutamato (E)
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
G $\beta$ L	Proteína semejante a la subunidad $\beta$ de la proteína G
Gi	Proteínas G inhibitoras
GSH	Glutación
HDACs	Desacetilasas de histonas
HMG-CoA	$\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA
HRP	Peroxidasa de rábano
KA	Kainato
KCl	Cloruro de potasio
i.c	Intracerebral
i.c.v	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
IP3	inositol-1,4,5-trifosfato
IOA	Yodoacetato
i.v	Intravenosa
K <sup>+</sup>	Potasio
KCl	Cloruro de potasio

Km	Constante de Michaelis-Menten
LAMP	Proteína de membrana asociada al lisosoma
LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
Li	Litio
LKB1	Proteína hepática B1
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media
MDC	Monodanisilcadaverina
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
mTORC1	Diana de rapamicina en células de mamífero
Na <sup>+</sup>	Sodio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NMDAr,	Receptores de N-metil-D-Aspartato
nNOS,	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PB	Buffer de fosfatos
PDC	L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3P	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PI3KC3	Fosfatidilinositol 3-cinasa de clase III
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRAS40	Proteína rica en prolina
PSD95	Proteína de densidad postsináptica
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
QUIN	Ácido quinolínico
R	Arginina
RAP	Rapamicina
RAPTOR	Proteína reguladora asociada a mTOR
REDOX	Óxido-reducción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación Estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SNAT	Transportador de aminoácidos neutros acoplados a sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
SQSTM1/p62	Secuestrosoma
TBS-T	Tris buffer salino con Twen-20
TFEB	Factor de transcripción EB
THA	Ácido DL-treo-β-hidroxiaspártico
ULK	Cinasa activadora de la autofagia similar a unc-51
VGLUT	Transportador vesicular de Glu
VPS15	Cinasa reguladora p150
VOCC	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje
xc <sup>-</sup>	Transportador cistina/Glu





## 1 RESUMEN

La excitotoxicidad se refiere al efecto tóxico inducido por neurotransmisores excitadores como el glutamato que es uno de los más abundantes en el sistema nervioso central de los mamíferos. Este mecanismo de daño ocurre en diferentes desórdenes neurológicos como el infarto cerebral, la epilepsia o enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis lateral amiotrófica. Se ha observado que el D-Beta-hidroxiacetato (D-BHA), que es un cuerpo cetónico que proviene del catabolismo de los ácidos grasos en el hígado, previene el daño neuronal y reduce la peroxidación lipídica en diferentes modelos de daño excitotóxico en cerebro de rata, lo que correlaciona con una disminución en las especies reactivas de oxígeno. Se ha observado que el D-BHA protege al cerebro de la rata después de la administración intracerebral de 200 nmol de N-metil-D-Aspartato (NMDA). Sin embargo, no está completamente claro el mecanismo por el cual podría estar actuando este sustrato energético para ejercer su efecto protector. Recientemente en nuestro laboratorio se reportó que el D-BHA estimula el flujo autofágico durante la privación de glucosa en cultivos de neuronas corticales, previniendo la acumulación de autofagosomas y la disminución de los niveles de ATP para estimular la sobrevivencia neuronal. Ésto sugiere que el D-BHA protege contra el daño excitotóxico y que la autofagia juega un papel importante en este efecto. La autofagia es un proceso conservado de las células eucariontes a través del cual reciclan su material citoplásmico por medio de la degradación lisosomal para mantener la homeostasis celular. No obstante, este proceso se activa como respuesta adaptativa frente a diferentes tipos de estrés, incluyendo la privación de nutrientes. En el presente estudio, se analizó el efecto del D-BHA sobre la autofagia, en un modelo *in vivo* de excitotoxicidad inducida por la administración en el estriado de la rata de un agonista de los receptores de glutamato, el NMDA. Los cambios en la lipídación de la proteína LC3-I para transformarse a LC3-II, proteína que forma parte de los autofagosomas, fueron utilizados como indicador de la formación y acumulación de autofagosomas, mientras que los cambios en la proteína SQSTM1/p62, un receptor de carga que se degrada en el autofagolisosoma, se tomaron como índice de la degradación autofágica. Estas dos proteínas fueron medidas por Western blot a las 24 horas después de la administración de NMDA para investigar si la autofagia está activa y si el flujo autofágico está bloqueado o activo. Se ocuparon dos protocolos de administración de D-BHA, uno fue de manera sistémica, a través de una administración intravenosa seguida de una administración intraperitoneal y en el otro se administró a nivel epidural de manera continua por medio de una mini bomba osmótica para garantizar la disponibilidad del D-BHA. Los resultados indican que la inyección de NMDA activa la autofagia tanto en la corteza cerebral como en el estriado. Sin embargo, sólo se observó flujo autofágico en el estriado mientras que en la corteza no se observó una disminución de SQSTM1/p62 sugiriendo el bloqueo del flujo. La administración sistémica del D-BHA no fue suficiente para promover el flujo autofágico en ninguna de las regiones, mientras que la administración continua de D-BHA redujo la acumulación de autofagosomas y mantuvo el flujo autofágico en el estriado y en la corteza cerebral. Por lo que se concluye que solo una administración continua de D-BHA es capaz de prevenir la acumulación de autofagosomas y ésto podría estar relacionado con la protección del D-BHA en condiciones de excitotoxicidad.



## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Neurotransmisión Glutamatérgica

El glutamato (Glu o E) es el principal aminoácido excitador del Sistema Nervioso Central (SNC). En el cerebro de los mamíferos se estima que entre el 80 y 90% de las sinapsis son glutamatérgicas. Este aminoácido no es esencial y tampoco atraviesa la barrera hematoencefálica, sin embargo los astrocitos y las neuronas son capaces de sintetizarlo *de novo* (Nedergaard *et al.*, 2002), a partir de la glucosa cuando ésta es metabolizada por la glicólisis y el ciclo de Krebs, en el cual un intermediario ( $\alpha$ -cetoglutarato), se convierte en Glu después de recibir un grupo amino procedente de otro aminoácido a través de una reacción de transaminación (Hassel y Dingledine, 2012).

Una proporción considerable, del Glu liberado en las terminales sinápticas, aproximadamente el 70% es reciclado en el ciclo glutamina-Glu, el cual es un proceso compartimentalizado; por un lado el Glu es sintetizado a través de la glutaminasa dependiente de fosfato que hidroliza a la glutamina capturada en las neuronas (Wu *et al.*, 2018), mientras que en los astrocitos la glutamina sintetasa es la encargada de realizar la reacción inversa dependiente de adenosín trifosfato (ATP), es decir, produce glutamina a partir de amonio y Glu. A su vez, la glutamina es liberada por los astrocitos mediante el transportador de aminoácidos neutros acoplados a sodio de tipo 3 (SNAT3) y tipo 5 (SNAT5), y es posteriormente capturada por los transportadores SNAT1 y SNAT2 (Leke y Schousboe, 2016).

Asimismo, el Glu puede ser transformado en un neurotransmisor inhibitorio, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), por medio de la enzima Glu descarboxilasa o bien formar parte del tripéptido glutatión (GSH), que es una de las principales defensas antioxidantes en el sistema nervioso (Koga *et al.*, 2011). Existe un fino control de la vesiculación, liberación y remoción de Glu para mantener las concentraciones fisiológicas en el espacio extracelular de esta molécula, cuya neurotransmisión es importante para múltiples procesos entre ellos la memoria, control motor y el aprendizaje (Niciu *et al.*, 2012). Sin embargo, su acumulación excesiva en el espacio extracelular puede ser tóxica (Lau y Tymianski, 2010).

Para mantener la homeostasis de este neurotransmisor existen dos familias de transportadores: los vesiculares de Glu (VGLUTs) y los de aminoácidos excitadores dependientes de sodio (EAAT). Los VGLUTs permiten la incorporación del Glu sintetizado o capturado en la terminal sináptica a vesículas sinápticas para su almacenamiento; éste es un proceso que depende de una baja concentración de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y su actividad se lleva a cabo a través del acoplamiento a una ATPasa que genera un gradiente electroquímico de protones.



Los cuáles acidifican la vesícula sináptica, vuelven más positivo su interior y esto favorece la captura de Glu por la carga negativa de éste. Existen tres isoformas de los transportadores VGLUT, pero solo VGLUT1 y VGLUT2 son expresados mayoritariamente en el SNC (Liguz-Leczna y Skangiel-Kramska, 2007).

Por otra parte, existen 5 transportadores de aminoácidos excitadores dependientes de  $\text{Na}^+$  (EAAT1-5), localizados en la membrana de las neuronas y de los astrocitos, los cuales tienen una mayor afinidad por el Glu ( $K_m=5-50 \mu\text{M}$ ) que los VGLUT (Constante de Michaelis-Menten,  $K_m=1-3 \text{ mM}$ ), además de que los EAAT también transportan aspartato (Asp), mientras que los VGLUT no. Estos transportadores son los responsables de regular la concentración extracelular de Glu y Asp, removiéndolos de la hendidura sináptica, mediante el intercambio de 2 moléculas de sodio ( $\text{Na}^+$ ) al interior por una de  $\text{K}^+$  al exterior y así evitar que este neurotransmisor sobreactive a sus receptores. De acuerdo a la nomenclatura en la rata, el transportador EAAT1 del humano se denomina GLAST, el EAAT2 se conoce como GLT1 y el EAAT3 es el EAAC1, respectivamente (Divito y Underhill, 2014).

La mayor fuente de Glu extrasináptico en el cerebro proviene del transportador cistina/Glu ( $x_c^-$ ), cuyo funcionamiento de antiportador consiste en el intercambio de una molécula de cistina (dos cisteínas unidas) hacia el interior por la salida de una molécula de Glu, lo cual es indispensable para la formación de GSH que como ya se mencionó es una fuerte defensa antioxidante. El sistema  $x_c^-$  está en la membrana y es dependiente de  $\text{Cl}^-$ . Estructuralmente es un heterodímero compuesto por una subunidad de cadena pesada (4F2hc) y otra subunidad de cadena ligera, xCT (Soria *et al.*, 2014).

La unidad de la neurotransmisión es la sinapsis, la cual puede ser identificada por microscopía electrónica por sus densidades postsinápticas que consisten en conglomerados de receptores, moléculas de andamiaje y segundos mensajeros. Asimismo, los receptores de Glu pueden ser clasificados en ionotrópicos y metabotrópicos (Niciu *et al.*, 2012). Los receptores ionotrópicos son canales iónicos, que cuando son activados por un agonista (puede ser el Glu u otros compuestos) son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Na}^+$ . Estos receptores se clasifican farmacológicamente de acuerdo a su afinidad hacia tres agonistas selectivos: N-metil-D-Aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y kainato (KA), (Wang y Qin, 2010).

Los receptores de NMDA (NMDAr) son complejos heteroméricos compuestos por 4 subunidades codificados por 3 familias de genes diferentes: *GluN1*, *GluN2*, *GluN3*; para que el receptor sea funcional debe estar presente la subunidad *GluN1* (Paoletti y Neyton, 2007). El receptor NMDA es un receptor único, ya que requiere de la unión de dos neurotransmisores, el Glu y la glicina para activarse.



Normalmente el NMDAr requiere de dos subunidades GluN1 que se unen a la L-glicina (L-G) o D-serina (D-S) y 2 GluN2 que se unen al Glu u otro agonista de acuerdo a su afinidad (*Tabla 1*), para formar al receptor GluN1/GluN2, el cual es activado cuando los dos pares de moléculas se unen a su respectiva subunidad (Chatterton *et al.*, 2002; Traynelis *et al.*, 2010). Los receptores con la subunidad GluN3 tienen afinidad por la glicina (1-10  $\mu\text{M}$ ), por lo que en el caso particular de los receptores GluN1/GluN3, no necesitan del Glu para su activación; ya que la glicina es capaz de activarlos uniéndose a el sitio de cada subunidad (Cavara *et al.*, 2009; Cummings y Popescu, 2016).

**Tabla 1. Valores de EC50 ( $\mu\text{M}$ ) de la unión de los agonistas a la subunidad GluN2 del NMDAr. Adaptado de (Traynelis et al, 2010).**

Agonista	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
L-Glu	3.3	2.9	1.7	0.51
D-Glu	250	160	110	42
L-Aspartato	48	14	41	12
D-Aspartato	30	10	9.3	2.1
N-Metil-L-Aspartato	580	130	150	40
N-Metil-D-Aspartato	94	30	22	7.3

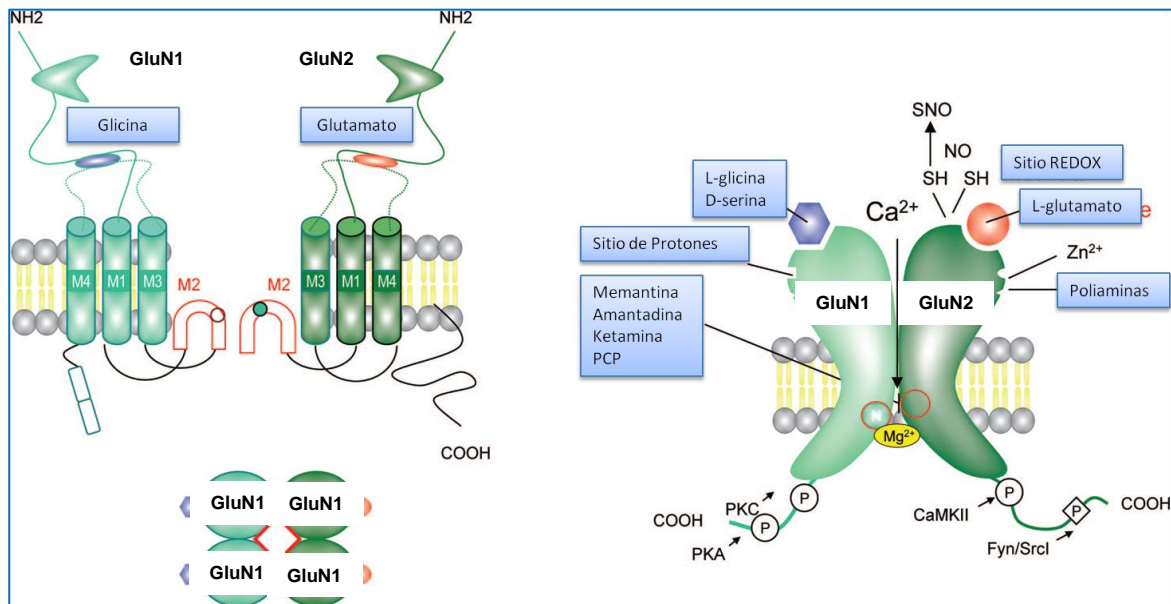
Cada subunidad contiene un extremo amino largo, cuatro segmentos transmembranales (tres cruzan la membrana y el otro es un asa que no cruza la membrana, M2), el carboxilo-terminal es intracelular y además contiene sitios de fosforilación. En el dominio M2 existe un sitio en el que se encuentra la asparagina (N598), cuya presencia es la responsable de la permeabilidad a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de todos los tipos receptores NMDA (*Figura 1*). El canal es bloqueado por magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) extracelular en forma voltaje-dependiente, por lo que debe de existir una despolarización de la membrana para que se libere el  $\text{Mg}^{2+}$  y se active el receptor; dicha despolarización está dada por los receptores no-NMDA presentes en la neurona postsináptica que se activan primero. Secundariamente, existen sitios que modulan de manera positiva el influjo iónico como los sitios de unión de poliaminas. Mientras que los sitios de unión a zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), el de modulación de la óxido-reducción (REDOX) y el que es sensible a protones, inhiben el flujo de iones (Benarroch, 2011).

Los receptores AMPA (AMPAr) son de excitación rápida, tienen una menor afinidad por el Glu que los NMDAr y están formados por estructuras tetraméricas cuyas subunidades se derivan de 4 familias de genes (*GluA1-4*). Todos los receptores AMPA son permeables a  $\text{Na}^+$  y potasio ( $\text{K}^+$ ) y dependiendo de la composición de las subunidades que lo conforman, pueden ser permeables o no a  $\text{Ca}^{2+}$ .

No obstante la mayoría de los AMPAR cuentan con la subunidad GluA2, lo que les confiere impermeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que en el sitio glutamina/arginina (Q/R) del dominio M2, hay una arginina (R) que por su carga positiva no permitirá el paso de  $\text{Ca}^{2+}$ ; esta arginina es resultado de una modificación postraduccional en dicho sitio (Slotkin y Nishikura, 2013). Por lo que los receptores que carezcan de esta la subunidad GluA2 o que no tengan la modificación en el sitio Q/R serán permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por otra parte, los receptores sensibles a KA, que también son activados por Glu y AMPA con menor afinidad, se forman por proteínas codificadas a partir cinco genes (*GluK1-5*) que forman parte de dos familias, que codifican para distintas subunidades que se combinan entre sí.

Por un lado, los receptores formados por GluK1-3 pueden formar receptores homoméricos o heteroméricos, mientras que las subunidades GluK4-5 solo forman receptores funcionales si se acoplan a las otras subunidades formando receptores heteroméricos. Estos receptores solo serán permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  si se encuentra una glutamina en el sitio Q/R (Lerma y Marques, 2013).



**Figura 1. Modulación alostérica de los receptores NMDA.** Los NMDARs son complejos heteroméricos compuestos por 4 subunidades derivadas de 3 familias: GluN1, GluN2 y GluN3. Se combina la subunidad GluN1 con la GluN2 o la GluN3 para formar un receptor funcional. Cada subunidad contiene un dominio amino terminal largo, 3 dominios transmembranales más una asa reentrante que es el sitio M2, y el dominio carboxilo terminal, que contiene sitios de fosforilación. Se forma una cavidad que contiene los sitios de unión para 2 moléculas de Glu y 2 de glicina. El canal está cerrado por  $\text{Mg}^{2+}$  de manera voltaje-dependiente. Adaptado de Benarroch, 2011.



Los receptores metabotrópicos son proteínas de 7 cruces transmembranales que forman dímeros y realizan su efecto una vez que se une el Glu a cada monómero del receptor. Posteriormente promueven el reclutamiento, así como la activación de proteínas G intracelulares ( $G_q/G_{11}$  o  $G_i/G_o$ ), las cuales son heterotriméricas ( $\alpha, \beta$  y  $\gamma$ ) y esto promueve la transducción de señales mediante segundos mensajeros (Nicoletti *et al.*, 2011).

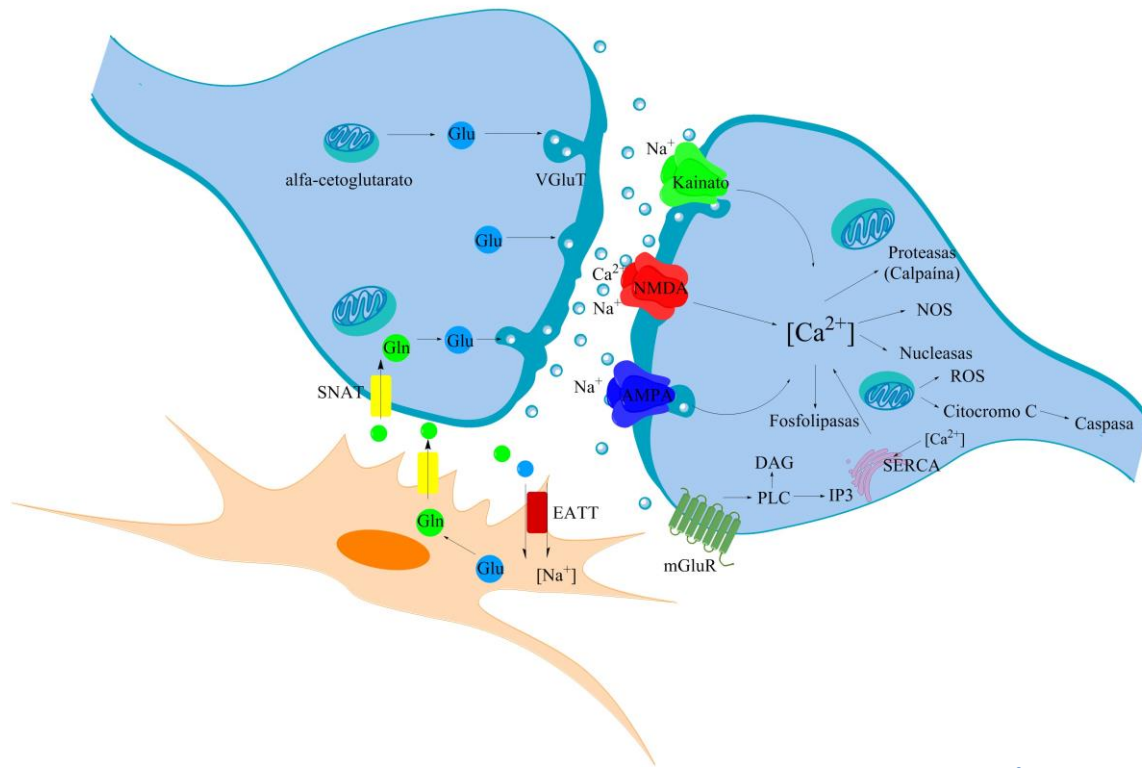
Se han identificado ocho receptores metabotrópicos de Glu (mGluR1-8), que a su vez han sido clasificados en tres grupos funcionales, de acuerdo a sus vías de señalamiento. Los receptores del grupo I están formados por mGluR1 y mGluR5, cuya subunidad  $\alpha$  activará a la fosfolipasa C (PLC) que río abajo producirá inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y así se liberará  $Ca^{2+}$  de los compartimentos intracelulares, además, la PLC también liberará diacilglicerol (DAG) que estimula a la proteína cinasa C (PKC). En cambio los receptores del grupo II y III, se acoplan a proteínas G inhibitoras ( $G_i$ ) que disminuyen los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) debido a la inhibición de la adenilato ciclasa (Kim *et al.*, 2008).

## 2.2 Excitotoxicidad

Como ya se mencionó, la neurotransmisión glutamatérgica es un proceso fisiológico crítico para la comunicación neuronal, ya que la mayoría de las sinapsis en el SNC son glutamatérgicas. Tanto las neuronas como los astrocitos deben de mantener una concentración de Glu intracelular de 2-10 mM, mientras que la concentración extracelular se debe de conservar en 1  $\mu$ M (Ye y Sontheimer, 1999).

La excitotoxicidad se desata cuando se libera el Glu en la hendidura sináptica en grandes concentraciones y/o de manera prolongada. La estimulación de los receptores de Glu origina una despolarización de la membrana de las terminales postsinápticas, lo cual por un lado activa a los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VOCC) y por otro lado facilita el desplazamiento de  $Mg^{2+}$  fuera del canal del NMDAr, ya que este también es voltaje-dependiente y esto permite el paso de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula.

Cuando la estimulación de estos receptores es sostenida, existe una excesiva acumulación de  $Ca^{2+}$  intracelular (Figura 2), el cual activará una serie de enzimas catabólicas como fosfolipasas, proteasas y endonucleasas, que llevarán a las neuronas a la muerte (Torregrosa, 2014).



**Figura 2. Proceso excitotóxico.** La despoliarización de la terminal presináptica induce el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y fusión de las vesículas, liberando Glu a la terminal sináptica. El Glu activa a los receptores AMPA en la neurona postsináptica induciendo una entrada de  $\text{Na}^+$  y despoliarización de la membrana. La liberación de Mg del poro que bloquea al receptor NMDA, induce su activación y entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual activa varias enzimas que tienen como blanco componentes celulares esenciales, además se promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), hay falla mitocondrial, así como daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA.

Las fosfolipasas pueden romper fosfolípidos, tanto de la membrana externa como de la membrana mitocondrial, desestabilizando esta última, lo cual ocasiona la salida de citocromo C, que junto con el factor activador de la proteasa apoptótica (APAF-1) y ATP forman un complejo de proteínas denominado apoptosoma, el cual activa a caspasas efectoras, localizadas en las membranas de la célula y que dirigen el desmantelamiento final de la célula (Camacho y Massieu, 2006).

Una proteasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$  es la calpaína, la cual es importante en la reorganización de la densidad postsináptica durante la excitación glutamatérgica, pero en condiciones patológicas la excesiva activación de la calpaína puede desestabilizar los microtúbulos y romper la membrana de los lisosomas. Estos eventos deterioran la estructura axonal y también contribuyen a la muerte neuronal (D'Orsi *et al.*, 2012; de la Cadena *et al.*, 2014; Geronimo-Olvera *et al.*, 2017).



Durante el proceso excitotóxico, la subunidad GluN2B forma un complejo con la proteína de densidad postsináptica (PSD95) y la óxido nítrico sintetasa (nNOS), que también es  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente. El complejo activa la síntesis de óxido nítrico (NO) que en presencia del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), forman el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que es un agente altamente oxidante y genera peroxidación de lípidos de membrana (Parathath *et al.*, 2007).

La excitotoxicidad trae como consecuencia todo este conjunto de procesos anteriormente mencionados, que pueden dar lugar a otros eventos como la apoptosis o la autofagia, que también pueden ocurrir a la par (D'Orsi *et al.*, 2012; de la Cadena *et al.*, 2014; Geronimo-Olvera *et al.*, 2017). Por lo tanto el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la postsinapsis debe de ser regulado mediante varios sistemas: uno es la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y otro sistema es la bomba de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que al expulsar  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior e introducir  $\text{Na}^+$  al interior celular, trabajará la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , igualmente dependiente de ATP, para eliminar al  $\text{Na}^+$  intracelular (Brini *et al.*, 2014). Por consiguiente, se consume mucha energía para mantener en equilibrio las concentraciones de iones, energía que se ve comprometida en condiciones patológicas como la isquemia, hipoxia, hipoglucemia y trauma craneoencefálico (Dong *et al.*, 2009)

Otro sistema de regulación es el mediado por los EAAT que se encuentran principalmente en los astrocitos. Debido a que el transporte de Glu por EAAT es dependiente del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$ , cuando se afecta este gradiente, por ejemplo, por la despolarización de la membrana bajo condiciones de falla energética, se induce la liberación de Glu de los astrocitos a través del transporte reverso del Glu. Además, con esta liberación de Glu, no solo activan a los receptores postsinápticos, sino que el exceso de este neurotransmisor también activa receptores extrasinápticos, que son aquellos que se encuentran fuera de la hendidura sináptica (Zhou *et al.*, 2015).

Dada la localización específica de los NMDAr, es posible que estos receptores tengan diferentes vías de señalamiento, esto les confiere distintos efectos, tanto neuroprotectores y principalmente neurodegenerativos. En particular se ha demostrado que la activación del NMDAr sináptico promueve una respuesta de sobrevivencia regulada por ERK, así como la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la activación del factor de transcripción CREB. En contraste, la activación de los NMDAr extrasinápticos tiene un efecto neurodegenerativo (Hardingham *et al.*, 2001; Hardingham *et al.*, 2002; Leveille *et al.*, 2008). Está ampliamente demostrado que el bloqueo de los receptores NMDA protege del daño excitotóxico, ya sea con antagonistas competitivos (como el AP5 y AP7 que se unen a la subunidad GluN2A) o no competitivos (como MK-801 que bloquea al canal del receptor).



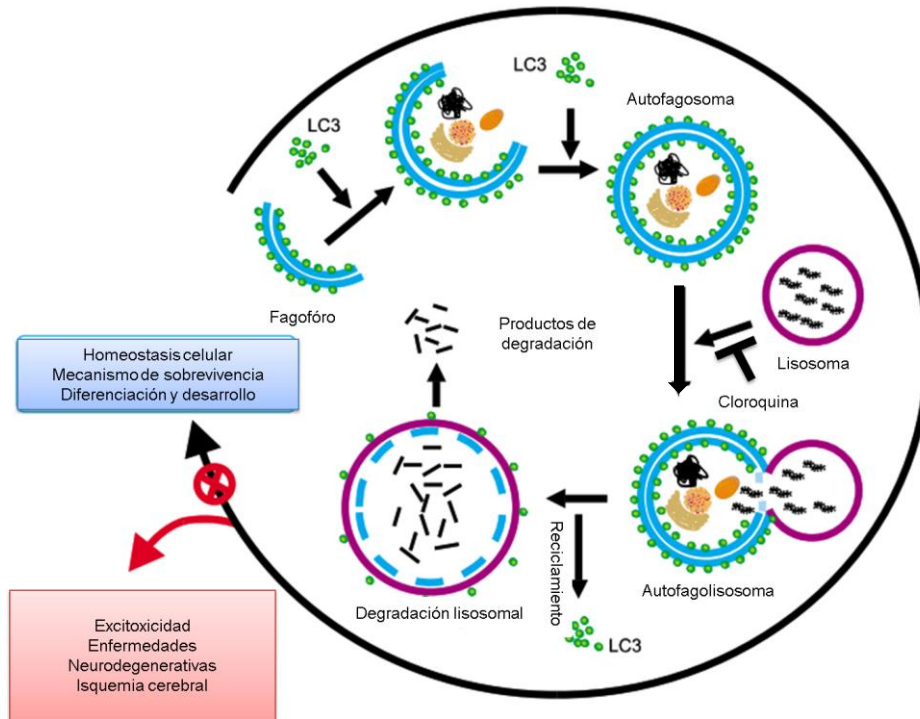


Básicamente la muerte excitotóxica ocurre por el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa varios sistemas enzimáticos que contribuyen a la generación de ROS, al daño mitocondrial e induce la activación la calpaína, entre otros. No obstante, se ha sugerido que durante la excitotoxicidad inducida por hipoxia, por el mismo Glu o compuestos agonistas de sus receptores se puede inducir autofagia, aunque ésta también pueda ocurrir de manera aberrante, es decir, mal adaptativa. La autofagia es un mecanismo fisiológico conservado, desde las levaduras, para mantener la homeostasis celular. Sin embargo, en condiciones de daño excitotóxico existe controversia, ya que algunos estudios sugieren que la autofagia es una respuesta de sobrevivencia (Braidy *et al.*, 2014; Rami y Benz, 2017), mientras que otros señalan que puede contribuir a la muerte (Descloux *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017) .

### 2.3 Autofagia

La autofagia es un proceso fisiológico, mediante el cual las células eucariontes reciclan su material citoplásmico, como organelos dañados, proteínas mal plegadas, proteínas de larga vida o agregados proteicos, a través de la degradación lisosomal para lograr la proteostasis (control y regulación de las proteínas). La autofagia también promueve la homeostasis celular, a través del control de calidad de los componentes celulares. Puede ocurrir como respuesta de sobrevivencia ante el estrés energético inducido por la ausencia de nutrientes, ante el estrés oxidante o el estrés del retículo endoplásmico desatado por la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas, y por la excitotoxicidad. Sin embargo, cuando la autofagia no procede adecuadamente o cuando está presente de manera excesiva, puede contribuir a la muerte de las células por la degradación de importantes componentes celulares, lo que se le conoce como muerte celular autofágica tipo 2 (Navarro-Yepes *et al.*, 2014).

La autofagia es clasificada en: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Glick *et al.*, 2010). No obstante, esta tesis se enfocará en la macroautofagia (denominada de aquí en adelante únicamente como autofagia), la cual es identificada por la formación de vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que engloban proteínas y organelos dañados para degradarlos al fusionarse con el lisosoma, formando el autofagolisosoma. Cabe mencionar que es un mecanismo muy complejo en donde participan varias “proteínas asociadas a la autofagia”, denominadas ATGs que forman múltiples complejos proteicos. Es un proceso que está dividido en varias etapas: iniciación, nucleación, elongación, fusión con el lisosoma y degradación. Se le denomina flujo autofágico (*Figura 3*) a la formación de autofagosomas y la subsecuente degradación de su contenido en el autofagolisosoma por acción de las hidrolasas (Klionsky y Emr, 2000; Mehta *et al.*, 2014; Rabinowitz y White, 2010).



**Figura 3. Autofagia y su regulación.** La autofagia contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular, se mantiene activa desde etapas de diferenciación y desarrollo, sin embargo, se ha visto que está desregulada bajo condiciones patológicas. Este es un proceso en donde participan muchas proteínas. Las etapas de este proceso son: iniciación, nucleación, maduración, fusión con los lisosomas y degradación de la carga. La cloroquina (CQ) es capaz de bloquear el flujo porque alcaliniza el pH de los lisosomas, impidiendo la función de sus enzimas. Adaptado de Jing y Lim, 2012.

### 2.3.1 Iniciación

En condiciones de privación de nutrientes o en que la energía está comprometida para restablecer la homeostasis celular, la disminución de los niveles de ATP y el aumento en los niveles de adenosín monofosfato (AMP) inducen la activación de la proteína AMP cinasa (AMPK). Ésta inhibe por fosforilación al complejo blanco de rapamicina en mamíferos (mTORC1), el cual es inhibidor de otro complejo, el de la cinasa activadora de la autofagia similar a unc-51 (ULK) y esto dará inicio a la autofagia. Por lo cual, la disminución de los niveles energéticos puede ser una condición para estimular la autofagia (Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Laker *et al.*, 2017).



La AMPK es una proteína heterotrimérica que responde a la relación AMP/ATP, lo cual controla el balance de energía en la célula, está compuesta por tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$ , contiene un dominio catalítico que puede ser activado por la proteína hepática B1 (LKB1) o por la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK). Tanto el adenosín monofosfato (AMP) como el adenosín difosfato (ADP) pueden unirse a dos sitios de la subunidad e inducir la activación alostérica de la AMPK, además de protegerla de la desfosforilación en Thr172, la cual es de activación (Li y Wei-Li, 2014). Sin embargo, cuando el ATP se une a otro sitio de la misma subunidad  $\gamma$ , causa la desfosforilación de AMPK, por lo tanto la AMPK actúa como un sensor de ATP (Li y Wei-Li, 2014).

El complejo de mTORC1 está compuesto por mTOR, la proteína reguladora asociada a mTOR (RAPTOR), la proteína rica en prolina (PRAS40), la proteína semejante a la subunidad  $\beta$  de la proteína G (G $\beta$ L) y la proteína con dominio DEP de interacción con mTOR (DEPTOR). Este complejo juega un papel importante en el metabolismo, crecimiento y proliferación celular, ya que en condiciones fisiológicas la subunidad RAPTOR de este complejo está unida al dominio PS de ULK1 y de esta manera permanece inhibida la autofagia.

En respuesta a la privación de nutrientes, se induce la autofagia por la desactivación del complejo mTORC1, el cual se disocia del complejo ULK, que se transloca al sitio de formación del fagóforo (Laplante y Sabatini, 2012). Dicho complejo de iniciación (ULK) está constituido por la proteína que interactúa con la familia de cinasas de adhesión focal (FIP200), las cinasas ULK1 y ULK2, así como las proteínas relacionadas a la autofagia ATG13 y ATG101

### 2.3.2 Nucleación

La nucleación del fagóforo es esencial para la formación del autofagosoma y depende del complejo PI3KC3, el cual contiene, fosfoinositido-3-cinasa subunidad regulatoria 4 (PIK3R4/VPS15), Beclina-1 (BECN1) y fosfatidilinositol-3-cinasa de clase III (PI3KC3/VPS34), que produce fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P). Éste último reclutará más proteínas al sitio en donde iniciará la formación de una doble membrana lipídica. BECN1 también se puede unir al regulador clave relacionado con la autofagia asociado a BECN1 (Barkor) y la molécula activada en autofagia regulada por BECN1 (AMBRA1), para incrementar la actividad del complejo (Sun *et al.*, 2009). Bajo condiciones normales el complejo PI3KC3 está unido a la dineína del citoesqueleto por medio de AMBRA1, pero en condiciones de estrés energético ULK1 fosforila a AMBRA1, lo cual libera al complejo PI3KC3 de los microtúbulos del citoplasma y esto permite su relocalización al retículo endoplásmico, que es uno de los organelos que más contribuyen a la formación del autofagosoma.



Por otro lado, la ATG9, que es una proteína transmembranal de transporte, es movilizada al sitio de nucleación donde cumple una función de reclutamiento de efectores y provee de lípidos al fagóforo para la etapa de elongación (Yuan *et al.*, 2013).

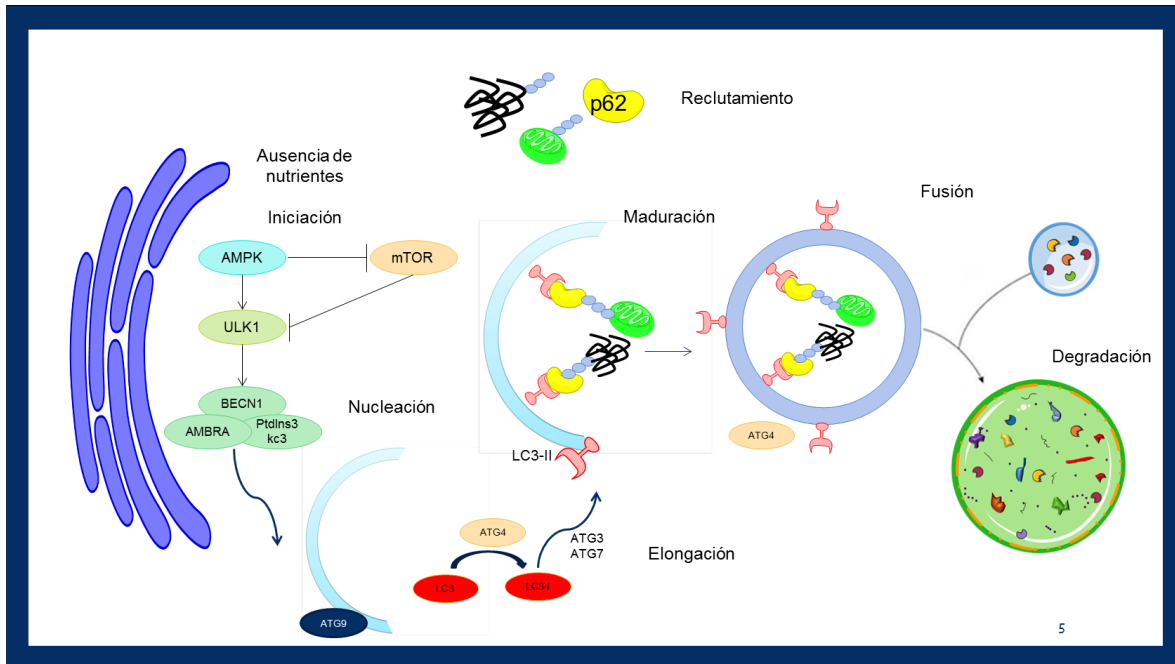
### 2.3.3 Elongación y maduración del autofagosoma

Existen 2 sistemas de conjugación parecidos a los de ubiquitin ligasa que participan en la elongación, modelado y sellado de la doble membrana, indispensables para dar lugar al autofagosoma maduro. El primer sistema es la conjugación de ATG5 con ATG12, en donde participan dos enzimas de tipo E-1 y E-2, que son las ATG7 y ATG10 respectivamente. Una vez conjugadas ATG5-ATG12 interactúan con ATG16L, para formar un complejo del mismo nombre de esta última proteína, que se asocia a la membrana del autofagosoma, afectando con esto su curvatura. Finalmente el complejo ATG16L se disocia de la membrana cuando el autofagosoma ha sido formado.

El segundo sistema de conjugación involucra a la proteína asociada a los microtúbulos de cadena ligera (LC3) que es cortada desde el carboxilo terminal por la cisteín-proteasa ATG4 para obtener la forma citosólica LC3-I, la cual tiene un residuo de glicina que se puede conjugar con la fosfatidiletanolamina (PE) con ayuda de ATG3, ATG7 y el complejo ATG6L para producir la forma lipidada LC3-II. Ésta proteína se localizará tanto del lado interno del autofagosoma, en donde se unirá al secuestrosoma (SQSTM1/p62) y del lado externo de la doble membrana en donde, una vez madurado el autofagosoma, LC3-II será desacoplado de PE por ATG4 para su reciclamiento (Tanida, 2008).

### 2.3.4 Fusión con el lisosoma y degradación

En el siguiente paso el autofagosoma maduro se fusionará con un lisosoma, para formar el autofagolisosoma, enseguida se comenzará a degradar la membrana interna de la vesícula y después la carga. SQSTM1/p62 es una proteína que recluta las proteínas ubiquitinadas que se une a LC3-II en la membrana interna del autofagosoma. De esta manera la carga que lleva SQSTM1/p62 queda dentro del autofagosoma y puede ser degradado junto con esta proteína por las hidrolasas catepsinas B, D y L. De ésta manera se obtienen nutrientes que son liberados al citoplasma, para mantener el metabolismo energético y la homeostasis celular (Bjørkøy *et al.*, 2009). Por lo tanto, un aumento en la transformación de la proteína LC3-I en LC3-II, en combinación con una disminución en la proteína SQSTM1/p62, es indicativo de que la autofagia se está llevando a término correctamente y que existe flujo autofágico. Todo el proceso de autofagia, así como las proteínas que participan en ésta, se muestra en la [Figura 4](#).



**Figura 4. Proteínas que participan en las etapas de la autofagia.** Durante un estrés energético como la privación de glucosa, los niveles de AMP aumentan, lo cual puede activar a la AMPK la cual a su vez puede activar a ULK1, ya sea directamente con una fosforilación o inhibiendo a un inhibidor de este complejo (mTOR) y de esta forma dar lugar a la iniciación de autofagia. Una vez activado ULK, fosforila al complejo PI3KC3/VPS34, induciendo de esta manera la nucleación y formación del fagóforo. El reclutamiento de los componentes dañados la lleva a cabo la proteína SQSTM1/p62 que se une a la forma lipidada de LC3 (LC3-II), una vez que madura el autofagosoma se fusiona con los lisosomas y se degradan los componentes dañados en el interior del autofagosolisosoma.

### 2.3.5 Reformación del lisosoma

Los productos de degradación como aminoácidos y monosacáridos, serán transportados al citoplasma por medio de transportadores lisosomales de membrana, como ATG22, que es un transportador de leucina y tirosina (Yang *et al.*, 2006). La autofagia es desencadenada por la inactivación de mTOR, pero cuando los autofagosolisosomas liberan aminoácidos, mTOR se reactiva y esto inicia el desensamblaje del autofagosolisosoma, resultando en una estructura tubular, altamente dinámica que permite la formación de vesículas positivas a la proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMP1), llamados “protolisosomas”. Los protolisosomas no son ácidos y no tienen capacidad de degradación, pero estas estructuras maduran adquiriendo proteínas del lumen lisosomal y de esta manera dar lugar a otro lisosoma, esta reformación del lisosoma ocurre después de que la autofagia llegó a su término.



## 2.4 Autofagia inducida por excitotoxicidad

Se ha estudiado el papel de la autofagia en la muerte neuronal excitotóxica en modelos *in vivo* e *in vitro*, usando agonistas farmacológicos de los receptores glutamatérgicos (Galluzzi *et al.*, 2016). Se ha encontrado que la autofagia se activa después de la administración de agonistas de los receptores a Glu (*Tabla 1*), ya que la transformación de LC3-I a LC3-II aumenta, sugiriendo mayor formación de autofagosomas (Borsello *et al.*, 2003; Caldero *et al.*, 2007; Katsumata *et al.*, 2014; Matyja *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2017; Shacka *et al.*, 2007).

Aún es controversial el papel de la autofagia en el daño excitotóxico ya que algunos estudios apuntan a que ésta contribuye a la muerte mientras que otros sugieren que tiene un papel protector. Por otra parte, en algunos estudios no se valoró el efecto de la autofagia sobre la sobrevivencia, ni tampoco la presencia de flujo autofágico (Katsumata *et al.*, 2014; Shacka *et al.*, 2007). Sin embargo, en la mayoría de los estudios citados se demuestra un aumento de los niveles de LC3-II después del estímulo, lo cual se interpreta como activación de la fase inicial del proceso autofágico.

### 2.4.1 Participación de los receptores NMDA en la activación de la autofagia

En cultivos de neuronas de hipocampo se encontró que la despolarización inducida por cloruro de potasio (KCl) aumenta los niveles de LC3-II y de autofagosomas, lo cual fue inhibido parcialmente por el ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (APV), un antagonista selectivo de NMDAr.

Ésto sugiere que la estimulación neuronal induce autofagia y que ésta es dependiente de los NMDAr. Mediante estudios de western blot, los autores observaron una disminución en los niveles de las proteínas fosforiladas p-Akt y p-mTOR, por lo que sugirieron que la autofagia se induce a través de la inhibición de la vía PI3K-AKT-mTOR (Shehata *et al.*, 2012).

**Tabla 2. La autofagia es inducida por la estimulación de los receptores a Glu**

Publicación	Modelo	Fármacos:	Efecto
<i>Pereira et al., 2017</i>  <b>Oncotarget</b>	<b>In vitro</b> Cultivo de astrocitos de corteza de rata y células de neuroblastoma (SHSY5Y). Tratamiento con Glu.	Glu: 10 $\mu$ M	El Glu aumentó los niveles de LC3-II/LC3-I y este incremento se exacerba con inhibidores lisosomales, tanto en los astrocitos como en las células de neuroblastoma.
<i>Katsumata et al., 2014</i>  <b>Autophagy</b>	<b>In vitro</b> Cultivo de células granulares del cerebelo de ratón. Exposición a NMDA y glicina por 24 h.	NMDA: 300 $\mu$ M Glicina: 5 $\mu$ M	Incremento de los niveles de LC3-II y disminución de los de SQSTM1/p62. Se incrementó el contenido de autofagosomas. No se midió la viabilidad.
<i>Shacka et al., 2007</i>  <b>Neuroscience Letters</b>	<b>In vivo</b> Rata wistar. Inyección intraperitoneal de KA.	KA: 20 mg/Kg	La administración de KA incrementó significativamente la cantidad de LC3-II a las 4 y 6 h. Se activó la vía de mTOR a las 6 h, lo cual puede ser una regulación negativa de la inducción de la autofagia.
<i>Caldero et al., 2007</i>  <b>Journal of Neuroscience Research</b>	<b>In vitro</b> Cultivo de médula espinal de embriones de pollo. Tratamiento crónico con NMDA	NMDA: 0.5 mg en E5-E6 0.25 mg en E7-E9	Con microscopía electrónica se observaron proteínas acumuladas en el retículo endoplásmico, con inmunohistoquímica la acumulación de células positivas a LC3. Por lo que se sugiere que existe una degeneración de motoneuronas acompañada de autofagia.
<i>Matyja et al., 2005</i>  <b>Ultrastructural Pathology</b>	<b>In vitro</b> Cultivo organotípico de columna lumbar de rata. Tratamiento con bloqueadores del transporte de Glu.	Ácido DL-treo- $\beta$ -hidroxiaspártico (THA): 100 $\mu$ M L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato (PDC): 100 $\mu$ M	Estudio de microscopía electrónica donde el bloqueo de los transportadores de Glu promueve el desarrollo de lisosomas, vacuolas autofágicas y morfología apoptótica, sugiriendo la coexistencia de autofagia y apoptosis y esto contribuye al daño estructural de las células.
<i>Borsello et al., 2003</i>  <b>European Journal of Neuroscience</b>	<b>Ex vivo</b> Rebanadas de hipocampo de rata. Se expone a NMDA 0.5, 1, 2 4 y 8 h.	NMDA: 100 $\mu$ M	Por medio de microscopía electrónica se observó formación de autofagosomas 2 h después de la exposición a NMDA, así como un incremento de los autofagolisosomas a las 4 y 8 h.



#### 2.4.2 Papel de la autofagia como una respuesta de sobrevivencia ante la excitotoxicidad

El papel de la autofagia en la sobrevivencia neuronal después de un estímulo excitotóxico ha sido sugerido por algunos estudios. Dado que el proceso de excitotoxicidad es energéticamente costoso para restablecer el potencial de acción de la membrana de las neuronas, de manera interesante se ha utilizado un tratamiento con piruvato (que es un sustrato energético), frente a la excitotoxicidad inducida por Glu. En la línea celular humana SH-SY5Y, el piruvato promueve la disociación de la cinasa asociada a la muerte 1 (DAPK1) del receptor NMDA y la asociación de esta a Beclina-1, lo cual activa a la autofagia, mejora la viabilidad celular y protege a las mitocondrias. Este artículo también sugiere que promover la autofagia con el piruvato es importante para la sobrevivencia durante la excitotoxicidad. Sin embargo, este estudio tiene ciertas limitaciones, como la estabilidad del piruvato en solución, la alta concentración que se necesita de éste, y además el efecto se demostró después de un pretratamiento (Tian *et al.*, 2014).

También se ha reportado que el litio (Li) incrementa la autofagia inducida por KA en cultivos de médula espinal de ratón. Mediante microscopía electrónica se observó que disminuyen las vacuolas estancadas y mitocondrias dañadas en neuronas motoras después de la exposición a Li (Fulceri *et al.*, 2011).

En un estudio se observó un aumento del cociente LC3-II/LC3-I y de la proteína Beclina-1 a las 6 h en el hipocampo de ratones C57BL/6, los cuales muestran resistencia al daño en esta región cuando se induce epilepsia con KA, sugiriendo que la resistencia al daño excitotóxico está acompañada de la inducción de la autofagia, aunque el estudio es correlativo (Rami y Benz, 2017).

En otro estudio en la línea celular SHSY5Y, el Glu en concentraciones fisiológicas incrementó los niveles de LC3-II y este aumento fue mayor cuando bloquearon la degradación autofágica en presencia de E64d y peptstatina A, dos inhibidores lisosomales, lo que sugiere que el aumento en LC3-II en presencia de Glu se debe solo a la formación de autofagosomas. Adicionalmente, en cultivos de astrocitos de corteza mediante estudios de western blot y utilizando inhibidores de la vía NAADP/TPC/AMPK, los autores propusieron que esta vía participa en la inducción de la autofagia, como mecanismo adaptativo para mantener el homeostasis de la célula con el aumento de los niveles de Glu, sin que la concentración de éste sea tóxica (Pereira *et al.*, 2017).



### 2.4.3 Papel de la autofagia en la muerte excitotóxica

La contribución de la autofagia al daño excitotóxico ha sido sugerida por muchos estudios y algunos de estos se describen en la *Tabla 3*. Recientemente se ha reportado que 24 h después de la inyección de ibotenate, un análogo del Glu, en neonatos de rata, se incrementa LC3-II y disminuyen los niveles de SQSTM1/p62, sugiriendo un flujo autofágico activo. La administración de 3-metiladenina (3-MA), un inhibidor de la etapa inicial de la autofagia (inhibe la PI3KC3), disminuyó el daño neuronal, proponiendo la contribución de la autofagia a la lesión excitotóxica. Para reafirmar estos resultados, en el mismo estudio utilizaron cultivos de neuronas corticales donde se observó muerte celular y este efecto fue abatido cuando se silenciaron los genes de las proteínas ATG7 y BECN1 (Descloux *et al.*, 2018), confirmando que la autofagia inducida en estas condiciones contribuye al daño.

*Tabla 3. La autofagia contribuye al daño excitotóxico*

Publicación	Modelo	Fármacos:	Efecto
<b>Descloux et al., 2018</b>  <b>Cell Death and Disease</b>	<b>In vivo</b> Administración de ibotenate en ratas recién nacidas (5 días postnatales).  <b>In vitro</b> Cultivos corticales de neuronas expuestas a ibotenate. Inhibición farmacológica y genética de la autofagia.	Ibotenate: 10 µg 3-MA: 60 µg  Ibotenate: 50 µM 3-MA: 10 mM	Aumento del cociente LC3II/LC3-I y disminución de SQSTM1/p62 a las 24 h. 3-MA redujo el daño, medido con violeta de cresilo.  Aumento del cociente LC3II/LC3-I y disminución de SQSTM1/p62. Aumento de la sobrevivencia por 3-MA y silenciamiento de <i>ATG7</i> y <i>BECN1</i> .
<b>Wang et al., 2018</b>  <b>CNS Neurosci Ther.</b>	<b>In vivo</b> Rata wistar. Inyección <i>icv</i> de KA.	KA: 25 mg/kg	Niveles elevados de LC3-II, ATG5, ATG7, ATG12 y Beclina-1 y disminución de SQSTM1/p62 a las 24 h. Un micro-RNA que inhibió la autofagia preservó mejor el tejido en las tinciones de hematoxilina-eosina y Nisil.



<p><b>Yang et al., 2017</b>  <b>Frontiers in Cellular Neuroscience</b></p>	<p><b>In vitro</b>          Línea celular HT22.          Tratamiento con Glu.</p>	<p>Glu: 10 Mm          RAP: 4 <math>\mu</math>M          CQ: 10 <math>\mu</math>M</p>	<p>De acuerdo a los marcadores de LC3-II, Beclina-1 y SQSTM1/p62. La reducción de la excesiva autofagia inducida por Glu a las 24 h promueve la sobrevivencia, Mientras que su activación con RAP produce muerte.</p>
<p><b>Yin et al., 2016</b>  <b>Mol. Cell. Biochem.</b></p>	<p><b>In vitro</b>          Cultivo de neuronas corticales.          Exposición a Glu.</p>	<p>Glu: 50 <math>\mu</math>M          Bafilomicina:0.1 <math>\mu</math>M          3-MA:10 mM</p>	<p>El Glu aumento LC3-II y Beclina-1, mientras que SQSTM1/p62 disminuyó. El 3-MA aumentó la viabilidad y redujo los niveles de LC3-II.</p>
<p><b>Dong et al., 2012</b>  <b>Neuroscience</b></p>	<p><b>In vitro</b>          Cultivo primario de células estriales de rata Sprague-Dawley.</p>	<p>KA: 100 <math>\mu</math>M          3-MA: 10 mM</p>	<p>Incremento de LC3-II, Beclina-1 y autofagosomas observados con microscopia electrónica. Disminución de SQSTM1/p62 y disfunción mitocondrial en las primeras 8 h. La activación de la autofagia con 3-MA contrarrestan los efectos del KA sobre LC3-II, Beclina-1 y SQSTM1/p62. También el 3-MA contrarrestó los efectos adversos en la mitocondria tanto en la pérdida de su potencial de membrana como en el estrés oxidante.</p>
<p><b>Chang et al., 2012</b>  <b>J. Pineal Res.</b></p>	<p><b>In vivo</b>          Ratonos C57BL/6.          Inyección i.p. de KA.</p>	<p>KA: 20 mg/Kg</p>	<p>Incremento de LC3-II, LAMP-2 y catepsina B en el hipocampo. La transfección de un siRNA dirigido a ATG7, previno el incremento en LC3-II, la pérdida de mitocondrias y de neuronas hipocampales; Hubo activación de las caspasas 3 y 12, lo que sugiere un rol pro-apoptótico de la autofagia.</p>
<p><b>Li et al., 2018</b>  <b>Biomedicine and pharmacotherapy</b></p>	<p><b>In vivo</b>          Rata Sprague-Dawley.          Glaucoma inducido por una Inyección intravítrea de NMDA.   <b>In vitro</b>          Células ganglionares de la retina en cultivo.</p>	<p><b>In vivo</b>          NMDA: 160 nmol   <b>In vitro</b>          NMDA: 100 <math>\mu</math>M          3-MA: 5 mM</p>	<p>Incremento de LC3-II y Beclina-I a los 1-5 días después de la inyección de NMDA en las retinas. La inhibición de la autofagia aumentó la sobrevivencia.           Aumento de marcadores de autofagia en los cultivos celulares y el 3-MA aumenta la viabilidad.</p>



<b>Xu et al., 2018</b>  <b>Neural Regeneration Research</b>	<b>In vivo</b> Neonatos de ratas Isquemia inducida por la ligadura de la arteria carótida común izquierda.	3-MA: 10 mM Rapamicina (RAP): 1 g/kg	La lesión en el hipocampo provocó un incremento en LC3-II y Beclina-1. El 3-MA evitó la lesión, mientras que la RAP aumentó el daño hipocampal.
<b>Kumari et al., 2012</b>  <b>PLoS ONE</b>	<b>In vitro</b> Células de ratón hipocampales HT22, que carecen de receptores inonótrpocos. Tratamiento con Glu.	Glu: 4 mM	Aumento de LC3-II y Beclina-1 a las 6 y 24 h. Selenio evito el aumento de estos marcadores y mejoró la viabilidad celular. Co-localización de LC3-II con pDrp1, lo cual asocia a la autofagia con la fisión mitocondrial.
<b>Wang et al., 2009</b>  <b>European Journal of Neuroscience</b>	<b>In vivo</b> Rata Sprague- Dawley. Inyección intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN).	QUIN: 60 nmol 3-MA: 200 nmol	Después de la administración de QUIN se incrementaron los niveles del modulador de la autofagia regulada por daño (DRAM), el cociente LC3-II/LC3-I y Beclina-1. La microscopía electrónica encontró formación de autofagosomas y lisosomas. Un pretratamiento con un inhibidor de la autofagia, redujo el daño inducido por QUIN, analizado por tinción de violeta de cresilo.
<b>Kim et al., 2009</b>  <b>Biochemical and Biophysical Research Communications</b>	<b>In vitro</b> Línea celular HT22. Tratamiento con Glu.	Glu: 5 mM 3-MA: 5 mM	El Glu por 12 h incrementó la conversión a LC3-II, aumentó la fluorescencia de GFP-LC3, y la degradación. La vía de mTOR se inhibió, el 3-MA bloqueó la conversión a LC3-II y aumentó la sobrevivencia de células.
<b>Caldero et al., 2007</b>  <b>Journal of Neuroscience Research</b>	<b>In vitro</b> Cultivo de médula espinal de embriones de pollo. Tratamiento crónico con NMDA.	NMDA: 0.5 mg en E5-E6 0.25 mg en E7-E9	Por microscopía electrónica se observaron proteínas acumuladas en el retículo endoplásmico; por inmunohistoquímica la acumulación de células positivas a LC3. Se sugiere degeneración de moto-neuronas acompañada de autofagia.

En concordancia con las observaciones anteriores, en un modelo de ratas a las que se les indujo epilepsia con KA, se observó un aumento en el flujo autofágico, ya que aumentó LC3-II y disminuyó SQSTM1/p62; al utilizar un miRNA (MiR-181b) se atenúo la autofagia y se redujo la muerte (Wang et al. 2018). En otro estudio *in vitro* en neuronas corticales se utilizó Glu, y se observó que tanto el cociente LC3-II/LC3-I, como los niveles de Beclina-1 se incrementaron y la abundancia de SQSTM1/p62 se redujo a las 6, 12 y 24 h; asimismo, al administrar 3-MA se observó mayor viabilidad de las células (Yin *et al.*, 2016), apoyando la hipótesis de que la autofagia exacerbada contribuye a la muerte.

La administración intravítrea de NMDA, se utilizó como un modelo de glaucoma en ratas. En este modelo se observó que el cociente LC3-II/LC3-I y los niveles de Beclina-1 se incrementaron de manera tiempo-dependiente. Resultados similares se observaron en cultivos de células ganglionares de la retina, en donde además, se incrementó la viabilidad celular cuando se inhibió la autofagia (Li *et al.*, 2018), sugiriendo su participación en el daño. De igual manera, en un modelo de ácido quinolínico (QUIN) inyectado directamente en el estriado de la rata, se observó un aumento en los mismos marcadores de autofagia que el estudio anterior y además cuando se administró el 3-MA se redujo el daño inducido por QUIN, documentado por la tinción de violeta de cresilo de cortes de cerebro, sugiriendo también que la autofagia participa en la muerte (Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, en estos dos últimos estudios no se determinó si la autofagia ocurrió de manera deficiente, ya que no se investigó si el flujo autofágico estaba activo, lo cual abre la posibilidad de que la muerte sea por una autofagia exacerbada ([Tabla 3](#)), o bien por un defecto en la autofagia como lo proponen los trabajos citados en la [Tabla 4](#), lo cual se ha sugerido en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Nassif y Hetz, 2012).

*Tabla 4. El bloqueo del flujo contribuye a la muerte celular*

Publicación	Modelo	Fármacos	Efecto
<i>Kulbe et al., 2014</i>  <i>Brain Research</i>	<i>In vitro</i> Cultivo de neuronas de hipocampo de rata. Tratamiento con Glu.	Glu: 100 $\mu$ M RAP: 1 $\mu$ M CQ: 5 $\mu$ M	El Glu aumenta los niveles de LC3-II/LC3-I y SQSTM1/p62 2 h después del tratamiento. Existe menor muerte cuando se agrega RAP a las 4 h y trehalosa a las 24 h.
<i>Perez-Carrion et al., 2012</i>  <i>Journal of Neurochemistry</i>	<i>In vitro</i> Cultivos corticales de neuronas de rata. Exposición de las neuronas a NMDA.	NMDA: 150 $\mu$ M	Se silenció con un siRNA al gen de la proteína <i>Beclina-1</i> , lo cual dio lugar a una acumulación de autofagosomas (MDC) y cuando las células fueron expuestas a NMDA se incrementó la muerte por excitotoxicidad después de 24 h.

<b>Fulceri et al., 2011</b>  <b>Archives Italiannes de Biologie</b>	<b>In vitro</b> Cultivos de médula espinal de ratones albinos suizos. Tratamiento con KA.	KA: 50 $\mu$ M	Se observó una acumulación de autofagosomas por microscopía electrónica en las células expuestas a KA, lo que se relacionaba con la pérdida de neuronas motoras. La activación farmacológica con Li de la maquinaria autofágica contrarrestó el daño y evitó la acumulación de autofagosomas.
<b>Sadasivan et al., 2010</b>  <b>BMC Neuroscience</b>	<b>In vitro</b> Cultivos de neuronas granulares. Tratamiento con NMDA.	NMDA: 200 $\mu$ M 3-MA: 10 mM	Se incrementaron los niveles de LC3-II y Beclina-1 a las 6, 12 y 24 h de exposición a NMDA, también aumento la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Hubo acumulación de autofagosomas teñidos con MDC a las 16 h, los cuales disminuyen a la par de la liberación de LDH con un inhibidor de la autofagia (3-MA).

La presencia de una autofagia aberrante, no adaptativa debido a la falla lisosomal y al bloqueo del flujo autofágico durante la excitotoxicidad, puede contribuir a la muerte (*Tabla 4*). La falla lisosomal durante la excitotoxicidad se demostró en un modelo *in vitro* de células granulares de cerebelo de rata, las cuales se expusieron a NMDA durante tiempos prolongados. Ésto aumentó significativamente los niveles de Beclina-1 y LC3-II. También se usó la tinción con monodencil cadaverina (MDC) para marcar vesículas acídicas (lisosomas y autofagolisosomas). La intensidad de esta tinción aumentó a las 24 h después de la exposición a NMDA lo que sugirió la interrupción del flujo autofágico; además de que un inhibidor de las proteasas lisosomales también incrementó a LC3-II, sugiriendo que la falla en la función lisosomal contribuye a la acumulación de autofagosomas durante estas condiciones de excitotoxicidad. Más aún, al inhibir la autofagia, tanto farmacológicamente con 3-MA como con un siRNA dirigido a *ATG7*, se redujo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), que comúnmente se usa como un índice de muerte celular (Sadasivan *et al.*, 2010).

Apoyando la misma idea, en cultivos corticales de neuronas que se expusieron a NMDA, hubo un aumento en la tasa LC3-II/LC3-I, Beclina-1 y acumulación de autofagolisosomas marcados con MDC a las 24 h, dichos cambios fueron revertidos cuando se silenció con un siRNA del gen *BECN1*. También se observó que hubo mayor liberación de LDH, lo cual sugiere que hay menor sobrevivencia en los cultivos tratados con NMDA y estos cambios fueron revertidos nuevamente con la inhibición genética de Beclina-1 (Perez-Carrion *et al.*, 2012).



Otro estudio de nuestro laboratorio en neuronas corticales en cultivo reportó datos similares en condiciones de privación y reintroducción de glucosa en las que la activación de la autofagia contribuye a la muerte debido a que se encuentra bloqueada por el rompimiento lisosomal inducido por la activación de la proteasa calpaína (Geronimo-Olvera *et al.*, 2017). En este caso sí se demostró que la cloroquina (CQ) no es capaz de aumentar los niveles de SQSTM1/p62 durante el período de privación de glucosa sugiriendo el bloqueo de la degradación autofágica. La inhibición de la autofagia aumentó la viabilidad neuronal.

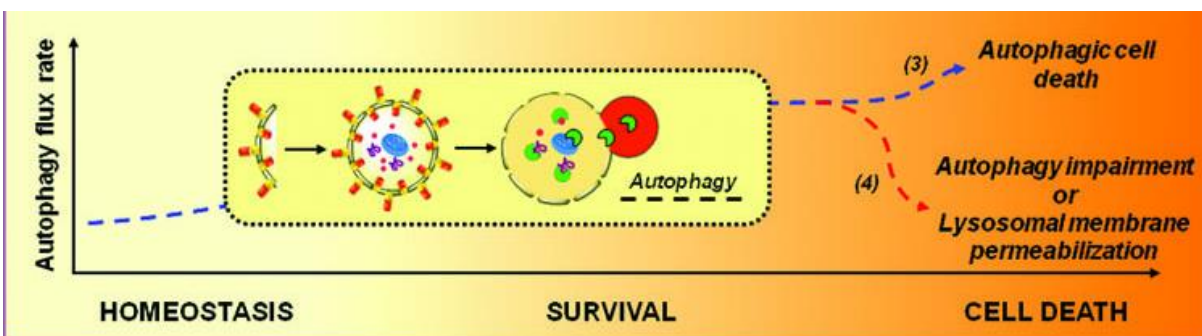
De manera interesante también se demostró que el D-Beta-hidroxibutirato (D-BHB), un cuerpo cetónico que puede reestablecer el metabolismo energético en condiciones de privación de glucosa, estimula el flujo autofágico y previene la muerte neuronal en estas condiciones, sugiriendo que este sustrato energético previene que se interrumpa la degradación autofágica (Camberos-Luna *et al.* 2016).

En otro estudio de neuronas hipocampales, tanto la exposición a Glu como a los inhibidores de proteasas indujo un aumento en los niveles de LC3-II y SQSTM1/p62. No hubo cambios en la sobrevivencia cuando se administró cloroquina, un inhibidor de la degradación autofágica, pero sorprendentemente al promover la autofagia con rapamicina (RAP) o trehalosa disminuyó la muerte celular. Sin embargo, el estudio no midió los efectos de la CQ y la RAP en los marcadores de autofagia, por lo que solo concluyen que si la autofagia es aberrante, una inducción de este proceso podría recuperar la viabilidad celular (Kulbe *et al.*, 2014).

Finalmente, como se puede apreciar en todos los trabajos revisados (*Tablas 2-4*) la autofagia es activada en respuesta a la excitotoxicidad. A través del uso de inductores de la autofagia, inhibidores o del silenciamiento de genes que participan en este proceso, se ha podido determinar su papel en la muerte o la sobrevivencia.

En todos estos trabajos se observó una activación de la autofagia con un agonista de los receptores de Glu, y la gran mayoría sugiere que la autofagia excesiva contribuye a la muerte (*Tabla 3*), pero también hay evidencia que indica que la autofagia es un proceso de sobrevivencia (Perez-Carrion y Cena, 2013; Tian *et al.*, 2014). Por lo que varios estudios proponen que es el bloqueo del flujo autofágico en condiciones de excitotoxicidad lo que verdaderamente causa la muerte (*Tabla 4*).

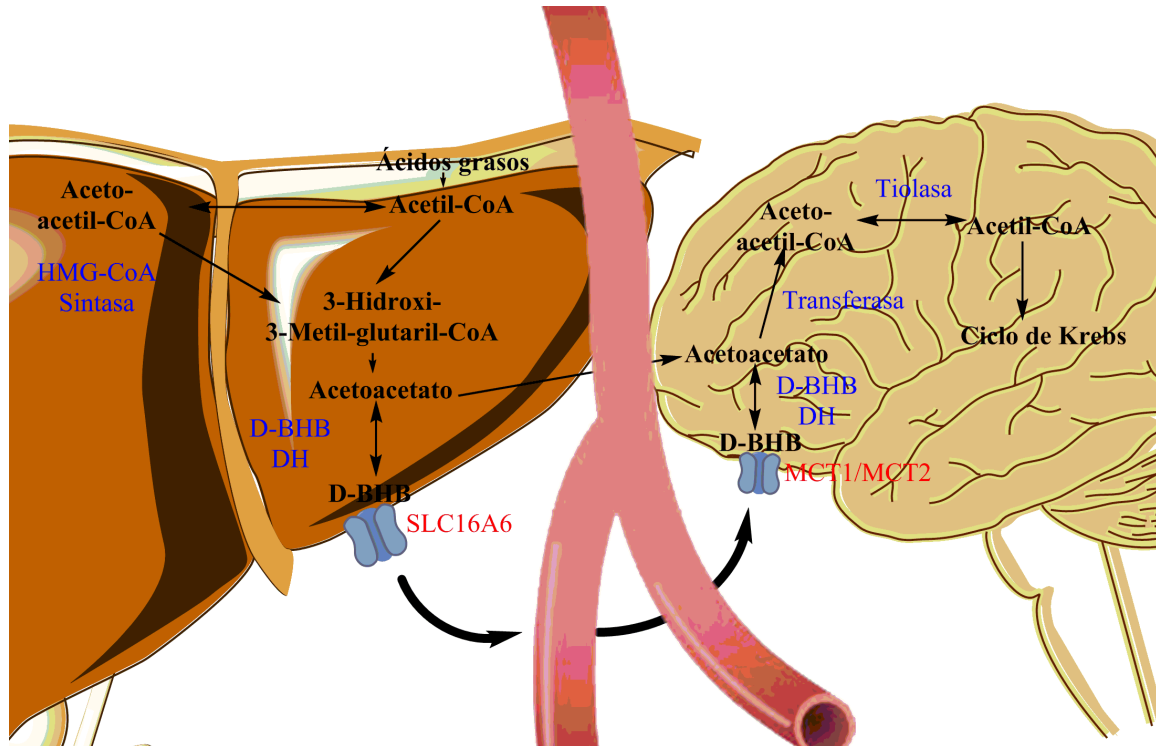
Considerando que la autofagia funciona como mecanismo para mantener la homeostasis y que se puede activar en condiciones de falta de energía o debido a la acumulación de proteínas dañadas, es posible que durante la excitotoxicidad la autofagia se active debido a estos factores. Además de que hay daño oxidativo y ocurre disfunción mitocondrial. Sin embargo, si la autofagia es excesiva también podría degradar componentes importantes para la célula o podría alterarse el proceso de autofagia en alguno de sus pasos y causar muerte (*Figura 5*). Por otra parte, los efectos de la autofagia son dependientes de la dosis del agonista que se utilice, así como la extensión del daño, ya sea sobre el tejido en los estudios *in vivo* o en los cultivos celulares.



*Figura 5. Papel de la autofagia en la supervivencia y muerte de la célula.* Bajo condiciones patológicas una excesiva autofagia puede promover la muerte a través de la degradación de importante componentes celulares, además de que una permeabilización de la membrana lisosomal ocasiona un bloqueo en el flujo autofágico y esto también puede resultar en la muerte de la célula. Tomado de Navarro-Yepes *et al.*, 2014.

## 2.5 Cuerpos Cetónicos

En los mamíferos bajo condiciones de inanición (Owen, 2006), ejercicio extenuante (Trefts *et al.*, 2015) o durante la lactancia (Gartner *et al.*, 2005), debido a la baja presencia de carbohidratos, se promueve la movilización de los ácidos grasos desde el tejido adiposo, que contiene aproximadamente el 80% de los lípidos de todo el cuerpo, hacia el hígado formando gotas lipídicas. Estos lípidos son metabolizados en la mitocondria por medio de la  $\beta$ -oxidación hasta formar acetil-Coenzima A (CoA), la cual puede ser utilizada como fuente de energía por las células hepáticas o sufrir una transformación a cuerpos cetónicos en un proceso conocido como cetogénesis (*Figura 6*).



**Figura 6. Metabolismo y transporte de los cuerpos cetónicos.** El primer paso de la cetogénesis es la  $\beta$ -oxidación, mediante la cual se metabolizan los ácidos grasos en el hígado a acetil-CoA el cual se convierte a acetoacetato, el cual a su vez se reduce a D-BHB y estos cuerpos cetónicos son liberados al torrente sanguíneo y son transportados al cerebro en donde el acetoacetato toma un acetil-CoA del succinil-CoA para formar la acetoacetil-CoA y finalmente este es cortado por una tiolasa en dos moléculas de acetil-CoA que entran al ciclo de Krebs.

En el primer paso una tiolasa cataliza una reacción reversible de condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. Esta nuevamente se condensa con otra molécula de acetil-CoA, pero esta vez de manera irreversible con ayuda de la  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintetasa para dar lugar a la HMG-CoA. Esta molécula es cortada en acetoacetato y acetil-CoA por una liasa.

El acetoacetato puede ser descarboxilado para formar acetona o bien ser reducido irreversiblemente por la enzima mitocondrial Beta-hidroxibutirato deshidrogenasa a D-Beta-hidroxibutirato (D-BHB), (Takagi *et al.*, 2016).

La acetona es producida en pequeñas cantidades y es muy volátil, por lo que es eliminada por la respiración, mientras que el acetoacetato y el D-BHB, son transportados por el torrente sanguíneo a tejidos extrahepáticos, en donde son capturados por medio de los transportadores de monocarboxilatos, para utilizarse como sustratos energéticos (Tieu *et al.*, 2003).





El cerebro usa glucosa como fuente principal de energía, sin embargo, se puede adaptar para usar acetoacetato o D-BHB bajo condiciones de estrés energético, ayuno, la lactancia o durante la dieta cetogénica, donde la glucosa se encuentra poco o nada disponible. La producción y transporte de los cuerpos cetónicos desde el hígado, permite que la oxidación de ácidos grasos continúe cuando la acetil-CoA no está siendo oxidada en el ciclo del ácido cítrico.

La energía se aprovecha a partir de la cetólisis de los cuerpos cetónicos en los tejidos extrahepáticos, particularmente el D-BHB es oxidado a acetoacetato por la enzima D-BHB deshidrogenasa que utiliza nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD<sup>+</sup>). El acetoacetato es activado por la transferencia de una coenzima a partir de la transformación de succinil-CoA a succinato, reacción catalizada por la  $\beta$ -cetoacil-CoA transferasa (también conocida como tioforasa). Entonces, la acetoacetil-CoA producida es cortada por una tiolasa para dar como producto dos moléculas de acetil-CoA que son incorporadas dentro del ciclo de Krebs (Nelson y Cox, 2017).

Una dieta cetogénica, se basa en la estimulación de la formación de cuerpos cetónicos mediante el consumo de grasas que al igual que el ayuno intermitente, ha demostrado que puede ofrecer protección en contra del daño inducido por distintos desórdenes neurológicos como epilepsia, Alzheimer y glioma maligno (McDonald y Cervenka, 2018).

### 2.5.1 Beta-Hidroxibutirato (D-BHB)

Los niveles séricos de D-BHB en humanos se encuentran normalmente en valores de orden micromolar, pero comienzan a elevarse después de 12-16 h de ayuno, alcanzando 1-2 mM después de dos días de ayuno y 6-8 mM si éste se prolonga. De igual manera, los niveles de D-BHB en sangre pueden alcanzar 1-2 mM después de 90 min de ejercicio intenso o con una dieta cetogénica después de 30 días (Newman & Verdin, 2017). Además de su acción metabólica al estimular la producción de Acetil-CoA, se han reportado múltiples acciones de este cuerpo cetónico que pueden explicar su efecto protector. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que la actividad metabólica del D-BHB en combinación con su actividad antioxidante contribuyen a su efecto protector (Camberos-Luna *et al.*, 2016; Haces *et al.*, 2008; Julio-Amilpas *et al.*, 2015; Lamichhane *et al.*, 2017).

En uno de los primeros estudios *in vivo* en los que se administró D-BHB, fue en un modelo de isquemia inducida por ligación de las arterias carótidas, en donde se determinó que el D-BHB reducía el daño al suprimir la elevación de contenido de agua (edema cerebral) y de Na<sup>+</sup> en el cerebro, al mismo tiempo que se mantuvieron altos los niveles de ATP y bajos los de lactato (Suzuki *et al.*, 2002).



Adicionalmente, se ha reportado que el D-BHB es un inhibidor endógeno y específico de las desacetilasas de histonas (HDACs) de clase I, lo cual se relaciona con cambios en la transcripción incluyendo la de aquellos genes que codifican para factores que contrarrestan al estrés oxidante como metalotioenina 2 (MT2) y FOXO3A (Shimazu *et al.*, 2013). Asimismo, se ha encontrado que el gen FOXO3A puede tener un efecto neuroprotector en un modelo de trauma craneoencefálico en ratas, al estimularse su translocación al núcleo e inducir la expresión de genes relacionados con la autofagia (Sun *et al.*, 2018).

También se ha demostrado que la administración sistémica del D-BHB tiene un efecto protector en la corteza contra el daño inducido por hipoglucemia severa al disminuir las células en proceso de degeneración y la fluorescencia de etidio, el cual se utilizó como marcador de ROS. Ésto se pudo corroborar en cultivos primarios de corteza que fueron sometidos a privación y reintroducción de glucosa, en los que se observó que el D-BHB redujo la cantidad de ROS y evitó la reducción de los niveles de ATP. Además, disminuyó la liberación de LDH y aumentó la viabilidad celular (Julio-Amilpas *et al.*, 2015).

En un modelo de excitotoxicidad inducida por la administración de Glu en animales tratados con el inhibidor glucolítico, yodoacetato, se observó que el D-BHB, disminuyó el tamaño de las lesiones de una manera similar a la del bloqueador del receptor NMDA, MK-801. Además, también se observó una menor lipoperoxidación en las ratas tratadas con D-BHB, lo que sugirió que su efecto protector está asociado a su acción antioxidante (Haces *et al.*, 2008).

Por otro lado, en cultivos de neuronas corticales, se observó que los niveles de LC3-II aumentan en condiciones de privación de glucosa, lo cual apunta a que se están acumulando autofagosomas bajo estas condiciones de estrés nutricional. El aumento en los niveles de LC3-II se atenúa en presencia de D-BHB, el cual también favorece la disminución de SQSTM1/p62 y estos efectos son abatidos en presencia de un inhibidor de la degradación autofágica, la CQ.

Estas observaciones sugirieron la estimulación del flujo autofágico por el D-BHB, posiblemente porque al mantenerse los niveles de ATP de las células, se favorece la degradación autofágica, se previene la acumulación de autofagosomas y mejora la sobrevivencia neuronal (Camberos-Luna *et al.*, 2016).



### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia del proceso de excitotoxicidad radica en que es común en varios desórdenes neurológicos, tales como el infarto cerebral (Camacho y Massieu, 2006), el trauma craneoencefálico, la hipoglucemia severa (Koch *et al.*, 2017; Lai *et al.*, 2014), la epilepsia (Buchhalter *et al.*, 2017) y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis lateral amiotrófica (Estrada Sanchez *et al.*, 2008; Kashiwaya *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2011; Netzahualcoyotzi y Tapia, 2015).

Por otra parte, existe mucha evidencia de los efectos protectores del D-BHB en distintos modelos de daño en los que se induce excitotoxicidad. Como se describió anteriormente la autofagia excesiva o el bloqueo del flujo autofágico pueden contribuir al daño excitotóxico y se ha demostrado que el D-BHB estimula el flujo autofágico bajo condiciones de deficiencia energética en un modelo de privación de glucosa *in vitro*, lo que correlaciona con el mantenimiento de los niveles de ATP, la disminución de la acumulación de autofagosomas y el aumento de la supervivencia neuronal (Camberos-Luna *et al.*, 2016).

En esta tesis nos propusimos investigar si el efecto protector del D-BHB en contra del daño excitotóxico inducido por la administración de NMDA en el estriado de la rata, está relacionado con la disminución de la autofagia excesiva o la estimulación del flujo autofágico. Se analizaron los cambios en los niveles de las proteínas, LC3-II y SQSTM1/p62 en el estriado y la corteza cerebral a las 24 h después de la inyección de NMDA en ratas tratadas o no con D-BHB. Éste cuerpo cetónico fue administrado sistémicamente o epiduralmente a través de una infusión continua.

Con el fin de conocer el estado del flujo autofágico en el cerebro de las ratas sometidas a los distintos tratamientos, se utilizó el inhibidor de la degradación lisosomal, la CQ. Ésta es una base débil, que en su forma protonada difunde dentro de los lisosomas, donde se desprotona y se queda atrapada, lo que eleva el pH lisosomal y en consecuencia las hidrolasas ya no llevan a cabo su función y el lisosoma ya no puede fusionarse con el autofagosoma, por lo tanto bloquea la degradación autofágica (Redmann *et al.*, 2017).



## 4 HIPÓTESIS

La administración de D-BHB estimulará el flujo autofágico evitando la acumulación de autofagosomas en el estriado y la corteza en un modelo *in vivo* de excitotoxicidad inducida por la administración de NMDA.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

- Analizar el efecto del D-BHB en la autofagia en un modelo *in vivo* de excitotoxicidad.

### 5.2 Objetivos Particulares

- Analizar los cambios en los marcadores de autofagia en el estriado y la corteza cerebral 24 h después de administración intraestriatal de NMDA.
- Analizar el efecto de D-BHB sobre los niveles de los marcadores de autofagia en el estriado y en la corteza de rata, 24 h después de la lesión excitotóxica inducida por NMDA.



## 6 MÉTODOS

### 6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM, con un peso de entre 280 y 300 gramos, las cuales fueron alojadas con libre acceso al agua y al alimento en condiciones controladas de temperatura (22°C), luz (un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad) y humedad (30%). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IFC (CICUAL / IFCLMT101-16).

Los animales se dividieron en 6 grupos:

1. Grupo de control intacto (CTRL).
2. Grupo con inyección intraestriatal de NMDA.
3. Grupo con inyección de NMDA + inyección intravenosa + inyección intraperitoneal de D-BHB (NMDA+D-BHB-I).
4. Grupo con NMDA + inyección intravenosa + mini bomba osmótica epidural (NMDA+D-BHB-II).
5. Grupo NMDA + inyección i.c.v de CQ (NMDA+CQ-I).
6. Grupo NMDA + tratamiento crónico CQ (NMDA+CQ-II).
7. Grupo NMDA + inyección post-lesión de CQ (NMDA+CQ-III).

### 6.2 Modelo de excitotoxicidad inducida por la administración de NMDA

Las ratas fueron colocadas bajo anestesia en un equipo estereotáxico con una exposición continua a isoflurano (0.5% de isoflurano) más oxígeno. Se indujo el daño excitotóxico mediante una inyección intracerebral (i.c.v) de 1 µl de NMDA (200 nmol) en el estriado izquierdo de la rata. La inyección se realizó con estereotaxia siguiendo las coordenadas: AP +0.7, L +2.8, V-4 a partir de Bregma (Paxinos & Watson, 1986).

#### 6.2.4 Efecto del D-BHB sobre la autofagia

El primer grupo de animales tratados con D-BHB recibió una administración de 250 mg/kg (500  $\mu$ l) de este cuerpo cetónico a través de una inyección intravenosa (i.v) y 3 h después recibieron una segunda inyección i.p de 250 mg/kg.

Otro grupo de animales recibió una inyección i.v con la misma dosis de 250 mg/kg y además se le implantó una mini bomba osmótica Alzet (Durect, Cupertino CA) en el dorso del animal con un catéter epidural para mantener un flujo continuo de D-BHB de una solución 2 M D-BHB a un flujo de 1  $\mu$ l/h durante 24 h. Finalmente los animales se sometieron a eutanasia 24 h después de la administración de NMDA, verificando que la bomba siguiera funcionando y permaneciera en el sitio donde se implantó.

#### 6.2.5 Efecto de la cloroquina

La CQ se administró siguiendo varias estrategias. Primeramente se disolvió la sal de CQ difosfato (Sigma, C6628) en solución salina y fue inyectada de manera i.c.v (25 mg/Kg) siguiendo las siguientes coordenadas: AP +0.7, L +1.2, V-5 a partir de bregma, para llegar al ventrículo izquierdo, justo después de la administración del NMDA como fue reportado por Viscomi *et al.*, 2012.

Dado que en un ensayo piloto esta dosis produjo la muerte de los animales, se intentó otro ensayo basado en un reporte del grupo de Zhang *et al.*, 2005, en el cual se redujo considerablemente la dosis de 25 mg/Kg a dosis más pequeñas de 0.61, 1.22 y 2.44 mg/Kg, i.c.v (Grupo NMDA+CQ-I). Se siguió otro protocolo de administración crónica de CQ durante cuatro días (i.p 50 mg/kg), incluyendo el día de la administración del NMDA y el día de la eutanasia (4 h antes de la eutanasia) (Grupo NMDA+CQ-II).



### 6.3 Western blotting

Las ratas tratadas con los distintos protocolos fueron sometidas a eutanasia con una dosis letal de pentobarbital sódico vía i.p 24 h después de los distintos tratamientos y se obtuvo el tejido cerebral después de extraer el cerebro y disectar las regiones de interés, más cercanas al área de la lesión (corteza y estriado). Inmediatamente después se homogenizó el tejido con un buffer de lisis con la siguiente composición: Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de Na<sup>+</sup> 0.5%, dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%, cocktail de inhibidores de proteasas (2 mg/ml) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) al 1%. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo al método de Lowry. Después se añadió a las muestras un buffer de carga (Laemmli sample buffer) y enseguida fueron calentadas a 99°C por 5 minutos.

Una vez desnaturalizadas las muestras, se cargaron 30 µg de proteína que fueron separadas por peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS al 16% mediante electroforesis con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y subsecuentemente transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Las uniones inespecíficas fueron inhibidas por incubación en leche al 5% diluida en solución Tris buffer salino (TBS), TBS con Tween 20 (TBST) al 1% a temperatura ambiente por 1 h. Las membranas fueron incubadas por una noche a 4°C con anticuerpos primarios en contra de los marcadores de autofagia: LC3 (1:6000, MBL international, PD014, Woburn, MA, USA) y SQSTM1/p62 (1:3000, Cell Signaling Technology, 51146, Danvers, MA, USA) así como un anticuerpo anti-β-actina (1:8000, Chemicon, Millipore, Merck Group, Darmstadt, Germany), utilizado como control de carga. Pasado el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas con TBST 0.1% e inmediatamente después incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h.



Al final, el anticuerpo secundario fue removido con lavados con TBST 0.1%. La inmunoreactividad fue detectada con un substrato de HRP quimioluminiscente (Inmobilon Forte, Millipore, P90720) y leído en un fotodocumentador C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences). Para evaluar los resultados del Western blot cada banda fue cuantificada por densitometría utilizando el programa Image-J para Windows.

Un incremento en los niveles de LC3-II se toma como un índice de un aumento en la formación o en la acumulación de autofagosomas, mientras que un decremento en los niveles de SQSTM1/p62 significa que el flujo autofágico está activo. Por otro lado si SQSTM1/p62 permanece a niveles basales o incrementa, se toma como un índice de que el flujo autofágico está bloqueado. Con estos marcadores se determinó si hay un aumento en la autofagia y si el flujo autofágico está activo.

#### **6.4 Análisis estadístico**

Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD). Los grupos fueron integrados por 3-6 individuos cada uno y se analizaron por una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba de post-hoc de Fisher con GraphPad Prism 7 para Windows.

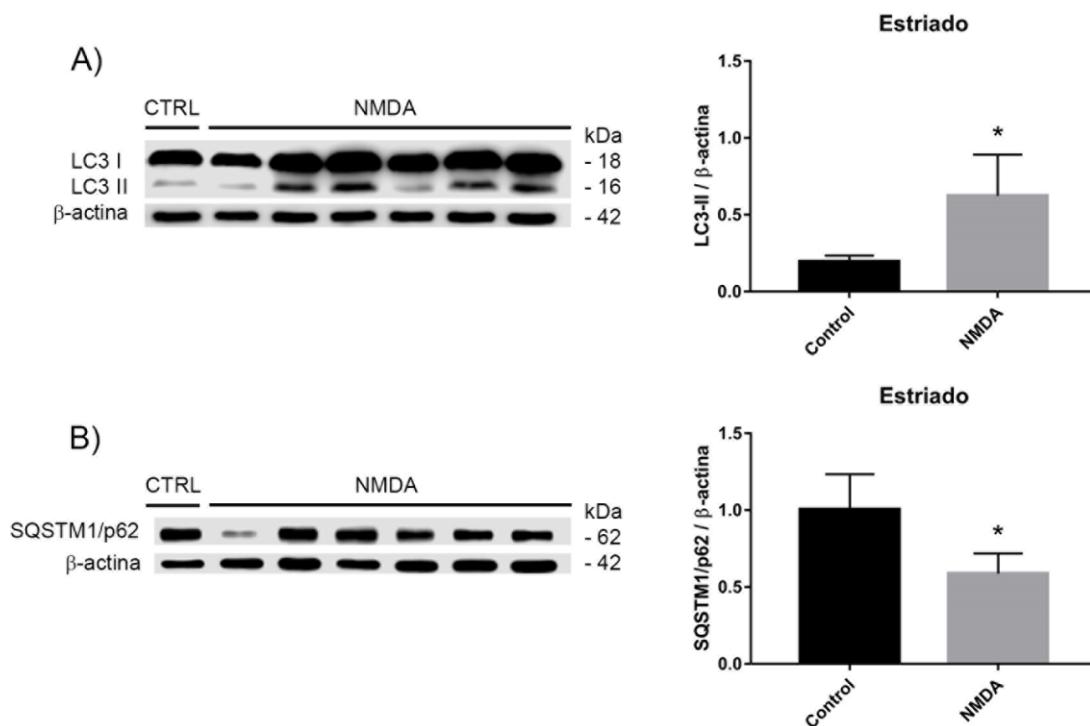


## 7 RESULTADOS

### 7.1 Inducción de la autofagia por la inyección de NMDA

La interpretación de los marcadores de autofagia se llevó a cabo de acuerdo a la guía de Klionsky *et al.*, 2016. Dado que la proteína LC3-II puede incrementarse con distintos estímulos, un aumento de este marcador debe de estar acompañado de una disminución de SQSTM1/p62, para concluir que la autofagia es funcional. Por otro lado, generalmente se ocupa la relación LC3-I/LC3-II, sin embargo, dado que particularmente en el cerebro se encuentra en mayor cantidad la proteína LC3-I que LC3-II (Mizushima *et al.*, 2004), se sugiere ocupar el cociente de LC3-II entre una proteína abundante como control de carga, que en este caso se utilizó la  $\beta$ -actina que es un componente del citoesqueleto muy abundante.

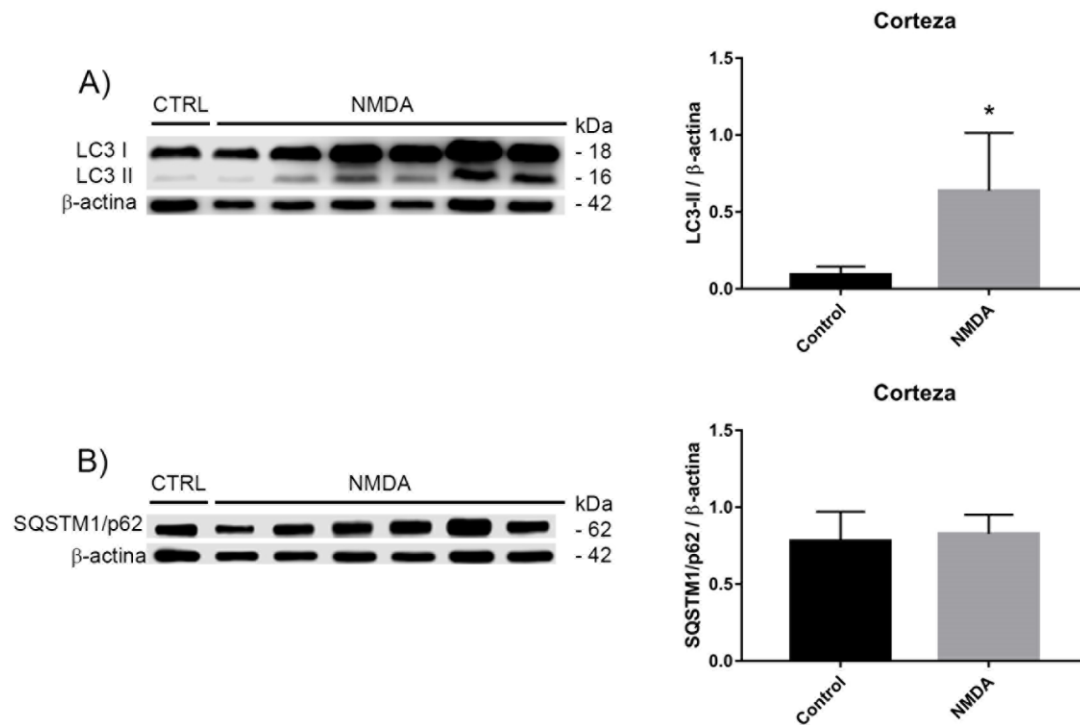
Las proteínas LC3-II y SQSTM1/p62 son marcadores de las etapas de maduración y degradación de la autofagia, respectivamente. Previamente se ha visto que los niveles de LC3-II se incrementan con la administración de NMDA con respecto al control 3 y 6 h después de la administración de NMDA, pero no hubo cambios en SQSTM1/p62 en esos tiempos (Flores-Yañez, 2017).



**Figura 7. El NMDA promueve la autofagia en el estriado de rata a las 24h.** Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis por Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 1 control y 6 NMDA. Control n=6, NMDA n=6. Student's T-test; \* $p < 0.05$  vs. Control.

Se investigó si hay autofagia y flujo autofágico activo a través de la medición de la forma lipidada de LC3 (LC3-II) y la valoración de los niveles de SQSTM1/p62 en estriado y corteza. Como era de esperarse se observó un incremento significativo en los niveles de LC3-II de 3 y 5 veces, en el estriado (\* $p=0.0316$ ) y la corteza (\* $p=0.0468$ ) respectivamente, comparados con el control (*Figura 7A y 8A*), sin embargo, la variabilidad en estos primeros experimentos fue muy alta como lo muestra desviación estándar (SD) en las gráficas.

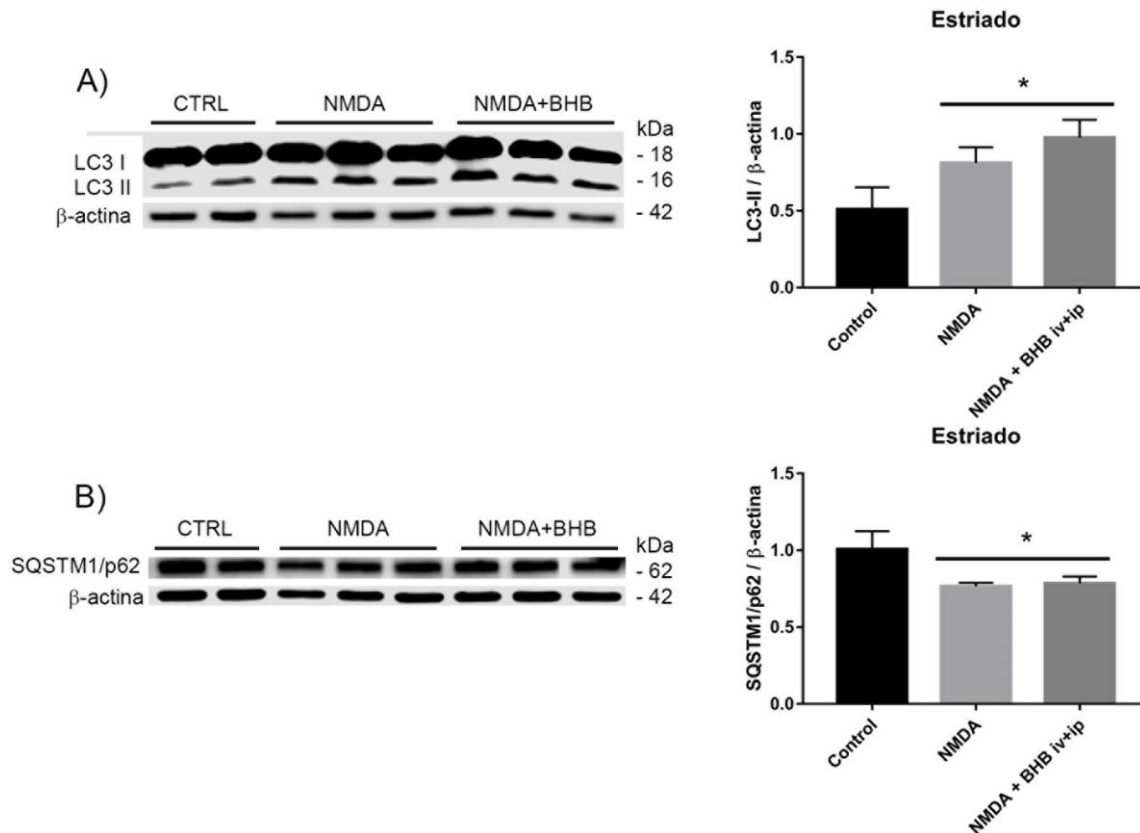
Asimismo, los niveles de SQSTM1/p62 únicamente se redujeron en la región del estriado en un 41.54% (*Figura 7B*) con una significancia de  $p<0.0042$ , sugiriendo que en esta región está activo el flujo autofágico, mientras que en la corteza no existen cambios con respecto al control (*Figura 8B*), apuntando que en esta área el flujo autofágico no está activo.



*Figura 8. El NMDA promueve una autofagia aberrante en la corteza de rata a las 24h.* Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis por Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 1 control y 6 NMDA. Control n=6, NMDA n=6. Student's T-test; \* $p<0.05$  vs. Control.

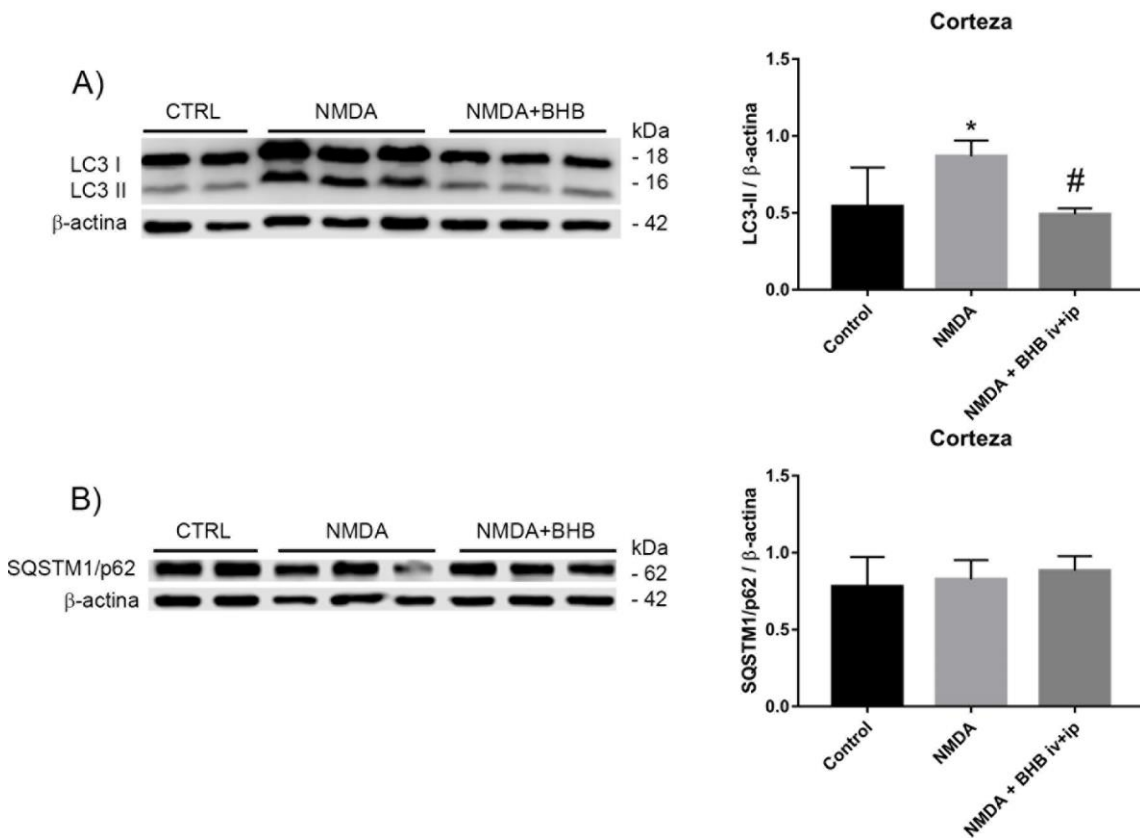
## 7.2 Efecto de la administración sistémica de D-BHB sobre los marcadores de autofagia después de la administración de NMDA.

A continuación se procedió a evaluar el efecto de la administración sistémica (i.v+i.p) de D-BHB sobre la autofagia inducida por la administración de NMDA. Se observó que en el estriado los niveles de LC3-II se elevaron de manera similar en las ratas tratadas y no tratadas con D-BHB, mientras que el contenido de SQSTM1/p62 se mantuvo al nivel del control (*Figura 9*). En estas condiciones de experimentación fue posible reducir la variabilidad, ya que se redujo en lo posible el número de animales ocupados en el grupo con el tratamiento (n=3) y los datos obtenidos de la cuantificación de la densidad óptica fueron muy parecidos entre sí. Estos resultados sugieren que el D-BHB administrado sistémicamente no tiene efecto o no es suficiente para alterar la autofagia bajo estas condiciones.



*Figura 9. La administración sistémica del D-BHB no afecta la autofagia inducida por NMDA en el estriado.* Los homogenizados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis con Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 2 controles, 3 NMDA y 3 NMDA+BHB. Control n=6, NMDA n=6, NMDA+BHB-iv-ip n=3. Dosis de D-BHB: 250 mg/kg (i.v e i.p). ANOVA post-hoc de Fisher's; \*p < 0.05 vs. Control.

En la corteza cerebral se observó una disminución del 32.66% en LC3-II del grupo con D-BHB con respecto al grupo NMDA (\* $p=0.0368$ ), pero no se observaron cambios en los niveles de SQSTM1/p62 en los animales tratados, por lo que el D-BHB administrado de ésta manera, sólo pudo disminuir la acumulación de autofagosomas, pero éste cambio no se debió a la estimulación del flujo autofágico en la corteza, la cual se encuentra en la periferia del estriado (*Figura 10*).

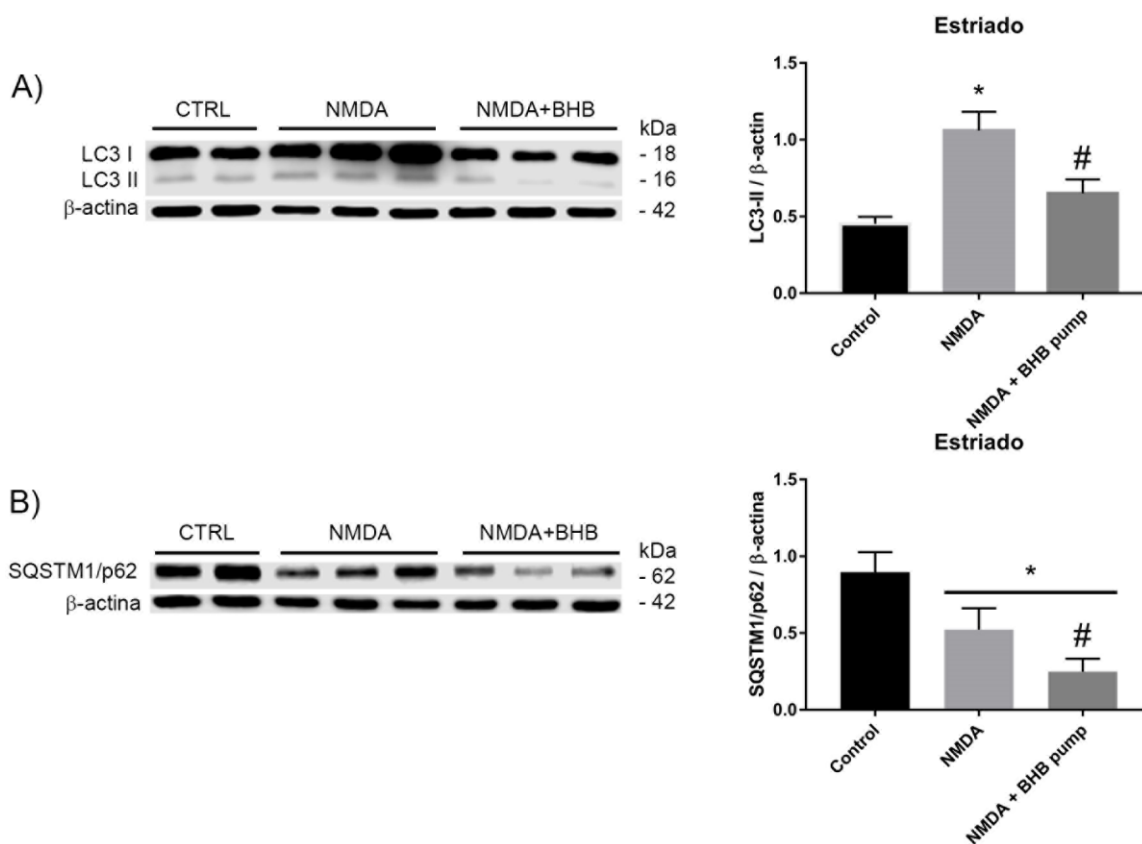


**Figura 10. La administración sistémica del D-BHB disminuye la acumulación de autofagosomas inducida por NMDA en la corteza.** Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis con Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 2 controles, 3 NMDA y 3 NMDA+BHB. Control  $n=6$ , NMDA  $n=6$ , NMDA+BHB-iv-ip  $n=3$ . Dosis de D-BHB: 250 mg/kg (i.v e i.p). ANOVA post-hoc de Fisher's; \* $p<0.05$  vs. Control, # $p<0.05$  vs NMDA.

### 7.3 Efecto de la infusión continua de D-BHB sobre los marcadores de autofagia después de la inyección de NMDA

Dado que no se observó un efecto del D-BHB sobre el flujo autofágico cuando se administró siguiendo el protocolo de los experimentos anteriores (*Figura 9 y 10*), se diseñó otro protocolo en el cual se implantó una mini bomba osmótica para realizar una infusión epidural continua sobre la dura y garantizar que el cuerpo cetónico llegara de manera constante al área de la lesión.

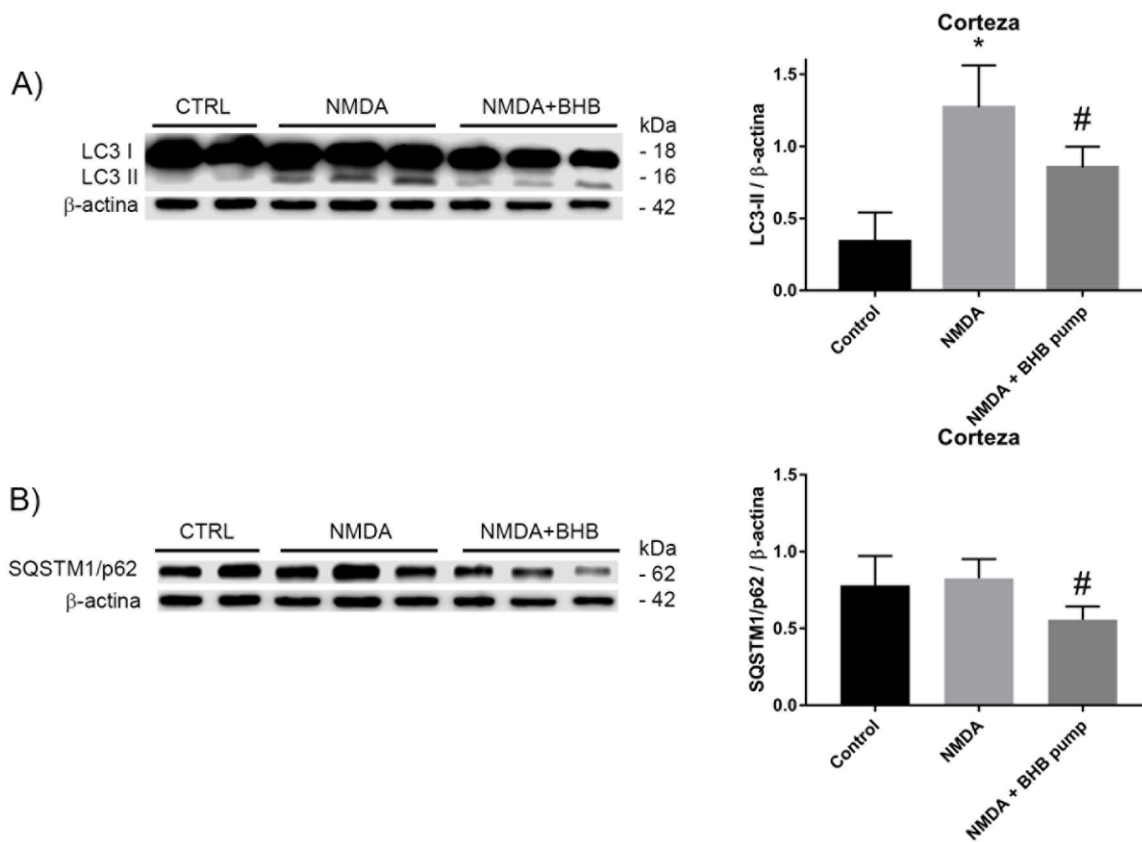
Esta administración continua promovió una disminución en la acumulación de autofagosomas, ya que redujo significativamente el contenido de LC3-II tanto en el estriado (38.62%, \* $p=0.0007$ ) como en la corteza (32.76%, \* $p=0.0371$ ) y además estos datos también presentaron poca variabilidad, ocupando una  $n=3$  para el grupo con el tratamiento (*Figura 11A y 12A*).



**Figura 11. La infusión epidural por 24 h de D-BHB promueve el flujo autofágico en el estriado.** Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis con Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 2 controles, 3 NMDA y 3 NMDA+BHB. Control  $n=6$ , NMDA  $n=6$ , NMDA+BHB-iv-ip  $n=3$ . Dosis de D-BHB: 250 mg/kg (i.v e i.p). ANOVA post-hoc de Fisher's; \* $p<0.05$  vs. Control, # $p<0.05$  vs NMDA.

El contenido de SQSTM1/p62 disminuyó en un 52.55% en el estriado del grupo de NMDA que recibió el tratamiento con D-BHB (\* $p=0.0319$ ), sugiriendo que en esta región se estimula el flujo autofágico en presencia de este sustrato energético (Figura 11B). En la corteza, SQSTM1/p62 también disminuyó significativamente en el grupo con la bomba con respecto al grupo NMDA en un 32.66% y con una significancia de \* $p=0.307$ , sugiriendo que en esta región el flujo autofágico que se encontraba bloqueado después de la administración de NMDA se estimula con el tratamiento de D-BHB (Figura 12B).

En su conjunto los resultados sugieren que después de la administración de NMDA, se estimula la autofagia y se mantiene el flujo autofágico en el estriado, mientras que en la corteza se acumulan los autofagosomas debido al bloqueo del flujo autofágico. En ambas regiones la infusión continua con D-BHB promueve el mantenimiento de un flujo autofágico activo.

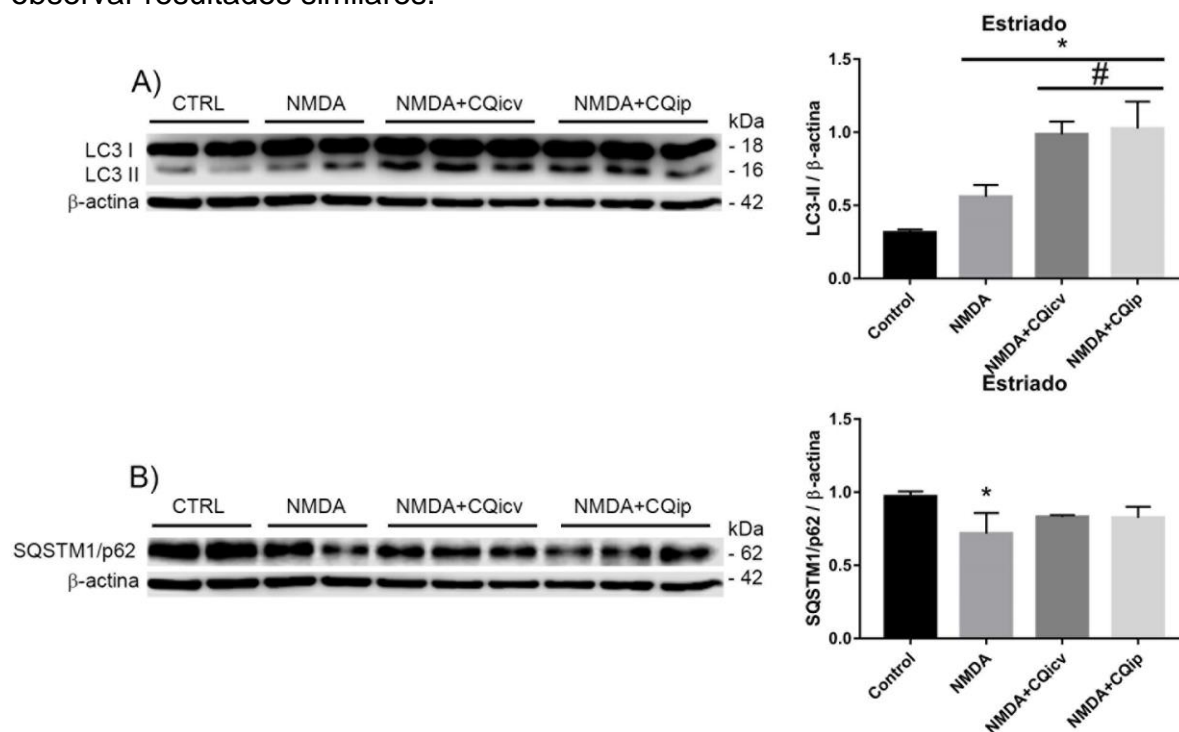


**Figura 12. La infusión epidural por 24 h de D-BHB promueve el flujo autofágico en la corteza.** Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis con Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 2 controles, 3 NMDA y 3 NMDA+BHB. Control  $n=6$ , NMDA  $n=6$ , NMDA+BHB-iv-ip  $n=3$ . Dosis de D-BHB: 250 mg/kg (i.v e i.p). ANOVA post-hoc de Fisher's; \* $p<0.05$  vs. Control, # $p<0.05$  vs NMDA.

## 7.4 Efecto de la cloroquina pre-NMDA en los marcadores de autofagia

Para comprobar que el efecto del D-BHB está relacionado con la estimulación del flujo autofágico, se buscó un protocolo que permitiera bloquear el flujo autofágico a través de la administración de CQ. Al añadir la CQ, se esperaba que hubiera una acumulación de autofagosomas, ya que estos no se pueden fusionar con los lisosomas para formar el autofagolisosoma, por lo que los niveles de SQSTM1/p62 se elevarían. Sin embargo, no se conocía la dosis i.c.v con la cual habría un efecto sobre los marcadores de autofagia en estudios *in vivo*.

En primer lugar se ocupó una dosis de 25 mg/kg administrada por vía i.c.v como fue ocupada en Viscomi *et al.*, 2012 para bloquear al flujo autofágico, lo cual mató a la rata, por consiguiente se utilizaron dosis más bajas de 0.61, 1.22, 2.44 mg/kg. Después de varios experimentos piloto se eligió el protocolo que elevara LC3-II con la dosis de 1.22 mg/kg (CQ-icv), así como otro protocolo de administración i.p de CQ durante varios días, que consistió en 1 administración diaria por 4 días por vía intraperitoneal (CQ-ip), ya que es una vía menos invasiva y se esperaba observar resultados similares.

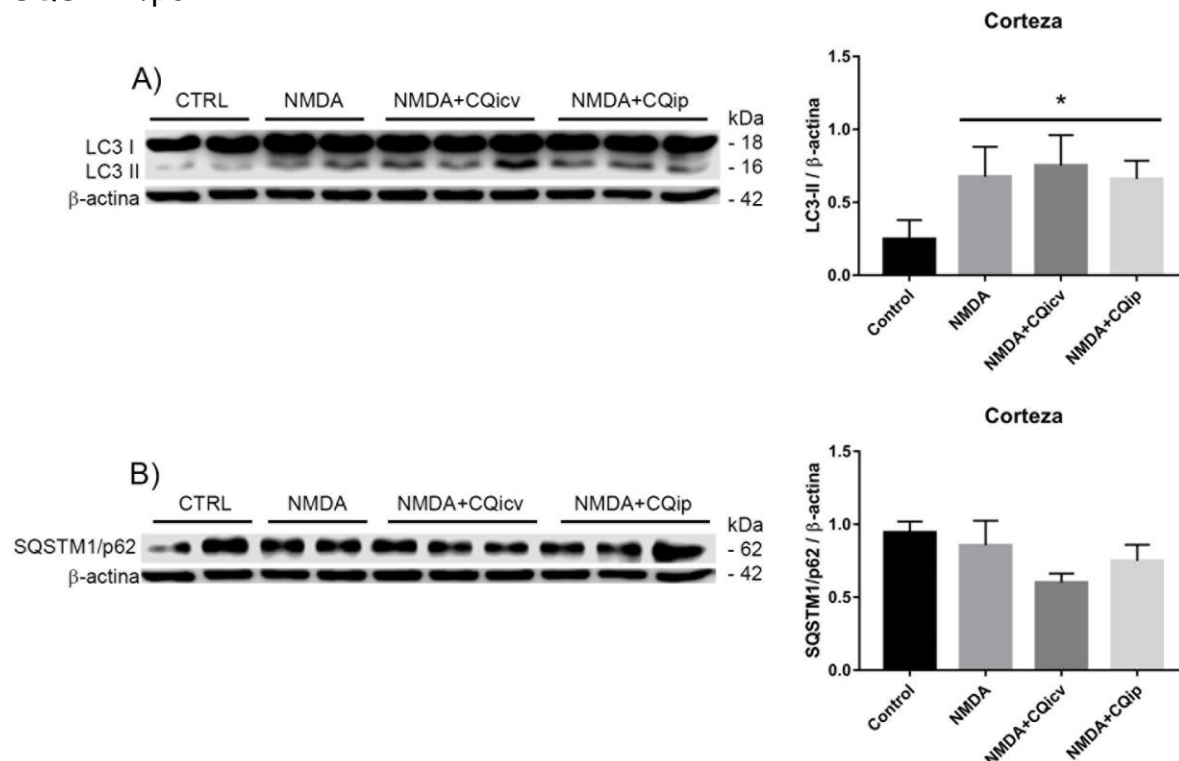


**Figura 13. La cloroquina bloquea el flujo autofágico en el estriado.** Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis con Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 2 controles, 3 NMDA y 3 NMDA+BHB. Control n=6, NMDA n=6, NMDA+BHB-iv-ip n=3. Dosis de D-BHB: 250 mg/kg (i.v e i.p). ANOVA post-hoc de Fisher's; \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  vs NMDA.

Al comparar las dos vías de administración de la CQ, se observa que en el estriado, los dos protocolos (i.c.v e i.p) inducen un aumento en la transformación de LC3-I a LC3-II sugiriendo que se exagera la acumulación de autofagosomas con respecto al grupo NMDA, y que en esta región hay un flujo autofágico activo, ya que la CQ lo bloqueó (*Figura 13A*). Sin embargo, no se observó un aumento en los niveles de SQSTM1/p62 en presencia de CQ y tampoco se observó la disminución significativa de este marcador como ocurre en las ratas tratadas únicamente con NMDA, sugiriendo que el flujo autofágico se interrumpió por la CQ (*Figura 13B*).

En la corteza la administración de CQ no resultó en un aumento en LC3-II ni en SQSTM1/p62, sugiriendo que en esta región el flujo autofágico estaba interrumpido desde la inyección de NMDA y no pudo haber mayor acumulación de estas proteínas con el tratamiento de CQ (*Figura 14*).

Para conocer si el efecto del D-BHB se debe a una estimulación del flujo autofágico, es necesario someter a los animales tratados con D-BHB al tratamiento con CQ para investigar si se revierten sus efectos sobre LC3-II y de SQSTM1/p62.



*Figura 14. La cloroquina no afecta la autofagia inducida por NMDA en la corteza.* Los homogenados fueron extraídos 24 h después de la inyección de NMDA y fueron preparados para su análisis con Western blot. A) Expresión de LC3-II normalizado con  $\beta$ -actina. B) Expresión de SQSTM1/p62 normalizado con  $\beta$ -actina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD. Se muestra un blot representativo de cada análisis cuantitativo con 2 controles, 3 NMDA y 3 NMDA+BHB. Control n=6, NMDA n=6, NMDA+BHB-iv-ip n=3. Dosis de D-BHB: 250 mg/kg (i.v e i.p). ANOVA post-hoc de Fisher's; \* $p < 0.05$  vs. Control.





## 8 DISCUSIÓN

El papel de la autofagia como mecanismo de sobrevivencia en condiciones de limitación de nutrientes y en otras condiciones como el cáncer, está bien documentado (Das *et al.*, 2018). Muchos estudios han demostrado que la autofagia se activa por la lesión excitotóxica (*Tabla 2*) y los resultados de esta tesis son concordantes con estas observaciones.

Se ha sugerido que en condiciones excitotóxicas se echa a andar la maquinaria autofágica como una respuesta al estrés, inicialmente para intentar proteger a la célula, sin embargo, la mayoría de los trabajos sugieren que bajo estas circunstancias, la autofagia contribuye a la muerte ya sea porque es excesiva (*Tabla 3*) o porque no ocurre de manera adecuada (*Tabla 4*).

Es por eso que este proceso debe de estar finamente regulado, ya que si se estimula descontroladamente, degradaría componentes importantes de la célula y provocaría la muerte. Sin embargo, esta hipótesis es aún controversial ya que existe la posibilidad de que este proceso tan complejo quede simplemente como espectador (Liu y Levine, 2014) o en el intento de rescatar a la célula de algún tipo de muerte que ocurra de modo paralelo, como la apoptosis (Chang *et al.*, 2012).

De manera general, se ha visto en estudios *in vitro* de cultivos corticales, que los niveles de LC3-II aumentan en presencia de Glu (Pereira *et al.*, 2017). En concordancia con estos resultados, los niveles de LC3-II también aumentan en presencia de NMDA (Perez-Carrion y Cena, 2013). Posiblemente en el modelo de excitotoxicidad del presente trabajo, la autofagia este contribuyendo a la muerte, como han sugerido diversos trabajos citados en la *Tabla 3*, en los que utilizando un inhibidor de la autofagia (3-MA) o la inhibición de genes relacionados a la autofagia, se incrementa la viabilidad y se evita el incremento de LC3-II en diferentes modelos de excitotoxicidad.

En esta tesis se observó una disminución en SQSTM1/p62 en el estriado tal y como se observó en cultivos estriatales de neuronas expuestas a KA (Dong *et al.*, 2012) sugiriendo que hay flujo autofágico en esta región, mientras que los resultados sugieren que en la corteza el flujo autofágico no está activo por que el aumento de LC3-II no está acompañado de la disminución de SQSTM1/p62. Para confirmar que la dinámica de la autofagia es diferente en estas dos regiones y demostrar que efectivamente está bloqueado el flujo autofágico en la corteza pero no en el estriado, se utilizó la CQ, la cual es un inhibidor de la etapa de degradación de la autofagia, que acidifica a los lisosomas impidiendo la acción de sus enzimas de degradación y con esto bloquea el flujo.



Se probaron 2 protocolos diferentes para tratar de bloquear el flujo con la administración de CQ. Al comparar la inyección i.c.v con el pre-tratamiento crónico (*Figura 9*), se observó con ambos tratamientos un aumento en LC3-II sugiriendo el bloqueo del flujo autofágico. Aunque no fue posible observar un aumento en los niveles de SQSTM1/p62, y éstos permanecieron al nivel control. Sin embargo, en las ratas tratadas con NMDA sin CQ sí se observó una disminución significativa en SQSTM1/p62, apoyando que en esta región hay un flujo autofágico activo.

El que los niveles de SQSTM1/p62 no hayan aumentado en presencia de CQ podría deberse a la estimulación de la degradación proteosomal y esto podría ser resuelto con inhibidores proteosomales. Ya que se ha sugerido que los proteosomas se activan con la inhibición farmacológica de la autofagia y con el silenciamiento de los genes relacionados con la autofagia bajo deficiencia de nutrientes en células de cáncer (Wang *et al.*, 2013). Otra causa podría ser que exista un constante recambio de esta proteína, es decir, que se esté sintetizando (Ichimura *et al.*, 2008) o regulando positivamente su expresión. En el caso de la corteza, la administración de CQ no tuvo efecto sobre LC3-II o SQSTM1/p62, sugiriendo que el flujo autofágico está interrumpido en ésta región y no puede bloquearse más por la CQ (*Figura 9B*).

El bloqueo del flujo autofágico en la corteza y no en el estriado llama la atención, ya que la corteza se localiza en la periferia de la lesión, en donde se espera menor efecto del NMDA, mientras que el estriado es el foco de la lesión. Por lo que el NMDA podría estar exacerbando la autofagia únicamente en el estriado y posiblemente a las 24 h que se realizó la medición, el flujo en la corteza sea más lento, por estar más alejada del área de la lesión y por esta razón se encuentra aparentemente bloqueado el flujo en la corteza a este tiempo. Es posible también que la autofagia exacerbada en el estriado esté contribuyendo al daño, lo cual se podría comprobar inhibiendo farmacológicamente la autofagia con 3-MA y evaluar con una tinción de violeta de cresilo si el daño se revierte (Wang *et al.*, 2009).

Por otra parte, la autofagia podría estar teniendo lugar en las células que sobreviven a la lesión, ya sea neuronas o astrocitos. Con el fin de entender mejor en donde es que está ocurriendo la autofagia, es necesario un estudio inmunohistoquímico de los marcadores de autofagia en la corteza y especialmente en el estriado, para explicar si la disminución de los niveles de SQSTM1/p62 (*Figura 6*) se debe a que aún hay flujo autofágico en las células que sobreviven al daño. Éste estudio también ayudaría a conocer si la autofagia está ocurriendo en astrocitos o en neuronas en la región lesionada, utilizando proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o núcleos neuronales (NeuN), respectivamente.



Las neuronas resultan ser más vulnerables que los astrocitos a diferentes tipos de estrés, por ello necesitan tener un robusto control de calidad de sus proteínas, para eliminar componentes dañados se forman autofagosomas en el axón y son transportados hasta el soma para que se fusionen con los lisosomas y lleven a cabo la degradación. Se ha demostrado que en condiciones de ausencia de oxígeno y glucosa, los astrocitos mejoran la viabilidad de neuronas y que promover el flujo autofágico puede tener un papel protector (Liu *et al.*, 2018), como se sugiere que el D-BHB lo está haciendo en la excitotoxicidad.

Los marcadores de la autofagia pueden incrementarse por dos razones, por la inducción de la autofagia o bien por la inhibición de la etapa de degradación. La gran mayoría de los trabajos apoyan la idea que la autofagia exacerbada contribuye a la muerte, porque se encuentran altos los niveles de lipidación de LC3-II (como ocurre en este estudio) o porque mediante inmunohistoquímica se observan células con una mayor inmunoreactividad a LC3 o la presencia de punta de LC3.

Sin embargo, otros estudios sugieren que el flujo autofágico puede estar bloqueado en su etapa de degradación, utilizando MDC para marcar autofagolisosomas o microscopía electrónica para observar la acumulación de vesículas autofágicas en tiempos tardíos, sin embargo, estas observaciones deben estar complementadas con ensayos de inmunoblot para observar la acumulación de SQSTM1/p62, y en muchos de los estudios no se ha utilizado ésta herramienta, por lo que no pueden confirmar el bloqueo del flujo autofágico.

El bloqueo del flujo autofágico puede deberse al daño lisosomal, como ocurre en un modelo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en donde se vio un aumento en los marcadores de lisosomas en las primeras 6 h a la par de LC3-II y en tiempos posteriores hubo una disminución de lisosomas, coincidiendo con el bloqueo del flujo, observado con la CQ (Liu *et al.*, 2019).

Más aún el aumento en la expresión factor de transcripción EB (TFEB) que induce la biogénesis lisosomal, restaura el flujo autofágico y previene el daño isquémico. En concordancia con esto, un estudio reciente de nuestro grupo demostramos que en condiciones de privación y reintroducción de glucosa, condición que induce daño excitotóxico, el flujo autofágico se bloquea debido al daño lisosomal (Gerónimo-Olvera *et al.* 2017).



Al inhibir la autofagia (como se realizó en los estudios anteriores) se disminuye la muerte celular, ya que la autofagia no debe de ser excesiva y de manera interesante también se observa sobrevivencia al promover la autofagia, ya que su función inicial es la de recuperar la proteostasis. Este último efecto se demostró en neuronas hipocampales en donde la exposición a Glu disminuyó la sobrevivencia celular y ésta se recuperó cuando se estimuló la autofagia con RAP. Además en presencia de Glu se estimuló la lipidación de LC3 y aumentaron los niveles de SQSTM1/p62, lo que sugiere que en estas condiciones el flujo autofágico está bloqueado, lo cual podría estar provocando la muerte, sin embargo, no realizaron el experimento para demostrar que la RAP podría desbloquear el flujo (Kulbe *et al.*, 2014).

Los resultados de esta tesis sugieren la estimulación del flujo autofágico por el D-BHB en el modelo *in vivo* de excitotoxicidad inducida por NMDA. Al administrar D-BHB de manera directa y constante mediante la mini bomba osmótica, permitió ver efectos más claros que en la administración sistémica. En la corteza y el estriado el D-BHB mantuvo los autofagosomas a nivel del control a diferencia de la administración i.v + i.p, donde sólo se observó disminución de LC3-II en la corteza, que es la región en donde puede haber más células viables y que la administración sistémica de D-BHB apenas fue suficiente para disminuir la acumulación de autofagosomas, pero no mejoró la degradación. Por otra parte, con la infusión continua de D-BHB, se promovió la degradación de SQSTM1/p62 en la corteza y el estriado, por lo que estos resultados sugieren que es necesario el continuo suministro del cuerpo cetónico para observar un efecto sobre la autofagia.

Éste estudio no descarta que el D-BHB pueda disminuir la iniciación de la autofagia. La autofagia puede inducirse por la activación de la AMPK, la cual se estimula en la ausencia de nutrientes o durante el estrés energético debido al aumento en los niveles de AMP. La excitotoxicidad también induce un déficit energético ya que se produce daño mitocondrial y se requiere energía para la repolarización de la membrana y la extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma de las neuronas que es introducido por la activación de los receptores NMDA (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013).

En este modelo, una inyección de NMDA en el estriado puede estresar energéticamente esta zona, por lo que los niveles de AMP pueden incrementarse y esto posiblemente pueda activar a la AMPK, que censa los niveles de AMP/ATP inhibiendo con esto la vía de mTOR (Li y Wei-Li, 2014). En estas condiciones se ha descrito que AMPK fosforila al complejo mTOR, este se disocia de ULK-1, el cual fosforila a PI3KC3 y con esto se da lugar a la iniciación de la autofagia.



Es posible que en presencia del D-BHB los niveles de AMP disminuyan al estimularse el metabolismo mitocondrial y restablecer los niveles de ATP, lo que inhibiría la iniciación de la autofagia por la vía de AMPK-mTOR-ULK1 (Kim *et al.*, 2011). Para comprobar esta hipótesis es necesario analizar las proteínas activadas por fosforilación que participan en la vía de mTOR y en la iniciación de la autofagia (Kim *et al.*, 2009). Por lo tanto el D-BHB podría estar actuando tanto en la etapa de iniciación como en la de degradación autofágica y por estos dos mecanismos contribuir a la disminución de la acumulación de autofagosomas.

Por otra parte, el D-BHB a través de su acción inhibitoria de las HDACs de clase I, podría estimular la autofagia al inducir la transcripción de *FOXO3A*, su translocación al núcleo y la inducción de genes que participan en el proceso autofágico, incluyendo la fase de iniciación y de degradación (Sun *et al.*, 2018). Éste último mecanismo, podría desatorar el flujo y evitar la acumulación de autofagosomas. Pero esta posibilidad es poco probable porque si estimularan genes de autofagia veríamos más LC3-II y al contrario ésta disminuye mucho con el D-BHB. Tal vez esto podría ocurrir en la corteza donde LC3-II permanece un poco más arriba que el control en las ratas tratadas con D-BHB.

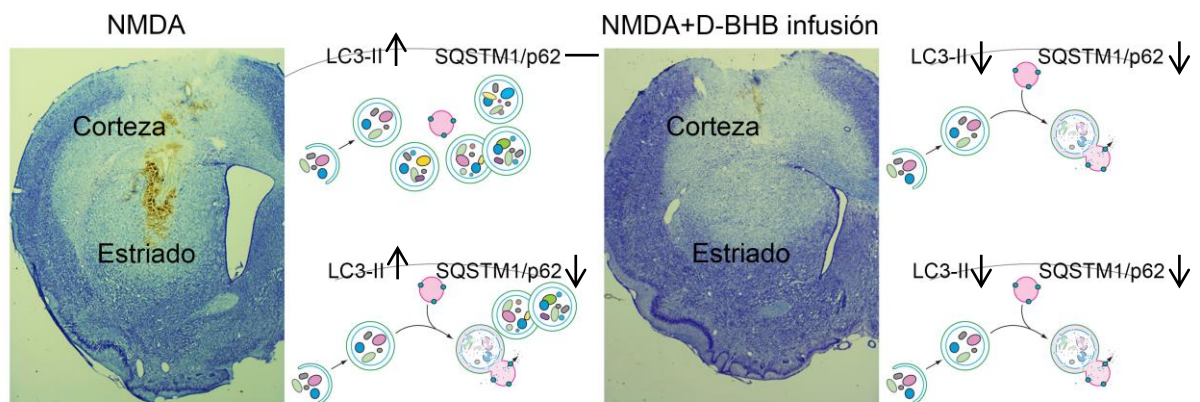
Asimismo, para confirmar que el D-BHB está promoviendo la degradación autofágica, es necesario revertir sus efectos con la administración de CQ. Alternativamente, el D-BHB podría estar atenuando la activación de la autofagia posiblemente debido a que mantiene a las células en un estado energético más competente. En estudios previos hemos observado que el D-BHB reduce las lesiones inducidas por Glu, lo que se asocia a una reducción en la peroxidación de lípidos (Mejia-Toiber *et al.*, 2006). Este estudio sugiere que la modulación de la autofagia también puede participar en el efecto protector del D-BHB en contra del daño excitotóxico inducido *in vivo*.

La activación de la calpaína causa permeabilización y rompimiento lisosomal bajo condiciones de privación con reintroducción de glucosa. Dado que esta proteína es una proteasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , es posible que en nuestras condiciones una mejor homeostasis de  $Ca^{2+}$  sea promovida por el D-BHB, al mantener a las células en un mejor estado energético y entonces reducir la actividad de calpaína, evitando con ello el rompimiento de los lisosomas, que están directamente involucrados en la etapa de degradación de la autofagia (Geronimo-Olvera *et al.*, 2017). Por otra parte también se ha observado que las sirtuinas, las cuales son HDACs de clase III dependientes de  $NAD^+$ , pueden ser indirectamente activadas por los cuerpos cetónicos, debido al incremento del cociente  $NAD^+/NADH$  en la mitocondria. La desacetilación del factor de transcripción TFEB por las sirtuinas podría promover la biogénesis lisosomal y éste es otro posible mecanismo con el que también se podría mejorar la degradación autofágica (Newman y Verdin, 2017).

El D-BHB también puede incrementar la eficiencia de los lisosomas, ya que en la membrana de estas vesículas se encuentran las V-ATPasas que son bombas que introducen protones al interior de los lisosomas, porque estos trabajan bajo condiciones ácidas y con esto permitiría una mejor degradación (Colacurcio y Nixon, 2016), para lo cual se tendría que analizar si el D-BHB está teniendo un efecto como sustrato energético sobre estas ATPasas, ya que se incrementan los niveles de ATP. También se podría investigar en qué medida el efecto del D-BHB se debe a su acción metabólica al comparar su acción con la del enantiomero L-BHB que no se metaboliza en la célula.

## 9 CONCLUSIONES

La administración intraestriatal de NMDA induce la acumulación de autofagosomas y permite mantener activo el flujo autofágico en el estriado. Mientras que en la corteza el flujo aún permanece bloqueado a las 24 h, debido a que está en la periferia del estriado. La administración sistémica de D-BHB no es suficiente para promover el flujo autofágico en ninguna de las regiones cerebrales después de la administración de NMDA. Sin embargo, una infusión epidural continua de D-BHB durante 24 h reduce la acumulación de autofagosomas en ambas regiones al estimular el flujo autofágico después de la administración de NMDA, pudiendo ser éste uno de los mecanismos a través de los cuales ejerce su efecto protector del daño (*Figura 15*).



*Figura 15. Conclusión. Una infusión continua de D-BHB durante 24 h reduce la acumulación de autofagosomas y aumenta la degradación autofágica tanto en el estriado como en la corteza y esto puede estar asociado a la protección de los cuerpos cetónicos.*



## 10 PERSPECTIVAS

- ❖ Demostrar que el efecto del D-BHB es sobre el flujo autofágico a través de la administración de la CQ en combinación con D-BHB.
- ❖ Definir si la muerte en el estriado es por una excesiva autofagia, utilizando un inhibidor de la misma (3-MA).
- ❖ Realizar un análisis histológico (violeta de cresilo y fluorojade-B) para determinar el efecto protector del D-BHB después de ser administrado por la mini bomba osmótica.
- ❖ Demostrar que el efecto protector del D-BHB sea abatido por la CQ.
- ❖ Realizar un análisis inmunohistoquímico que nos permita ver la acumulación de LC3-II y SQSTM1/p62 en el tejido, con marcadores de astrocitos y neuronas.

## 11 REFERENCIAS

Benarroch EE (2011) NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology* 76: 1750-7

Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T (2009) Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. En el libro *Autophagy in Mammalian Systems, Part B*, pp 181-197.

Borsello T, Croquelois K, Hornung JP, Clarke PG (2003) N-methyl-d-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur J Neurosci* 18: 473-85

Braidy N, Brew BJ, Inestrosa NC, Chung R, Sachdev P, Guillemin GJ (2014) Changes in Cathepsin D and Beclin-1 mRNA and protein expression by the excitotoxin quinolinic acid in human astrocytes and neurons. *Metab Brain Dis* 29: 873-83

Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E (2014) Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 71: 2787-814

Buchhalter JR, D'Alfonso S, Connolly M, Fung E, Michoulas A, Sinasac D, Singer R, Smith J, Singh N, Rho JM (2017) The relationship between d-beta-hydroxybutyrate blood concentrations and seizure control in children treated with the ketogenic diet for medically intractable epilepsy. *Epilepsia Open* 2: 317-321



- Caldero J, Tarabal O, Casanovas A, Ciutat D, Casas C, Llado J, Esquerda JE (2007) Excitotoxic motoneuron disease in chick embryo evolves with autophagic neurodegeneration and deregulation of neuromuscular innervation. *J Neurosci Res* 85: 2726-40
- Camacho A, Massieu L (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37: 11-8
- Camberos-Luna L, Geronimo-Olvera C, Montiel T, Rincon-Heredia R, Massieu L (2016) The Ketone Body, beta-Hydroxybutyrate Stimulates the Autophagic Flux and Prevents Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cortical Cultured Neurons. *Neurochem Res* 41: 600-9
- Cavara NA, Orth A, Hollmann M (2009) Effects of NR1 splicing on NR1/NR3B-type excitatory glycine receptors. *BMC Neurosci* 10: 32
- Chang CF, Huang HJ, Lee HC, Hung KC, Wu RT, Lin AM (2012) Melatonin attenuates kainic acid-induced neurotoxicity in mouse hippocampus via inhibition of autophagy and alpha-synuclein aggregation. *J Pineal Res* 52: 312-21
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415: 793-8
- Colacurcio DJ, Nixon RA (2016) Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing research reviews* 32: 75-88
- Cummings KA, Popescu GK (2016) Protons Potentiate GluN1/GluN3A Currents by Attenuating Their Desensitisation. *Sci Rep* 6: 23344
- D'Orsi B, Bonner H, Tuffy LP, Dussmann H, Woods I, Courtney MJ, Ward MW, Prehn JH (2012) Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *J Neurosci* 32: 1847-58
- Das CK, Mandal M, Kogel D (2018) Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* 37: 749-766
- de la Cadena SG, Hernandez-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, Massieu L (2014) Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* 19: 414-27
- Descloux C, Ginet V, Rummel C, Truttmann AC, Puyal J (2018) Enhanced autophagy contributes to excitotoxic lesions in a rat model of preterm brain injury. *Cell Death Dis* 9: 853





Divito CB, Underhill SM (2014) Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int* 73: 172-80

Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30: 379-87

Dong XX, Wang YR, Qin S, Liang ZQ, Liu BH, Qin ZH, Wang Y (2012) p53 mediates autophagy activation and mitochondria dysfunction in kainic acid-induced excitotoxicity in primary striatal neurons. *Neuroscience* 207: 52-64

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331: 456-61

Estrada Sanchez AM, Mejia-Toiber J, Massieu L (2008) Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res* 39: 265-76

Flores-Yañez S (2017) Efecto protector del D-β-Hidroxibutirato en contra de la muerte neuronal excitotóxica y su relación con la Autofagia. Tesis de Licenciatura del Departamento de Neuropatología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, pp 83

Fulceri F, Ferrucci M, Lazzeri G, Paparelli S, Bartalucci A, Tamburini I, Paparelli A, Fornai F (2011) Autophagy activation in glutamate-induced motor neuron loss. *Arch Ital Biol* 149: 101-11

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Blomgren K, Kroemer G (2016) Autophagy in acute brain injury. *Nat Rev Neurosci* 17: 467-84

Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI (2005) Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 115: 496-506

Geronimo-Olvera C, Montiel T, Rincon-Heredia R, Castro-Obregon S, Massieu L (2017) Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis* 8: e2911

Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 221: 3-12

Haces ML, Hernandez-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211: 85-96



Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4: 261-7

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5: 405-14

Hassel B, Dingledine R (2012) Glutamate and Glutamate Receptors. En el libro *Basic Neurochemistry*, Elsevier (ed) pp 342-366.

Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M (2008) Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. *Autophagy* 4: 1063-6

Jing K, Lim K (2012) Why is autophagy important in human diseases? *Experimental & molecular medicine* 44: 69-72

Julio-Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, Geronimo-Olvera C, Massieu L (2015) Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by beta-hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab* 35: 851-60

Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL (2000) D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5440-4

Katsumata K, Nishiyama J, Inoue T, Mizushima N, Takeda J, Yuzaki M (2014) Dynein- and activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. *Autophagy* 6: 378-385

Kim CH, Lee J, Lee JY, Roche KW (2008) Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J Neurosci Res* 86: 1-10

Kim H, Choi J, Ryu J, Park SG, Cho S, Park BC, Lee DH (2009) Activation of autophagy during glutamate-induced HT22 cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 339-44

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

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H *et al.* (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: 1-222

Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-21



Koch K, Berressem D, Konietzka J, Thinnes A, Eckert GP, Klein J (2017) Hepatic Ketogenesis Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *J Am Heart Assoc* 6: e005556

Koga M, Serritella AV, Messmer MM, Hayashi-Takagi A, Hester LD, Snyder SH, Sawa A, Sedlak TW (2011) Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 596-602

Kulbe JR, Mulcahy Levy JM, Coultrap SJ, Thorburn A, Bayer KU (2014) Excitotoxic glutamate insults block autophagic flux in hippocampal neurons. *Brain Res* 1542: 12-9

Kumari S, Mehta SL, Li PA (2012) Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. *PLoS One* 7: e39382

Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115: 157-88

Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, Fisher CC, Zhang M, Saucerman JJ, Goodyear LJ, Kundu M, Yan Z (2017) Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat Commun* 8: 548

Lamichhane S, Bastola T, Pariyar R, Lee ES, Lee HS, Lee DH, Seo J (2017) ROS Production and ERK Activity Are Involved in the Effects of d- $\beta$ -Hydroxybutyrate and Metformin in a Glucose Deficient Condition. *Int J Mol Sci* 18: 674

Laplanche M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293

Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460: 525-42

Leke R, Schousboe A (2016) The Glutamine Transporters and Their Role in the Glutamate/GABA-Glutamine Cycle. *Adv Neurobiol* 13: 223-257

Lerma J, Marques JM (2013) Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80: 292-311

Leveille F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22: 4258-71

Li R, Jin Y, Li Q, Sun X, Zhu H, Cui H (2018) MiR-93-5p targeting PTEN regulates the NMDA-induced autophagy of retinal ganglion cells via AKT/mTOR pathway in glaucoma. *Biomed Pharmacother* 100: 1-7



Li W, Wei-Li Z (2014) Inhibition of mTOR Pathway and Induction of Autophagy Block Lymphoma Cell Growth. En el libro *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, pp 309-320.

Liguz-Lecznar M, Skangiel-Kramska J (2007) Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67: 207-18

Lim S, Chesser AS, Grima JC, Rappold PM, Blum D, Przedborski S, Tieu K (2011) D-beta-hydroxybutyrate is protective in mouse models of Huntington's disease. *PLoS One* 6: e24620

Liu X, Tian F, Wang S, Wang F, Xiong L (2018) Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury. *Rejuvenation Res* 21: 405-415

Liu Y, Levine B (2014) Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death And Differentiation* 22: 367

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

Matyja E, Taraszewska A, Naganska E, Rafalowska J (2005) Autophagic degeneration of motor neurons in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. *Ultrastruct Pathol* 29: 331-9

McDonald TJW, Cervenka MC (2018) The Expanding Role of Ketogenic Diets in Adult Neurological Disorders. *Brain sciences* 8: 148

Mehta P, Henault J, Kolbeck R, Sanjuan MA (2014) Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Curr Opin Immunol* 26: 69-75

Mejia-Toiber J, Montiel T, Massieu L (2006) D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochem Res* 31: 1399-408

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101-11

Nassif M, Hetz C (2012) Autophagy impairment: a crossroad between neurodegeneration and tauopathies. *BMC Biology* 10: 78



Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R (2014) Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxidants & redox signaling* 21: 66-85

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3: 748-55

Nelson DL, Cox MM (2017) Ketone Bodies. En el libro *Lehninger: principles of biochemistry*, Company WHFa (ed) pp 666-7. New York : W.H. Freeman  
Seventh edition

Netzahualcoyotzi C, Tapia R (2015) Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity *in vivo* and protection by energy substrates. *Acta Neuropathol Commun* 3: 27

Newman JC, Verdin E (2017) beta-Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annu Rev Nutr* 37: 51-76

Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* 100: 656-64

Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60: 1017-41

Owen OE (2006) Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 33: 246-251

Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7: 39-47

Parathath SR, Gravanis I, Tsirka SE (2007) Nitric oxide synthase isoforms undertake unique roles during excitotoxicity. *Stroke* 38: 1938-45

Pereira GJ, Antonioli M, Hirata H, Ureshino RP, Nascimento AR, Bincoletto C, Vescovo T, Piacentini M, Fimia GM, Smaili SS (2017) Glutamate induces autophagy via the two-pore channels in neural cells. *Oncotarget* 8: 12730-12740

Perez-Carrion MD, Cena V (2013) Knocking down HMGB1 using dendrimer-delivered siRNA unveils its key role in NMDA-induced autophagy in rat cortical neurons. *Pharm Res* 30: 2584-95

Perez-Carrion MD, Perez-Martinez FC, Merino S, Sanchez-Verdu P, Martinez-Hernandez J, Lujan R, Cena V (2012) Dendrimer-mediated siRNA delivery knocks down Beclin 1 and potentiates NMDA-mediated toxicity in rat cortical neurons. *J Neurochem* 120: 259-68



- Rabinowitz JD, White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science* 330: 1344-8
- Rami A, Benz A (2017) Exclusive Activation of Caspase-3 in Mossy Fibers and Altered Dynamics of Autophagy Markers in the Mice Hippocampus upon Status Epilepticus Induced by Kainic Acid. *Molecular Neurobiology* 55: 4492-4503
- Redmann M, Benavides GA, Berryhill TF, Wani WY, Ouyang X, Johnson MS, Ravi S, Barnes S, Darley-Usmar VM, Zhang J (2017) Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol* 11: 73-81
- Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolanos JP (2013) Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochem Int* 62: 750-6
- Sadasivan S, Zhang Z, Lerner SF, Liu MC, Zheng W, Kobeissy FH, Hayes RL, Wang KK (2010) Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is accompanied by autophagy induction and late onset autophagic cell death phenotype. *BMC Neurosci* 11: 21
- Shacka JJ, Lu J, Xie ZL, Uchiyama Y, Roth KA, Zhang J (2007) Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 414: 57-60
- Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Ohkawa N, Inokuchi K (2012) Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci* 32: 10413-22
- Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV, Jr., de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E (2013) Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339: 211-4
- Slotkin W, Nishikura K (2013) Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease. *Genome Med* 5: 105
- Soria FN, Perez-Samartin A, Martin A, Gona KB, Llop J, Szczupak B, Chara JC, Matute C, Domercq M (2014) Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *J Clin Invest* 124: 3645-55
- Sun L, Zhao M, Liu M, Su P, Zhang J, Li Y, Yang X, Wu Z (2018) Suppression of FoxO3a attenuates neurobehavioral deficits after traumatic brain injury through inhibiting neuronal autophagy. *Behav Brain Res* 337: 271-279
- Sun Q, Fan W, Zhong Q (2009) Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy* 5: 713-716



Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A (2002) Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn J Pharmacol* 89: 36-43

Takagi A, Kume S, Maegawa H, Uzu T (2016) Emerging role of mammalian autophagy in ketogenesis to overcome starvation. *Autophagy* 12: 709-10

Tanida I, Ueno, T. & Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy. En el libro *Autophagosome and phagosome* (Press H (ed) pp 77-88. Nuevo Mexico, USA:

Tian J, Cheng J, Zhang J, Ye L, Zhang F, Dong Q, Wang H, Fu F (2014) Protection of pyruvate against glutamate excitotoxicity is mediated by regulating DAPK1 protein complex. *PloS one* 9: e95777-e95777

Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu D-C, Yan S-D, Naini A, Vila M, Jackson-Lewis V, Ramasamy R, Przedborski S (2003) D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation* 112: 892-901

Torregrosa GS, J. B.; Jover-Mengual, T.; Alborch, E. (2014) Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En el libro *Fisiopatología de la isquemia cerebral*, Books MM (ed) Madrid, España. p 208.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62: 435

Trefts E, Williams AS, Wasserman DH (2015) Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135: 203-25

Viscomi MT, D'Amelio M, Cavallucci V, Latini L, Bisicchia E, Nazio F, Fanelli F, Maccarrone M, Moreno S, Cecconi F, Molinari M (2012) Stimulation of autophagy by rapamycin protects neurons from remote degeneration after acute focal brain damage. *Autophagy* 8: 222-35

Wang L, Song LF, Chen XY, Ma YL, Suo JF, Shi JH, Chen GH (2018) MiR-181b inhibits P38/JNK signaling pathway to attenuate autophagy and apoptosis in juvenile rats with kainic acid-induced epilepsy via targeting TLR4. *CNS Neurosci Ther* 00: 1-11

Wang XJ, Yu J, Wong SH, Cheng AS, Chan FK, Ng SS, Cho CH, Sung JJ, Wu WK (2013) A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy* 9: 1500-8



Wang Y, Dong XX, Cao Y, Liang ZQ, Han R, Wu JC, Gu ZL, Qin ZH (2009) p53 induction contributes to excitotoxic neuronal death in rat striatum through apoptotic and autophagic mechanisms. *Eur J Neurosci* 30: 2258-70

Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15: 1382-402

Wu H, Guo P, Li X, Jin Z, Yang X, Wang Y (2018) Hydroxybutyrate promotes the recovery from cerebral infarction by activating Amp-activated protein kinase signaling. *Exp Ther Med* 16: 1195-1202

Xu LX, Tang XJ, Yang YY, Li M, Jin MF, Miao P, Ding X, Wang Y, Li YH, Sun B, Feng X (2018) Neuroprotective effects of autophagy inhibition on hippocampal glutamate receptor subunits after hypoxia-ischemia-induced brain damage in newborn rats. *Neural Regen Res* 12: 417-424

Yang Y, Luo P, Xu H, Dai S, Rao W, Peng C, Ma W, Wang J, Xu H, Zhang L, Zhang S, Fei Z (2017) RNF146 Inhibits Excessive Autophagy by Modulating the Wnt-beta-Catenin Pathway in Glutamate Excitotoxicity Injury. *Front Cell Neurosci* 11: 59

Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 17: 5094-104

Ye ZC, Sontheimer H (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59: 4383-91

Yin WY, Ye Q, Huang HJ, Xia NG, Chen YY, Zhang Y, Qu QM (2016) Salidroside protects cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity by inhibiting autophagy. *Mol Cell Biochem* 419: 53-64

Yuan HX, Russell RC, Guan KL (2013) Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 9: 1983-95

Zhang S, Zhu C, Liu Q, Wei Y, Wang W (2005) Effect of chloroquine on expressions of  $\text{I}\beta$  and  $\text{tnf-}\alpha$  in hippocampus and cerebral cortex of rats with seizures induced by penetylenetetrazole. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005-05

Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Wang H (2015) Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *Neuroscientist* 21: 337-44