



**“Efectos de la administración de una dieta
cetogénica cíclica sobre el proteoma de
sinaptosomas corticales de ratones
envejecidos”**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en
Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Diego Alfredo Acuña Catalán

Director de Tesis: Dr. Christian González-Billault

Marzo, 2023

Índice de contenidos

Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclaturas	xi
Introducción	1
El cerebro experimenta transformaciones anatómicas y fisiológicas asociadas al envejecimiento	1
Cambios morfológicos y estructurales del cerebro contribuyen al declive cognitivo asociado al envejecimiento.....	2
La vía de señalización AMPc/PKA/CREB cumple un papel esencial en la memoria y se encuentra alterada en neuronas corticales envejecidas.....	4
La pérdida de proteostasis neuronal es una de las alteraciones moleculares características del cerebro envejecido.....	6
La KD reprograma el metabolismo energético, reduce mortalidad en etapas intermedias de vida y preserva la memoria en animales envejecidos.	8
Hipótesis	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos.....	13
Materiales y métodos.....	14

Manejo y mantención de animales	14
Dietas y alimento utilizado	14
Reactivos, soluciones, materiales y equipos utilizados	16
Reactivos.....	16
Soluciones	17
Materiales y equipos.....	18
Métodos	19
Preparación de sinaptosomas	19
Western Blot	21
Precipitación de proteínas con acetona para análisis proteómico	21
Digestión de proteínas.....	22
Desalado	23
Sistema de espectrometría de masa	23
Adquisición dependiente de datos DDA (para la construcción de la biblioteca espectral).....	24
Adquisición independiente de datos (DIA).....	24
Procesamiento de datos, cuantificación y bioinformática	25
Análisis bioinformático de datos	26
Visualización de datos.....	26

Selección de proteínas candidatas	27
Medición de parámetros metabólicos en sangre (peso, glicemia y β -hidroxibutirato).....	27
Laberinto elevado en cruz	27
Prueba de campo abierto	28
Reconocimiento de objetos nuevos.....	28
Laberinto en Y	29
Laberinto de Barnes	29
Rotarod.....	31
Análisis morfológico.....	31
Cultivo celular	32
Extracción de proteínas.....	32
Ensayo de detección de AMP cíclico.....	33
Resultados.....	34
Determinación del proteoma sináptico de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica intermitente a corto, mediano y largo plazo.	34
La KD administrada por una semana (D1), produce cambios acotados en el proteoma sináptico, principalmente en el componente postsináptico del cerebro de ratones envejecidos.....	38

La KD administrada de forma cíclica por seis semanas (D6), produce cambios principalmente en el proteoma presináptico del cerebro de ratones envejecidos. 42

La KD administrada de forma cíclica por cincuenta y dos semanas (D52), produce cambios en el proteoma presináptico del cerebro de ratones envejecidos, regulando la vía de señalización mediada por AMPc, el tráfico de vesículas sinápticas y citoesqueleto de actina. 46

Ratones envejecidos tratados con KD cíclica presentaron aumento de BHB en sangre después de doce semanas de tratamiento. 52

La KD cíclica administrada durante dieciséis semanas preserva significativamente la memoria de trabajo en ratones envejecidos cuando estos fueron analizados después de doce semanas de tratamiento..... 55

Neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza prefrontal de ratones envejecidos presentan mayor complejidad del árbol dendrítico después de dieciséis semanas de tratamiento con KD cíclica. 62

La KD cíclica promueve un aumento en la expresión de la subunidad catalítica de PKA y BDNF después de dieciséis semanas de tratamiento..... 63

La KD cíclica aumenta la actividad de PKA en extractos de proteínas totales de PFC de ratones envejecidos después de dieciséis semanas de tratamiento. 65

Discusión 69

La KD administrada de forma cíclica regula predominantemente el compartimento presináptico de sinapsis corticales de ratones envejecidos a través del ciclo de vesículas sinápticas, citoesqueleto de actina y señalización mediada por AMPc.	69
El proteoma cortical sináptico cambia de forma dinámica en respuesta a la reprogramación metabólica inducida por la alternancia semanal de la administración de CD y KD.....	75
La administración de KD cíclica induce un aumento en la concentración de BHB en sangre y preserva la memoria de trabajo asociada a la corteza prefrontal en ratones envejecidos después de doce semanas de tratamiento.	77
La mejora en habilidades cognitivas de ratones envejecidos tratados con KD cíclica es acompañada de un cambio en la organización morfo estructural de neuronas piramidales de la corteza prefrontal, dada por una mayor complejidad del árbol dendrítico.	81
La KD cíclica promueve la activación de la proteína quinasa A (PKA) y estimula la producción de BDNF <i>in vivo</i> en la corteza de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica durante 16 semanas.	82
Conclusiones	87
Figuras suplementarias.....	89
Referencias.....	93

Resumen

El envejecimiento es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de patologías crónicas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas que comprometen la función cerebral. La corteza prefrontal es una región del cerebro que experimenta un importante declive funcional durante el envejecimiento, el cual va de la mano con un déficit cognitivo, como consecuencia de una merma en la actividad neuronal y sináptica. En el último tiempo han surgido diversas estrategias centradas en contrarrestar los efectos negativos del envejecimiento en el cerebro, que van desde tratamientos farmacológicos hasta cambios en los estilos de vida, sin embargo, no han sido capaces de ofrecer resultados satisfactorios. Estudios recientes demuestran que intervenciones nutricionales como la dieta cetogénica (KD) capaz de inducir cambios metabólicos en el cerebro, preserva la memoria de ratones en edad avanzada cuando es administrada en forma cíclica. Esto sugiere que desafíos metabólicos podrían promover efectos beneficiosos sobre componentes moleculares involucrados en la función sináptica y neurotransmisión cortical en el cerebro los cuales no han sido investigados en detalle.

Para abordar esta hipótesis, la presente investigación tiene como finalidad explorar los cambios moleculares que la KD ejerce en la corteza prefrontal de ratones envejecidos, analizando el proteoma cortical presináptico y postsináptico, después de tratamientos con KD cíclica a corto, mediano y largo plazo.

Los resultados de este trabajo indican que la KD administrada en forma cíclica produce cambios diferenciales en el componente presináptico y postsináptico cortical según el tiempo de tratamiento. Intervenciones a corto plazo producen cambios acotados principalmente en el componente postsináptico, en cambio a mediano y largo plazo la KD modula fundamentalmente el componente presináptico regulando procesos biológicos claves involucrados en la función sináptica, tales como la vía de señalización mediada por AMPc, dinámica del citoesqueleto de actina y tráfico de vesículas sinápticas. Con estos antecedentes, determinamos que ratones envejecidos preservaron memoria de trabajo, la cual se correlacionó con una mayor complejidad del árbol dendrítico en neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza prefrontal después de doce semanas de tratamiento con KD cíclica. Finalmente, estudios *in vivo* demostraron que estos cambios conductuales y estructurales están asociados a un aumento en la actividad quinasa de la proteína quinasa A (PKA) y abundancia del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), componentes esenciales del desarrollo y mantención de la plasticidad sináptica.

En consecuencia, las evidencias obtenidas en este trabajo contribuyen a dilucidar en parte, los mecanismos que la KD regula *in vivo* en la corteza cerebral, como consecuencia de una reprogramación metabólica inducida por esta intervención, capaz de preservar las redes sinápticas corticales durante el envejecimiento.

Abstract

Aging is the main risk factor associated to the development of chronic pathologies, including neurodegenerative diseases that compromises brain function. Prefrontal cortex is a brain region that experiences a functional decline during aging, which goes hand in hand with cognitive impairment, because of dampens in neuronal and synaptic activity. Several strategies focused into tackle the negative effects of aging in brain function have been proposed in the last years, ranging from pharmacological treatments to lifestyle changes, however they have not offered successful results. By contrast, recent studies show that nutritional interventions as ketogenic diet (KD), capable of inducing a metabolic change the brain is able to preserve memory in aging mice when is administrated in a cyclic way. This suggests that metabolic challenges could promote benefits on molecular components involved in synaptic function and neurotransmission in the brain cortex that has not been fully elucidated in detail.

To address this hypothesis, the present work explored the molecular changes that KD elicits on prefrontal cortex of aged mice, by analyzing the presynaptic and postsynaptic cortical proteome when they were fed with cyclic KD at short-, medium- and long-term.

Altogether, our results shows that cyclic KD has differential effects in the presynaptic and postsynaptic cortical proteome depending on the administration timeframe. Short-term treatment produces discrete changes in the postsynaptic component, whereas at medium-term and long-term administration, cyclic KD

essentially modulates the presynaptic component, through key biological processes involved in synaptic function such as cAMP signaling pathway, actin cytoskeleton dynamics and synaptic vesicle trafficking. Against this background, we found that old mice preserved working memory which was correlated with higher dendritic complexity of pyramidal neurons in layers 2/3 of prefrontal cortex after twelve weeks of cyclic KD treatment.

Finally, *in vivo* studies demonstrated that behavioral and structural changes were associated with increased kinase activity of protein kinase A (PKA) and high protein abundance of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), components that play an essential role in development and synaptic plasticity maintenance.

Overall, the findings obtained by this work contributes to elucidate the molecular mechanisms that cyclic KD regulates at some extent *in vivo* in the brain cortex, as result of metabolic switch induced by this intervention, which can preserve the cortical synaptic network during aging.

Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclaturas

AC: Adenilato ciclasa

Adcy5: Adenilato ciclasa 5

AMPC: AMP cíclico

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

BHB: β -hidroxibutirato

Ca⁺²: Calcio

CD: Dieta control

CREB: cAMP response element binding

D1: Cohorte de ratones envejecidos tratados con dieta por 1 semana

D16: Cohorte de ratones envejecidos tratados con dieta por 16 semanas

D52: Cohorte de ratones envejecidos tratados con dieta por 52 semanas

D6: Cohorte de ratones envejecidos tratados con dieta por 6 semanas

DDA: Adquisición dependiente de datos

DIA: Adquisición de datos independiente

ECL: Enhanced chemiluminescence

FDR: False discovery rate

KD: Dieta cetogénica cíclica (Cyclic Ketogenic Diet)

PKA: Proteína quinasa A

SWATH: Sequential Window Acquisition of All THEoretical fragment ion spectra mass spectrometry

Introducción

El cerebro experimenta transformaciones anatómicas y fisiológicas asociadas al envejecimiento

El envejecimiento se define como un deterioro funcional progresivo que se manifiesta de forma inherente en todos los seres vivos a lo largo del tiempo. A medida que envejecemos disminuyen las capacidades funcionales en todo el organismo, incluyendo el cerebro, un órgano especialmente vulnerable al paso del tiempo (Hof & Morrison, 2004; Stern et al., 2014). El cerebro está dividido en distintas regiones responsables de diferentes actividades., Una de ellas es la corteza prefrontal encargada de controlar habilidades cognitivas tales como la atención, la memoria de trabajo y la toma de decisiones. Estas habilidades disminuyen significativamente con la edad y van de la mano con importantes transformaciones anatómicas y fisiológicas como por ejemplo una reducción de la masa y volumen cortical (R. Peters, 2006), disminución del flujo sanguíneo (Chen et al., 2011), aumento de la inflamación (Gabuzda, D., Yankner, 2013), una reducción en la capacidad de captación de glucosa (Goyal et al., 2017) y pérdida sinapsis, (Morrison & Baxter, 2012).

La sinapsis es un componente estructural esencial para la comunicación de las neuronas jugando un papel clave en la función cognitiva. Está conformada por el componente presináptico de una neurona y un componente postsináptico presente en la neurona vecina. La actividad sináptica de esta estructura posee

una alta demanda energética, necesaria tanto para la transmisión del impulso nervioso, como para facilitar la cognición mediante el fenómeno de plasticidad sináptica (Buonomano & Merzenich, 1998; Citri & Malenka, 2008).

El estudio de las sinapsis y gran parte del conocimiento que tenemos de ellas a nivel molecular ha sido gracias a la obtención de sinaptosomas, fracciones subcelulares enriquecidas en componentes sinápticos que fueron aislados por primera vez en 1964 (Whittaker et al., 1964). Estas fracciones son de gran utilidad ya que preservan los terminales pre y post sinápticos de las sinapsis químicas y retienen la maquinaria molecular propia de la señalización neuronal, (Bai & Witzmann, 2007; Scheetz et al., 2000; Verhage et al., 1988; Wu et al., 1973). En consiguiente, los sinaptosomas serán el modelo de estudio utilizado en este trabajo, con la finalidad de analizar en profundidad sus cambios estructurales y moleculares en el cerebro envejecido.

Cambios morfológicos y estructurales del cerebro contribuyen al declive cognitivo asociado al envejecimiento.

Estudios realizados en las últimas décadas señalan de manera consistente que la reducción del volumen cerebral en especial de la corteza, está estrechamente vinculado a cambios en la conectividad neuronal (Geerligts et al., 2015). Estos cambios se ven reflejados en la reducción de ciertas habilidades cognitivas ligadas a esta región del cerebro tales como memoria de trabajo, atención y toma de decisiones. Recientemente, un estudio conductual comparativo realizado entre ratones jóvenes (tres-cinco meses) y viejos (veintiuno-veintitrés meses)

determinó importantes déficits en tareas que implican aprendizaje y memoria de trabajo con la edad. De forma interesante, esta merma en la memoria asociada a corteza fue acompañada de una reducida potenciación de largo plazo (LTP) en el hipocampo de estos ratones envejecidos (W. Yang et al., 2019). En esta misma línea, un estudio de meta análisis que compiló datos de imagenología de resonancia magnética esta vez en humanos, señaló que la activación de la corteza prefrontal disminuye linealmente con la edad al momento de realizar actividades que involucran memoria de trabajo (Yaple et al., 2019).

En la constante búsqueda de estrategias que permitan disminuir los efectos negativos del envejecimiento sobre la cognición, en los últimos años se ha puesto atención en intervenciones basadas en nutrición, las cuales han evidenciado un potencial efecto regulador de la función cerebral. Tal es el caso de un estudio realizado en humanos adultos no obesos de entre veintiuno y cincuenta años, quienes fueron sometidos a una baja en la ingesta calórica de un 25% durante dos años. Al término de esta intervención, aquellos individuos con ingesta calórica restringida evidenciaron una mejora significativa en la memoria de trabajo (Leclerc et al., 2020).

Por otro lado, un estudio en ratones envejecidos alimentados con dieta cetogénica desde los dieciocho meses de edad demostró mejoras importantes en memoria de trabajo y orientación espacial después de cinco meses de tratamiento y luego de ocho meses de tratamiento cuando los ratones cumplieron veintitrés y veintiséis meses de edad respectivamente (Zhou et al., 2021). Estos

hallazgos plantean la posibilidad de que intervenciones nutricionales sean capaces de modular aspectos moleculares y celulares de la función neuronal que se traducen en mejoras de habilidades cognitivas aún cuando el organismo se encuentra en una etapa avanzada de vida.

Estos resultados si bien parecen ser esperanzadores, todavía requieren un exhaustivo análisis que permita conocer en forma detallada los cambios moleculares que dichas intervenciones nutricionales pueden estar ejerciendo en las neuronas y sinapsis, para de esta forma poder ofrecer futuras terapias centradas en aminorar los efectos del envejecimiento en el cerebro.

La vía de señalización AMPc/PKA/CREB cumple un papel esencial en la memoria y se encuentra alterada en neuronas corticales envejecidas.

Las neuronas excitatorias poseen pequeñas proyecciones membranosas que se proyectan desde sus dendritas, denominadas espinas dendríticas, las cuales tienen por función mediar la transmisión del impulso nervioso hacia el soma. A medida que envejecemos las espinas dendríticas pierden la capacidad de transmitir impulsos nerviosos de forma eficiente. Estudios realizados tanto en humanos como en primates señalan que durante el envejecimiento, el declive de la transmisión sináptica se asocia principalmente a una disminución en el número de contactos sinápticos y no a un incremento en la muerte neuronal (Morrison & Baxter, 2012). Por otro lado, caracterizaciones morfométricas de las espinas

dendríticas en humanos y ratas envejecidas muestran que existe una importante reducción de la densidad del árbol dendrítico, disminución en el número de espinas y cambios morfológicos, (Bloss et al., 2011; Jacobs et al., 1997). Adicionalmente, estudios de microscopía electrónica en rebanadas de cerebro de la corteza prefrontal de monos Rhesus (*Macaca mulatta*) de 30 años, determinaron una reducción de entre un 20-30% de las sinapsis excitatorias (A. Peters et al., 2008).

Estos cambios morfológicos y estructurales de las espinas dendríticas durante el envejecimiento han sido en parte atribuidos a alteraciones en la vía de señalización cAMP/PKA/CREB (Smith et al., 2009), que podría incrementar el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas a avanzada edad.

El eje de señalización AMPc/PKA/CREB está estrechamente vinculado a la plasticidad sináptica, consolidación y mantención de la memoria regulando la actividad de diferentes moléculas en los terminales pre y postsinápticos de las sinapsis, tales como canales de potasio, proteínas involucradas en la exocitosis de vesículas sinápticas, receptores de glutamato del tipo AMPA y la activación de factores de transcripción como los elementos de unión en respuesta al AMP cíclico (AMPc), "CREB" por su acrónimo en inglés (Kim et al., 2013; Murphy & Segal, 1997).

Durante el envejecimiento existe un desbalance en la homeostasis del calcio (Ca^{+2}), el cual además de tener un papel clave en plasticidad y memoria, es uno de los principales activadores de la adenilato ciclasa (AC), enzima que convierte

el ATP a AMPc. Por lo tanto, la disminución marcada en los niveles de AMPc encontrados en el cerebro envejecido, probablemente se deban a una reducida activación de este segundo mensajero, mediada por Ca^{+2} (Puri, 1981). Por otra parte, la actividad de PKA en hipocampo se encuentra reducida, lo cual afecta la señalización de CREB en eventos de consolidación de la memoria que requieren su concurrencia (Bach et al., 1999; Porte et al., 2008). En contraste en la corteza prefrontal el eje AMPc/PKA parece estar anormalmente sobre activado perjudicando la memoria de trabajo (Ramos et al., 2003).

Estos antecedentes ponen de manifiesto que la mantención del eje cAMP/PKA/CREB es fundamental para una óptima regulación de la plasticidad sináptica y la organización de las espinas dendríticas durante el envejecimiento. Por ende, será uno de los procesos biológicos en los cuales nos enfocaremos en el presente proyecto.

La pérdida de proteostasis neuronal es una de las alteraciones moleculares características del cerebro envejecido.

La proteostasis definida como un balance de la homeostasis del proteoma que involucra la regulación de la síntesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas es esencial para sostener la actividad sináptica neuronal. Debido a la naturaleza post mitótica de las neuronas y los procesos dinámicos que lleva a cabo para su funcionamiento, requiere que estos mecanismos se encuentren altamente regulados. No obstante, a medida que envejecemos, diferentes fuentes de estrés celular afectan la integridad de las proteínas sinápticas, como

por ejemplo el daño mitocondrial, aumento de las especies reactivas de oxígeno, y fallas en mecanismos de degradación de proteínas, que finalmente alteran su conformación, volviéndolas propensas al mal plegamiento y agregación (Bishop et al., 2010). Un ejemplo de aquello es la baja capacidad de eliminación de proteínas mal plegadas que lleva a la formación de agregados tóxicos para la neurona en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. Otro de los principales sistemas de control de calidad de las proteínas está regulado por las chaperonas moleculares que también ven reducida su capacidad de corrección de errores y mal plegamiento durante el envejecimiento. Su relevancia en la proteostasis neuronal es tal, que han sido propuestas como blancos terapéuticos capaces por ejemplo de reducir la agregación de péptidos A β in vitro (Evans et al., 2006), retardar la senescencia y mejorar la función cognitiva en ratones envejecidos cuando son administradas de forma exógena (Bobkova et al., 2015).

Actualmente, cabe destacar que, si bien existen hallazgos que demuestran cambios en la proteostasis neuronal durante el envejecimiento, no se ha caracterizado en detalle el proteoma cortical sináptico, ni tampoco se ha logrado establecer con claridad cuáles son las proteínas y procesos biológicos que se correlacionan con el declive de la función cognitiva como la memoria de trabajo durante el envejecimiento.

En la medida que logremos una comprensión más acabada de los mecanismos moleculares que rigen el control de calidad de proteínas, tendremos más posibilidades de encontrar estrategias nuevas, que sean capaces de preservar la

proteostasis sináptica durante el envejecimiento y en especial, salvaguardar la función de aquellas proteínas esenciales que mantienen una red sináptica estable a edad avanzada, ya sea por medio de intervenciones farmacológicas, ejercicio, dieta y prácticas que mejoren la función cerebral.

En consecuencia, este proyecto abordará dichos aspectos, estudiando el proteoma cortical de sinaptosomas de ratones envejecidos sometidos a cambios en sus estilos de vida.

La KD reprograma el metabolismo energético, reduce mortalidad en etapas intermedias de vida y preserva la memoria en animales envejecidos.

La forma en cómo nuestro cerebro envejece está condicionada por dos grandes factores. Uno de ellos es el factor genético, componente heredable que no se puede modificar que representa aproximadamente un 30% según un estudio poblacional en gemelos Daneses (Herskind et al., 1996; Hjelmborg et al., 2006), lo cual supone que el otro 70% está condicionado por factores ambientales como los estilos de vida, manejo del estrés, alimentación y ejercicio. En las últimas décadas los investigadores han centrado sus esfuerzos en extender el período de vida saludable de las personas introduciendo cambios específicamente en aquellos aspectos que pueden ser modificables, tales como los estilos de vida, esto con el fin de enfrentar la longevidad mejor preparados. Un ejemplo de lo anterior es el ejercicio y la restricción calórica que han demostrado lograr

extender el período de vida saludable de forma robusta en modelos murinos, en primates no humanos y otras especies (Van Cauwenberghe et al., 2016; Vecchio et al., 2018).

Ambas intervenciones producen distintos cambios a nivel metabólico, sin embargo, tienen en común un incremento en los niveles de β -hidroxibutirato (BHB), uno de los cuerpos cetónicos. El BHB es un metabolito sintetizado a partir de la beta oxidación de ácidos grasos en el hígado y es utilizado por todas las células del organismo como fuente de energía cuando los niveles de glucosa disponibles son escasos. Esta molécula ha demostrado ejercer efectos beneficiosos en el cerebro, otorgando neuro protección, y rejuvenecimiento del sistema inmune (Longo & Panda, 2016; Mattson et al., 2017). Además, se ha descubierto que el BHB genera efectos neuroprotectores en el sistema nervioso ya que estimula la producción de BDNF (Hu et al., 2018) y mejora las habilidades de memoria y aprendizaje en ratones (Zou et al., 2009).

La dieta cetogénica es un conjunto de intervenciones nutricionales que ofrece variantes ya que puede estar formulada con niveles muy bajos de carbohidratos o no tenerlos. Ambas opciones, de igual manera gatillan una reprogramación metabólica estimulando la movilización de lípidos desde los adipocitos hacia las mitocondrias de los hepatocitos, estimulando finalmente la cetogénesis y favoreciendo un incremento en los niveles de BHB en el cerebro (figura 1).

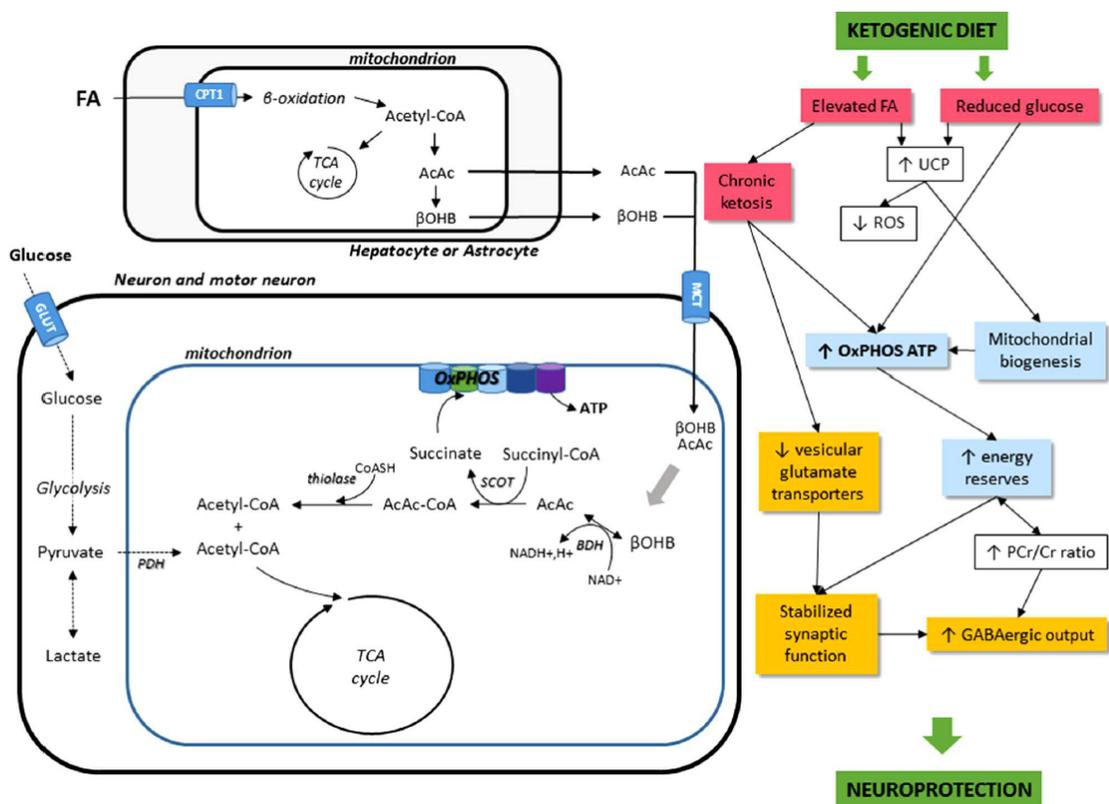


Figura 1. Esquema que detalla los principales efectos de la KD en el metabolismo energético a nivel neuronal. El principal sustrato energético de las neuronas es la glucosa, sin embargo, la ingesta de una dieta cetogénica reduce la glucosa y promueve el ingreso de ácidos grasos (FA) a las mitocondrias de astrocitos pero principalmente de hepatocitos, lugar donde ocurre la β -oxidación de ácidos grasos. Este proceso culmina con la formación de cuerpos cetónicos acetoacetato (AcAc) y β -hidroxibutirato (β OHB) que son transportados por el torrente sanguíneo e ingresados a las neuronas mediante transportadores de mono carboxilato (MCT). En las mitocondrias los cuerpos cetónicos ingresan al ciclo de Krebs para producir ATP. Un incremento en la concentración de cuerpos cetónicos en sangre (cetosis) tiene efectos neuroprotectores en el sistema nervioso estabilizando la función sináptica. Glut, transportador de glucosa; TCA cycle, ciclo de ácidos tricarbóxicos; OxPHOS, fosforilación oxidativa; AcAc, acetoacetato, β OHB, β -hidroxibutirato; CPT1, carnitina palmitoiltransferasa; PDH, piruvato descarboxilasa, ROS, especies reactivas de oxígeno; UCP, proteínas desacopladoras; ATP, adenosina trifosfato; PCr/Cr, fosfocreatina/creatina. Adaptado de Veyrat-Durebex et al, 2018.

Esta intervención también ha demostrado ejercer efectos positivos en el cerebro de humanos, ya que ha sido utilizada en el área clínica desde hace décadas, como tratamiento anticonvulsivo en niños que sufren de epilepsia refractaria (Sharma & Jain, 2014). Por otro lado, dieta cetogénica administrada a un grupo de adultos obesos durante 3 meses de forma continua provocó mejoras cognitivas, pérdida de peso y aumentó su rendimiento físico (Mohorko et al., 2019).

Estudios en ratones viejos (24-26 meses de edad) han demostrado que la administración a largo plazo de una dieta cetogénica intermitente, es decir, alternando sucesivamente una semana con dieta control y a la semana siguiente dieta cetogénica, comenzando en etapa adulta (12 meses de edad), produce una mejora significativa en la memoria y aprendizaje de estos animales 12 meses después del tratamiento, evidenciado por estudios conductuales de reconocimiento de objetos y memoria condicionada, respecto de sus pares envejecidos (24-26 meses de edad) tratados con dieta control (Newman et al., 2017). De igual manera, en un estudio paralelo e independiente publicado el mismo año, se observó que ratones adultos (12 meses de edad) administrados con dieta cetogénica por 12 meses, esta vez sin intermitencia pero controlando su ingesta calórica diaria, presentaron mejoras cognitivas y motoras notables 12 meses después del tratamiento, en comparación a sus pares controles (Roberts et al., 2017).

En conjunto, estos antecedentes señalan de forma consistente que un incremento sostenido de BHB en el tiempo produce cambios en el funcionamiento del cerebro a nivel metabólico y molecular, que podrían impactar sobre el proteoma sináptico, de esta forma contribuyendo a preservar las habilidades cognitivas en los ratones viejos intervenidos con esta dieta.

Sin embargo, estos interesantes hallazgos dan lugar a una serie de interrogantes que no han sido investigadas en profundidad. Uno de ellos es cuál es el tiempo mínimo de administración de dieta cetogénica, necesario para sostener la función sináptica y a qué edad es adecuado comenzar con los tratamientos. Estudios en modelos murinos han aplicado esta intervención en distintas edades del animal, que van desde los 2 meses a los 12 meses de edad y por distintos períodos de tiempo abarcando desde 3 meses a 12 meses de tratamiento, evidenciando resultados contradictorios como el estudio realizado por (Huang et al., 2019) en donde se administró dieta cetogénica durante 3 meses a ratones jóvenes de 2 meses de edad, sin observar diferencias en la función sináptica con respecto a los controles, en contraposición a lo reportado por (Newman et al., 2017; Roberts et al., 2017).

Por último, una interrogante clave que no ha sido dilucidada hasta el día de hoy es comprender cuál es el mecanismo molecular que el BHB es capaz de ejercer en las sinapsis neuronales, cuáles son los principales sustratos implicados y cómo estos efectos promueven una función sináptica cortical óptima, de manera

tal que permita explicar las mejoras conductuales reportadas en las investigaciones mencionadas anteriormente.

Por lo tanto, considerando los antecedentes presentados, nos planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“La dieta cetogénica induce cambios en el proteoma de sinaptosomas corticales asociados a una mejora en las funciones cerebrales durante el envejecimiento”

Objetivo General

Caracterizar el proteoma cortical sináptico de ratones envejecidos tratados con dieta control y dieta cetogénica cíclica a corto plazo, mediano plazo y largo plazo e identificar proteínas y procesos biológicos regulados por esta intervención.

Objetivos Específicos

- 1. Determinar el proteoma cortical sináptico de ratones envejecidos (26 meses de edad) tratados con dieta control y dieta cetogénica cíclica a corto plazo (1 semana), mediano plazo (6 semanas) y largo plazo (52 semanas).**

2. **Caracterizar el perfil proteómico de sinapsis corticales de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica a corto, mediano y largo plazo e identificar proteínas sinápticas que experimenten cambios significativos en respuesta a esta intervención nutricional.**
3. **Evaluar la expresión de proteínas sinápticas que presentan cambios significativos con la dieta cetogénica cíclica, en la corteza prefrontal de ratones envejecidos (26 meses de edad).**

Materiales y métodos

Manejo y mantención de animales

Ratones macho de la cepa C57BL/6 fueron mantenidos en el bioterio GERO de la Universidad Mayor, con ciclos de 12 h luz/oscuridad a 25°C con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos animales fueron aprobados tanto por el comité de ética de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, como de la facultad de Ciencias de la Universidad Mayor.

Dietas y alimento utilizado

El alimento fue proporcionado *ad libitum*. El contenido por macronutrientes de cada una de las dietas utilizadas (Envigo) fue el siguiente: Dieta control, 10% de proteínas, 13% de grasas y 77% de carbohidratos (TD.150345). Dieta cetogénica, 10% de proteínas y 90% de grasas (TD.160153). La fuente de grasas proviene de Crisco, manteca de cacao y aceite de maíz.

La composición de las dietas experimentales se detalla a continuación (g/kg):

Componente	Dieta Control (TD.150345)	Dieta Cetogénica (TD.160153)
Caseína	100	180
Metionina-DL	1,6	2,88
Almidón de maíz	512,46	0
Sacarosa	100	0
Maltodextrina	155	0
Crisco	25	440
Manteca de cacao	0	150
Aceite de maíz	25	85
Celulosa	35	59,19
Calorías por gramo	3,7	6,7

Tabla 1. Composición de nutrientes para cada una de las dietas utilizadas.

Crisco es una marca propietaria de aceite vegetal hidrogenado con un contenido mínimo de grasas trans. Los ácidos grasos presentes en la dieta cetogénica por peso corresponden aproximadamente a 24% de ácidos grasos saturados, 39% de ácidos grasos monoinsaturados y 37% de ácidos grasos poliinsaturados. Las dietas fueron cambiadas semanalmente en todas las jaulas. La ingesta de alimento fue calculada mediante la diferencia de la cantidad inicial de alimento y el alimento restante al término de cada semana.

Reactivos, soluciones, materiales y equipos utilizados

Reactivos

Fabricante	Origen	Reactivo
Abcam	<i>Cambridge, Reino Unido</i>	Cocktail inhibidor de proteasas (ab201111) Western Blot Stripping buffer (ab282569) Anti-PKA subunidad β policlonal conejo (ab187515), kit de detección de AMP cíclico (ab65355)
Amresco	<i>Solón, Ohio EE. UU</i>	Tris (0826)
Calbiochem	<i>Darmstadt, Alemania</i>	Ortovanadato de Sodio (567540)
Jackson Immunoresearch Labs	<i>West Grove, Pennsylvania EE. UU</i>	Anti-ratón IgG-HRP (AB_2340770) Anti-conejo IgG-HRP (AB_10015282)
Merck	<i>Darmstadt, Alemania</i>	Sacarosa (567540) Anti-GAPDH monoclonal ratón (MAB374) Tween 20 (8.22184.1000)
Santa Cruz	<i>Santa Cruz, California EE. UU</i>	Anti- β -Actina monoclonal ratón (SC-47778) Anti-BDNF policlonal conejo (SC-546)
Sigma	<i>St. Louis, Missouri, EE. UU.</i>	Dodecil sulfato de sodio (L5750) Anti-Gria2 policlonal conejo (SAB4300535), kit de detección de glutamato (MAK004)

Synaptic systems	<i>Göttingen, Alemania</i>	Anti-Pacsin1 policlonal conejo (196002)
US Biological	<i>Swampscott, Massachusetts, EE. UU</i>	Glicina (G8160)
Hitobiotec Corp.	<i>Kingsport, Tennessee, EE.UU</i>	Reactivo de tinción Golgi

Tabla 2. Reactivos utilizados para el desarrollo del proyecto.

Soluciones

Solución	Descripción
Tampón de homogenización	0,32M Sacarosa, 0,5mM EGTA, 5mM Tris HCl pH 7,4,
Tampón de resuspensión	0,32M Sacarosa, 0,5mM EGTA, 5mM Tris pH 8,1
Tampón de incubación 1	0,5mM, 1mM DTT, 5mM Tris-HCl pH 8,1
Tampón de incubación 2	0,32M Sacarosa, 0,5mM CaCl ₂ , 1% Tritón, 2mM DTT, 10mM Tris-HCl pH 8,1
Tampón de incubación 3	0,32M Sacarosa, 0,5mM EGTA, 1mM DTT, 5mM Tris-HCl pH 8,1
Tampón de corrida 1X	25mM Tris-HCl pH 8,8, 192mM Glicina, 0,1% SDS
Tampón de transferencia	48mM Tris-HCl pH 8.8, 39mM Glicina, 20% Metanol, 0,04% SDS
Tampón de carga	0,25% Azul de bromofenol, 0,5M DTT, 50% Glicerol, 10% SDS, 0,25M Tris-HCl pH 6,8
Tampón de lisis	50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxicolato de sodio,

	0,1% SDS, 1X cocktail inhibidor de proteasas
TBS 10X	0,5M Tris-HCl pH 7,4, 1.5M NaCl
Tampón de lavado 1X (TBS-T, 0.5%)	1X TBS pH 7,4, 0.5% Tween20
Tampón de bloqueo 5%	1X TBS-T 0,5%, 5% BSA

Tabla 3. Soluciones utilizadas para el desarrollo del proyecto.

Materiales y equipos

Material o equipo	Fabricante	Procedencia
Centrifuga Hettich Universal 320	Hettich	Tuttlingen, Alemania
Eksigent Technologies NanoLC-Ultra 2Dplus HPLC System	SCIEX	Framingham, Massachusetts, EE. UU
Fotodocumentador Uvitec 4.7 Cambridge	Uvitec	Cambridge, UK
Qubit Fluorometer	Life Technologies	Carlsbad, California, EE. UU
Sistema de electroforesis BioRad	BioRad	Hércules, California, EE. UU
Tecan Infinite 450	Tecan	Männedorf, Suiza
TissueLyser II	Quiagen	Hilden, Alemania
Triple TOF6600	SCIEX	Framingham, Massachusetts, EE. UU
Ultracentrífuga Beckman, Optima L-60	Beckman Coulter	Pasadena, California, EE. UU
Ultracentrífuga Sorvall Mx150+ Criostato Microm HM525	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, EE. UU

Tabla 4. Materiales y equipos utilizados para el desarrollo del proyecto.

Métodos

Preparación de sinaptosomas

Con el fin de poder estudiar el proteoma sináptico, se realizó una preparación de sinaptosomas en donde se obtuvieron dos fracciones. Una fracción enriquecida en componentes presinápticos y otra fracción enriquecida en componentes postsinápticos, desde cerebros de ratones envejecidos proporcionados por el Dr. John Newman. En total se analizaron 3 cohortes de animales, las cuales fueron tratadas previamente en el laboratorio del Dr. Newman con dieta cetogénica intermitente de acuerdo a lo publicado en (Newman et al., 2017). La primera cohorte de 26 meses de edad fue tratada con dieta cetogénica por una semana y será denominada de aquí en adelante como “D1”. La segunda cohorte de 26 meses de edad fue tratada con dieta cetogénica por 6 semanas y será nombrada como “D6”. La tercera cohorte comenzó a ser tratada cuando los ratones tuvieron 14 meses de edad, y tuvo una duración de 52 semanas, por lo tanto, esta cohorte será llamada “D52”. Cabe destacar que todos los animales fueron sacrificados y analizados a los 26 meses de edad.

La preparación de sinaptosomas se realizó según un protocolo proporcionado por la Dra. Úrsula Wyneken, derivado de (Dosemeci et al., 2006). De cada cohorte se utilizaron 4 cerebros por condición (n=4 controles, n=4 cetogénicos), obteniendo de cada cerebro 2 fracciones, una pre y otra postsináptica. En consecuencia, se analizaron 16 muestras por cohorte, lo cual da un total de 48 muestras para las 3 cohortes.

Brevemente, se extrajo la corteza prefrontal de los animales envejecidos “D1”, “D6” y “D52”, las cuales pesaron en promedio 60 mg y fueron homogenizadas utilizando el equipo TissueLyser II de Qiagen, basado en beads metálicas de 5mm, con un tampón de homogenización que contiene sacarosa 0,32M, Tris 5mM pH 7,4, PMSF 1mM e inhibidores de proteasas. El homogenizado total fue sometido a centrifugación a 1000g por 2 minutos y se colectó el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 12.000g por 20 minutos. El pellet obtenido en esta etapa se resuspendió en tampón de sacarosa 0,32M, EGTA 0.05mM y Tris 5mM pH 7,4 y fue colocado sobre una primera gradiente de sacarosa 1.2M/1M, Tris 5Mm, pH 7,4. La muestra fue centrifugada a 250.000g por 60 minutos en ultracentrífuga Beckman Optima L-60 de Beckman Coulter, utilizando rotor basculante. Terminada la centrifugación, se colectó la interfase que correspondió a sinaptosomas totales. Esta fracción, fue diluida 1:5 con un tampón que contiene EGTA 0,5mM, DTT 10mM, Tris 5mM pH 8,1 e inhibidores de proteasas por 30 minutos a 4°C y luego centrifugada a 33.000g por 30 minutos utilizando rotor basculante. El sobrenadante obtenido correspondió a la fracción enriquecida en componentes presinápticos que denominamos “PRE1”, mientras que el pellet, a la fracción enriquecida en densidades post sinápticas que denominamos “PSD”. El pellet fue resuspendido y homogenizado en un tampón que contiene 0,32mM de sacarosa, 0,5mM de CaCl₂, 1% de tritón X-100, 2mM de DTT y 10mM de Tris pH 8,1 y luego centrifugado a 33.000g por 30 minutos en ultracentrífuga utilizando rotor basculante. El sobrenadante colectado, denominado como “PRE2” fue combinado con el “PRE1”, mientras que el pellet que correspondió a las

densidades postsinápticas (PSD) fue resuspendido en tampón Tris HCl pH 7,4, 5mM, con SDS al 0,5%.

Western Blot

Antes de analizar las muestras por espectrometría de masas, fue necesario caracterizarlas para validar la distribución de los componentes pre y postsinápticos. Para ello, las fracciones fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de BCA, (Hill et al., 1988), utilizando el sistema comercial “BCA protein assay” (Thermo scientific). Aproximadamente 2µg de proteína total por carril fueron cargados en geles de poliacrilamida 4-20% mini-protean TGX y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: SNAP25 #111002 y Synaptophysin 1 #101011 (Synaptic systems) como marcadores presinápticos. PSD95 #124003, Homer1 #160002 (Synaptic Systems) y NR1 #G8913 (Cell Signaling), como marcadores postsinápticos.

Precipitación de proteínas con acetona para análisis proteómico

El análisis proteómico se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Birgit Schilling, del Instituto Buck de envejecimiento (USA, CA) que cuenta con un laboratorio especialmente dedicado a estudios -ómicos.

Las fracciones presinápticas fueron precipitadas agregando acetona fría -20°C e incubadas toda la noche a -20°C. Al día siguiente fueron centrifugadas a 16.000g por 20 min. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con acetona fría. Las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 16.000g por 10 minutos. Se

removió el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente para luego ser resuspendido en tampón Tris-HCl 5mM, pH 7,4.

Digestión de proteínas

Las 48 fracciones enriquecidas en componentes pre y postsinápticos de las cohortes D1, D6 y D52, fueron sometidas a digestión con tripsina utilizando alícuotas de 30 µg de proteína total por cada una ellas. Se les agregó un tampón de lisis que contuvo 5% SDS y 50mM de bicarbonato de trietilamonio (TEAB), pH 7,5. Luego las muestras fueron reducidas en 20mM de ditiotreitól (DTT) por 10 minutos a 50°C. Posteriormente las fracciones fueron enfriadas a temperatura ambiente por 10 minutos y entonces alquiladas con 40mM de iodoacetamida (IAA) por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después fueron acidificadas con ácido fosfórico al 1,2%, resultando en un coloide de proteínas visible. Se agregó un volumen de 7 veces equivalente al volumen de lisado acidificado conteniendo 90% de metanol en 100mM de TEAB. Las muestras fueron resuspendidas hasta que el coloide de proteínas fue disuelto en metanol 90%. El volumen total de las muestras fue eluido en columnas micro S-Trap (Protifi) en tubos Eppendorf. Las muestras fueron centrifugadas en alícuotas de 200 µl por 20 segundos a 4.000g. Luego las columnas S-Trap fueron lavadas con 200 µL de metanol al 90% en 100mM de TEAB (pH 7.1) dos veces por 20 segundos cada uno a 4.000g. Las columnas de S-Trap fueron colocadas en un tubo de elución limpio e incubadas por 1 hora a 47°C con 125 µL de tampón de digestión de tripsina (50mM TEAB, pH 8) a una razón de 1:25 (proteasa: proteína,

peso: peso). La misma mezcla de buffer de digestión de tripsina fue agregada de nuevo e incubada toda la noche a 37°C. Los péptidos fueron eluidos desde la columna S-Trap al día siguiente en el mismo tubo de elución como sigue: se agregaron 80 µL de TEAB 50 mM y luego se centrifugó por 1 minuto a 1.000 g. Luego se agregaron 80 µL de ácido fórmico 0.5%, y la columna fue centrifugada por 1 minuto a 1.000g. Finalmente, se agregaron 80 µL de acetonitrilo 50% en 0.5% de ácido fórmico y la columna fue centrifugada por 1 minuto a 4.000g. Las soluciones eluidas fueron concentradas en un Speed-Vac y resuspendidas en ácido fórmico 0,2%.

Desalado

Las muestras resuspendidas conteniendo los péptidos fueron tratadas para remover sales, utilizando puntas que contienen discos con filtros C18 llamadas *stage tips*. De esta forma fueron concentradas y luego resuspendidas en ácido fórmico 0,2% conteniendo un estándar de tiempo de retención de péptidos llamado “Hyper Reaction Monitoring” (iRT, Biognosys).

Sistema de espectrometría de masa

Brevemente, las muestras fueron analizadas por HPLC-ESI-MS/MS en fase reversa usando un sistema Eksigent Ultra Plus nano-LC 2D HPLC (Dublin, CA) con un sistema cHiPLC (Eksigent) el cual fue directamente conectado al espectrómetro de masas quadrupole time-of-flight (QqTOF) TripleTOF 6600 (SCIEX, Concord, CAN). Después de la inyección, la mezcla de péptidos fue cargada en una pre-columna C18 (200 µm x 0,4 mm ChromXP C18-CL chip, 3

um, 120 Å, SCIEX) y lavada a 2 µl/min por 10 minutos con el solvente de carga (H₂O/0.1% ácido fórmico) para desalado. Posteriormente, los péptidos fueron transferidos a una columna C18-CL ChromXP DE 75 µm x 15 cm, 3 µm, 120 Å, (SCIEX), y eluidos a una tasa de flujo de 300 nL/min con un gradiente de 3 horas usando un tampón acuoso de acetonitrilo.

Adquisición dependiente de datos DDA (para la construcción de la biblioteca espectral)

Para la identificación de proteínas y péptidos, el espectrómetro de masas fue operado en el modo de adquisición dependiente de datos (DDA), donde los 30 iones precursores más abundantes desde el escaneo MS1 (250mseg) fueron aislados a una resolución de 1 m/z para hacer la espectrometría de masas en tándem, utilizando el modo de disociación inducida por colisión (CID-MS/MS, 100 mseg por MS/MS, modo de escaneo de iones en “alta sensibilidad”), usando el software Analyst 1.7 con un tiempo total de ciclos de 3.3 segundos como se describió previamente en (Christensen et al., 2018).

Adquisición independiente de datos (DIA)

Para la cuantificación de las muestras, todos los péptidos fueron analizados por adquisición independiente de datos (DIA, SWATH), usando una ventana de aislación de ancho variable de 64 m/z (Collins et al., 2017), (Schilling et al., 2017). El ancho de ventana variable fue ajustado de acuerdo a la complejidad de la corriente de iones de MS1 observada dentro de un cierto rango de m/z usando

un algoritmo de DIA llamado “método de ventana variable” (se escogieron ventanas más estrechas en rangos “busy” de M/Z, mientras que se utilizaron ventanas amplias en rangos de m/z con pocos iones precursores eluidos). Las adquisiciones DIA producen complejos espectros MS/MS, que representan a todos los analitos dentro de cada ventana Q1 m/z seleccionada. El tiempo de ciclo del DIA de 3,2 segundos incluyó un escaneo de iones precursores de 250 milisegundos seguido por un tiempo de acumulación de 45 milisegundos por cada uno de los 64 segmentos variables del SWATH.

Procesamiento de datos, cuantificación y bioinformática

La información obtenida a partir de las adquisiciones dependientes de datos (DDA) fue analizada usando el motor de búsqueda ProteinPilot (SCIEX 5.0, versión 4769) mediante el algoritmo Paragon (5.0.0.0,4767). Gracias a este motor de búsqueda se generó una biblioteca espectral MS/MS que fue cargada en Spectronaut 14.2.200619.47784 (Biognosys). Los datos de cuantificación relativa obtenidos mediante adquisición de datos independiente DIA/SWATH se realizaron comparando las áreas de los peaks de los péptidos en diferentes puntos de tiempo durante los ciclos de detección. Para los sets de datos DIA/SWATH MS2, la cuantificación se basó en la identificación de iones fragmentados desde cromatogramas o XICs, típicamente iones y- y b-, que coincidían exactamente con péptidos específicos presentes en las bibliotecas espectrales. Los péptidos fueron identificados con valores de Q < 0.01%. Las

proteínas que cambiaron significativamente fueron aceptadas con un FDR del 5% (q-value <0,01).

Análisis bioinformático de datos

Para estudiar los 3 proteomas generados se hizo un análisis bioinformático que nos permitió obtener una interpretación biológica de la información colectada. Se utilizaron los softwares ClusterProfiler, ClueGO de Cytoscape, SynGO y STRING. Las rutas de señalización curadas para los análisis de enriquecimiento fueron referenciadas desde las siguientes bases de datos: GO Biological Function, GO Cellular Component, KEGG pathways, WikiPathways y Reactome Pathways. Para los datos de ontología, las pruebas estadísticas aplicadas fueron restringidas a evidencia experimental (EXP; “inferred from EXPeriment, IDA; “Inferred from Direct Assay”, IPI; “Inferred from Physical Interaction”, IMP; “Inferred from Mutant Phenotype”, IGI; “Inferred from Genetic Interaction”, IEP; “Inferred from Expression Pattern”). El criterio estadístico utilizado para el p-value ajustado de las rutas enriquecidas fue Benjamini-Hochberg $p\text{-value}<0,01$ por test hipergeométrico (“right sided”). En el análisis de ClueGO, los bordes que conectaron las rutas de señalización fueron aquellos que cumplieron con los índices estadísticos de Kappa score >40%.

Visualización de datos

La visualización de datos de volcano plot fue adquirida en R (<https://www.r-project.org/>) usando el paquete “ggplot2”. Las paletas de colores en R fueron generadas con el paquete “RColorBrewer”. Las visualizaciones de rutas

biológicas fueron generadas y modificadas usando el plug-in ClueGO de Cytoscape.

Selección de proteínas candidatas

Para la elección de candidatos se estableció como criterio de selección proteínas diferencialmente expresadas que presentaran una razón de cambio $>1,5$ (cetogénicos/controles) y un q-value $<0,05$.

Medición de parámetros metabólicos en sangre (peso, glicemia y β -hidroxibutirato)

Los animales fueron pesados individualmente al inicio de cada semana y sus valores fueron registrados hasta el final del tratamiento. Se tomó una muestra de sangre (50uL) a partir de un pequeño corte en la cola de una muestra representativa de ratones (N= 5 ratones por condición), que fue suficiente para realizar las mediciones de glucosa y BHB utilizando cintas reactivas Freestyle de Abbott, las cuales fueron medidas en el glucómetro Abbott Freestyle Optim Neo. Las mediciones se tomaron semanalmente hasta cuando los animales se adaptaron a la dieta. Luego se tomaron cada 2-3 semanas.

Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz (Rodgers & Dalvi, 1997) consiste de dos plataformas unidas en forma de cruz. Cada plataforma tiene 78 cm x 5 cm de dimensión con una región cuadrada en el centro de 5cm en donde se introduce el animal. Una de las plataformas es abierta, mientras que la otra tiene una pared continua de

10cm de alto. A los animales se les permitió explorar por 10 min el laberinto y se reportó la distancia recorrida y tiempo de permanencia. Los movimientos fueron grabados durante toda la prueba y analizados con el software ANY-maze (Stoelting Co).

Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto (Chew et al., 2015) fue desarrollada utilizando una caja cúbica de 40 cm de largo, 40 cm de ancho y 40 cm de alto sin tapa. Los ratones fueron colocados en el centro de la caja, uno por uno y sus movimientos fueron registrados por 10 minutos utilizando el software ANY-maze. Entre cada prueba, la plataforma fue limpiada con papel y etanol 30% para remover olores. Se definió una zona central imaginaria de 20 x 20 cm, la cual permitió medir la razón centro: distancia total.

Reconocimiento de objetos nuevos

La prueba de reconocimiento de objetos nuevos (Antunes & Biala, 2012) fue desarrollada utilizando una caja cúbica de 40 cm de largo, 40 cm de ancho y 40 cm de alto sin tapa y consistió en dos etapas familiarización y pruebas, en dos días. El primer día de familiarización los ratones fueron colocados en la plataforma y se les permitió explorar durante 10 minutos. Luego fueron removidos de la caja para colocar 2 objetos idénticos cerca de las esquinas (5 cm de distancia entre ellas) y se volvió a colocar a los ratones para que exploraran la plataforma con los objetos recién ubicados. Al día siguiente, (día de prueba) los ratones fueron colocados en la plataforma y se les permitió explorar por 5

minutos. A continuación, un objeto del día anterior (objeto conocido) y un objeto nuevo en forma, altura y color, fueron colocados cerca de las esquinas (5 cm de distancia entre ellos). Los ratones fueron puestos nuevamente en la plataforma y se les permitió explorar por 10 minutos. Todos los objetos tuvieron una base cilíndrica de 5 cm de diámetro y la exploración de los objetos se determinó en un radio de 2,5 cm alrededor de los objetos. Los movimientos fueron registrados por el software ANY-maze.

Laberinto en Y

Esta prueba fue desarrollada utilizando un laberinto con tres brazos de 8 cm de ancho, 35 cm de largo y paredes de 20 cm de altura, conectados en un ángulo de 120° (Kraeuter & Guest, 2019). A cada uno de los brazos se les denominó con las letras A, B y C. Cada animal fue colocado en el brazo A mirando hacia el centro del laberinto, y se le dejó explorar libremente cada uno de los brazos por 8 minutos. Los desplazamientos fueron registrados con el software ANY-maze. Después de cada prueba, para remover olores el laberinto fue limpiado con papel y etanol 30%. Las alternaciones fueron definidas como la visita a 3 brazos diferentes (ABC, ACB, BCA, BAC, CAB, CBA) y el porcentaje de alternaciones espontáneas se determinó mediante la siguiente fórmula $\% \text{ alternaciones espontáneas} = (\text{Alternaciones totales} / (\text{total de entradas a los brazos}-2)) \times 100$.

Laberinto de Barnes

En esta prueba los ratones fueron colocados en una plataforma circular (92 cm de diámetro y 72,5 cm por sobre el piso) conteniendo 20 orificios igualmente

distribuidos en los bordes de la plataforma (5 cm de diámetro y 7,5 cm de separación entre orificios), (Sunyer et al., 2007). Alrededor de la plataforma se colocaron estímulos visuales para la navegación espacial. Antes de cada prueba los animales fueron colocados por 10 segundos dentro de un contenedor cilíndrico en el centro de la plataforma. Se removió el cilindro y se expuso a los ratones a un sonido aversivo (sonido del temporizador). Se registró el tiempo que demoró cada animal en encontrar el orificio de salida y el tiempo que demoró en entrar a este, los cuales fueron denominados como latencia primaria y latencia final respectivamente. El protocolo consistió en tres fases: adaptación, adquisición y prueba. Durante la adaptación, los ratones fueron guiados al orificio de salida por el experimentador y se les permitió reconocer el lugar por 2 minutos. La fase de adquisición consistió en cuatro ensayos por día por cuatro días consecutivos (días 1-4). Durante la fase de adquisición, a cada animal se le permitió explorar el laberinto por 3 minutos o hasta que ingresaran al orificio de salida. Una vez que los ratones ingresaron al orificio, el sonido del temporizador fue apagado inmediatamente y al animal se le permitió estar ahí por 1 minuto. Si el ratón no ingresó al orificio de salida dentro de los 3 minutos, el experimentador condujo al animal a la salida permitiéndole permanecer en el lugar 1 minuto. Cada ratón fue entonces colocado en sus respectivas jaulas de prueba (15 minutos de intervalo entre ensayos). La plataforma y las paredes fueron limpiadas entre mediciones de diferentes animales. Se registró la latencia primaria y total. La prueba fue realizada los días 5 y 12 para evaluar memoria a corto y largo plazo respectivamente. El orificio de salida fue mantenido en la misma posición usada

en durante el periodo de adquisición. La prueba fue realizada por 90 segundos y se registró la latencia. La latencia primaria de los días 1-4 fue medida como curva de aprendizaje.

Rotarod

El protocolo de rotarod (Deacon, 2013) se desarrolló utilizando el aparato Rotarod LE8200 Panlab Harvard y se desarrolló en dos días consecutivos. El primer día correspondió a la sesión de entrenamiento en donde todos los ratones fueron colocados en barras que rotaron a una velocidad constante de 4rpm por 1 minuto, por 3 veces. Luego, en el segundo día (día de prueba), todos los ratones fueron colocados en las barras de rotación, por 3 veces con una aceleración que fue desde 4rpm hasta 40rpm por 5 minutos, midiendo el tiempo que permanecieron sostenidos, hasta caer de la plataforma, en segundos.

Análisis morfológico

Para el análisis morfológico, una vez finalizada la etapa de conducta los ratones fueron anestesiados utilizando ketamina (50mg/kg) y xilacina (5mg/kg). De esta forma se procesaron los cerebros tomando en consideración que el grupo KD se encontrara en semana control. Se utilizó el kit Hito Golgi Cox OptimStain (Hitobiotec Corp. Kingsport, Tennessee, Estados Unidos) y se obtuvieron rebanadas coronales de 300µm de espesor, las cuales fueron montadas para visualización en microscopio Zeiss Axioplan2 (objetivo 100x, apertura numérica 1,3). Mediante la utilización del atlas anatómico de ratón de Allen, se identificaron neuronas piramidales de la capa 2/3 pertenecientes a las regiones infra límbica y

prelímica de la corteza prefrontal. El observador, denominado ciego para las condiciones experimentales seleccionó al azar al menos catorce neuronas por grupo basándose en los siguientes criterios: 1) ausencia de dendritas truncadas, 2) impregnación de la tinción consistente en todo el campo, 3) separación espacial de neuronas impregnadas para evitar superposición entre estas con neuronas vecinas. Se realizaron trazos de las neuronas seleccionadas mediante cámara lúcida, las que luego fueron escaneadas (imágenes de 8-bit en escala de grises, formato TIFF con resolución de 200dpi). Finalmente para el análisis morfométrico se utilizó el software ImageJ (NIH) y el número de intersecciones de las dendritas se obtuvo a través de análisis de Sholl.

Cultivo celular

Células de neuroblastoma de ratón Neuro-2A (N2A) (ATCC), fueron cultivadas en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) conteniendo 10% de suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina 1X, e incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Las células diferenciadas fueron tratadas con β-hidroxibutirato (#54920, Sigma Aldrich) a una concentración de 10mM por 10 minutos, 30 minutos, 6 horas y 24 horas.

Extracción de proteínas

Después del tratamiento con β-hidroxibutirato, las células N2A fueron lavadas con PBS 1X frío y luego lisadas con tampón de lisis que contiene RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 1%), PMSF 1mM, NaF 5mM, cocktail de inhibidor de proteasas 1X (ab201111 Abcam) y caliculina 1X. Los lisados fueron

centrifugados a 10.000g por 10 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit (life technologies). Las muestras fueron preparadas con tampón de carga y desnaturaladas a 95°C por 5 minutos para ser analizadas por western blot.

Ensayo de detección de AMP cíclico

100 mg de tejido de corteza de cerebro fueron utilizados para la detección de AMP cíclico mediante el kit de inmunoensayo directo de AMP cíclico ab65355 de Abcam según instrucciones del proveedor. Brevemente, las muestras fueron homogenizadas en HCl 0,1M y centrifugadas a 14.000g por 5 minutos. 100µL de sobrenadante fueron incubados con tampón de neutralización y reactivo de acetilación por 10 minutos. En paralelo una alícuota de 10uL de sobrenadante fue utilizada para cuantificación de proteínas. Las muestras luego fueron deshidratadas en incubador a 60°C por 24 horas. Al día siguiente fueron resuspendidas en 50µL de tampón de AMPc 1X y cargadas en una placa de 96 pocillos cubierta con proteína G. A las muestras se les agregó 10uL de anticuerpo anti-AMPc y fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se agregaron 10µL de AMPc-HRP a cada pocillo, y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego los pocillos fueron lavados 5 veces con 200µL tampón de AMPc 1X y se les agregó 200uL de revelador HRP con incubación por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, la reacción se detuvo agregando 100µL de HCl 1M a cada pocillo.

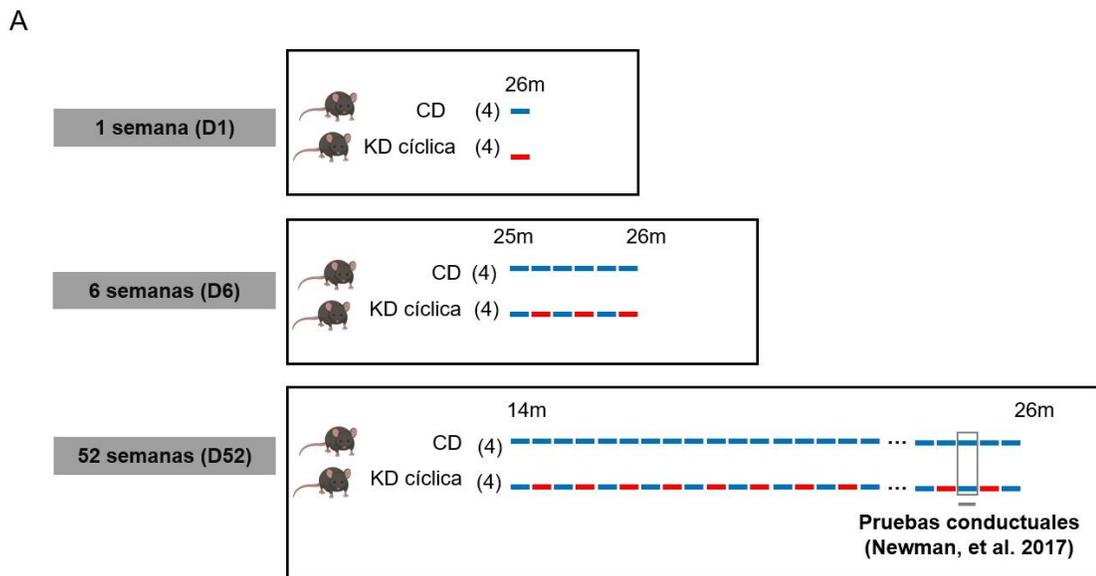
Las lecturas se realizaron en el lector de microplacas Tecan Infinite F50, a una longitud de onda de 450nm.

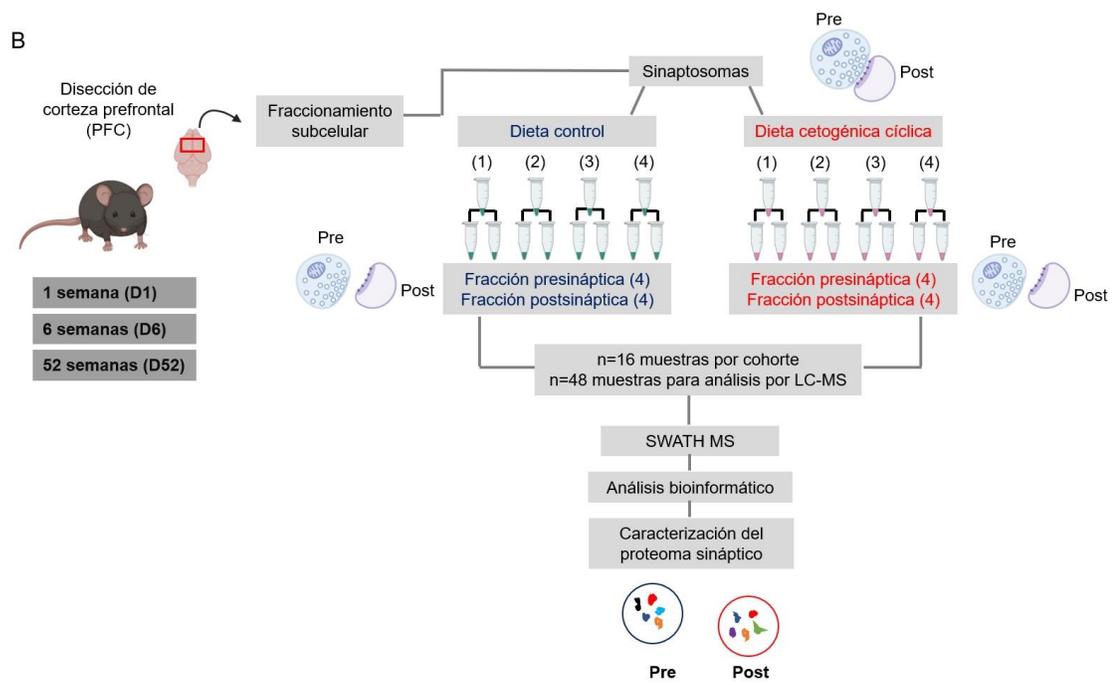
Resultados

Determinación del proteoma sináptico de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica intermitente a corto, mediano y largo plazo.

Se extrajeron las cortezas prefrontales de ratones envejecidos de las 3 cohortes que fueron tratadas previamente con dieta cetogénica intermitente a corto, mediano y largo plazo (figura 2A). Las muestras fueron procesadas para obtener sinaptosomas enriquecidos en componentes presinápticos y postsinápticos. Por definición, los sinaptosomas corresponden a fracciones subcelulares que contienen estructuras postsinápticas reselladas fusionadas a porciones presinápticas de las sinapsis. La mayoría de los estudios en sinaptosomas utilizan estas fracciones subcelulares totales, sin embargo, dada la complejidad de los procesos que ocurren en ambos compartimentos y con el fin de poder identificar con mayor precisión los fenómenos biológicos que la dieta cetogénica podría estar regulando, decidimos separar ambos compartimentos en dos fracciones; una fracción enriquecida en componentes presinápticos y otra fracción enriquecida en componentes postsinápticos (figura 2B). En total obtuvimos 48 fracciones que correspondieron a las 3 cohortes estudiadas. Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas por western blot utilizando NR1 como

marcador postsináptico, Synaptophysin-1 como marcador presináptico, HSP60 como marcador mitocondrial e Histona H3 como marcador nuclear. Como se puede observar en la figura 2C, obtuvimos un importante enriquecimiento de NR1 en la fracción postsináptica y de Synaptophysin-1 en la fracción presináptica, lo cual nos permite utilizar estas fracciones para espectrometría de masa.





C

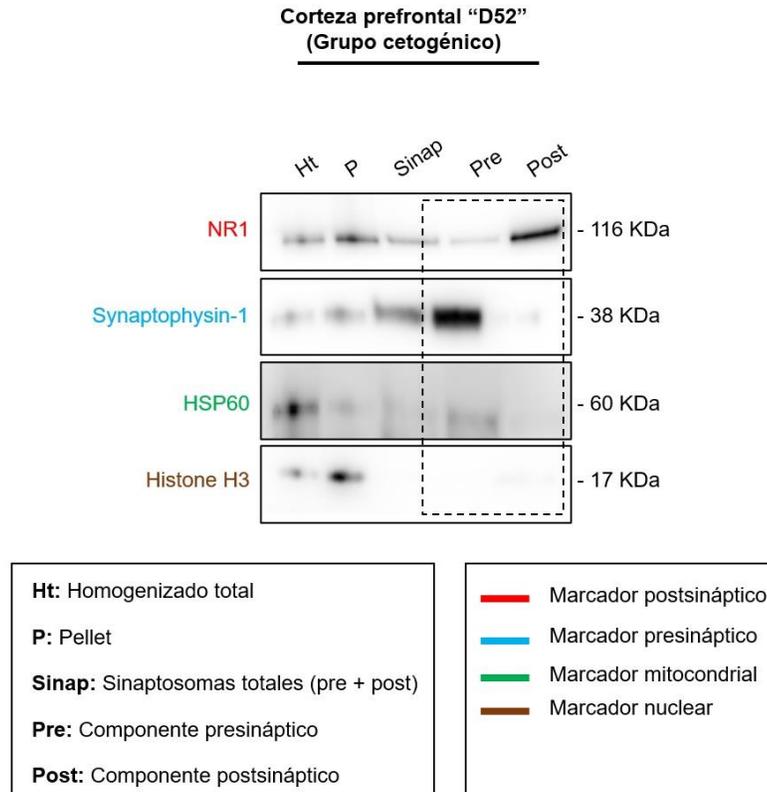


Figura 2. Diseño experimental y caracterización de la preparación de sinaptosomas para la determinación del proteoma sináptico de ratones envejecidos tratados con CD y KD cíclica. A) Tres cohortes de ratones macho fueron tratados con dieta cetogénica cíclica. La cohorte "D1" comenzó el tratamiento a los 26 meses de edad y se denominó como corto plazo (1 semana de tratamiento). La cohorte "D6" comenzó el tratamiento a los 25 meses de edad y terminó a los 26 meses de edad, esta se denominó como mediano plazo "D6" (6 semanas), mientras que la cohorte "D52" comenzó el tratamiento a los 14 meses de edad, terminando a los 26 meses y se denominó como largo plazo (52 semanas de tratamiento). La administración de la dieta se realizó semana por medio (bloques rojos), intercalando con dieta control (bloques celestes), de acuerdo a lo reportado por (Newman et al., 2017). Todos los animales fueron analizados a los 26 meses de edad. **B)** Se procesaron cuatro cerebros por grupo control/cetogénico y a partir de ellos se obtuvieron dos fracciones. Una enriquecida en componentes presinápticos y otra enriquecida en componentes postsinápticos, por lo tanto, se obtuvieron dieciséis fracciones en total por

cohorte, es decir, cuarenta y ocho fracciones para el total de las tres cohortes. Las cuarenta y ocho muestras fueron analizadas por espectrometría de masa utilizando la tecnología SWATH. Una vez obtenidos los proteomas de cada cohorte, se procedió a caracterizarlas mediante bioinformática con el fin de identificar proteínas y procesos biológicos regulados por la dieta cetogénica, para ser analizados a través de ensayos in vivo. **C)** Western blot representativo de la caracterización de las fracciones colectadas después de la preparación de sinaptosomas desde la corteza prefrontal de un ratón envejecido tratado con la dieta cetogénica por 52 semanas. Es posible observar el enriquecimiento de las respectivas fracciones pre y postsinápticas resaltadas en el cuadro de líneas punteadas. (N=4) por cada condición. CD, dieta control; KD, dieta cetogénica cíclica; m, meses de edad; Ht, homogenizado total; P, pellet; Sinap, Sinaptosomas totales; Pre, componente presináptico; Post, componente postsináptico.

La KD administrada por una semana (D1), produce cambios acotados en el proteoma sináptico, principalmente en el componente postsináptico del cerebro de ratones envejecidos.

En el presente trabajo, establecimos un protocolo eficiente para la caracterización del proteoma presináptico y postsináptico de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica/dieta control por medio de la estrategia de adquisición independiente de datos (DIA), una metodología que otorga alta precisión en la identificación de proteínas en la espectrometría de masas. Así es como logramos comparar el componente presináptico cetogénica/control y postsináptico cetogénica/control en donde proteínas que cambiaron significativamente (q -value $<0,05$) y que tuvieron una razón de cambio de al menos 1,5 veces

(cetogénica/control) fueron consideradas para análisis bioinformáticos en todo el estudio.

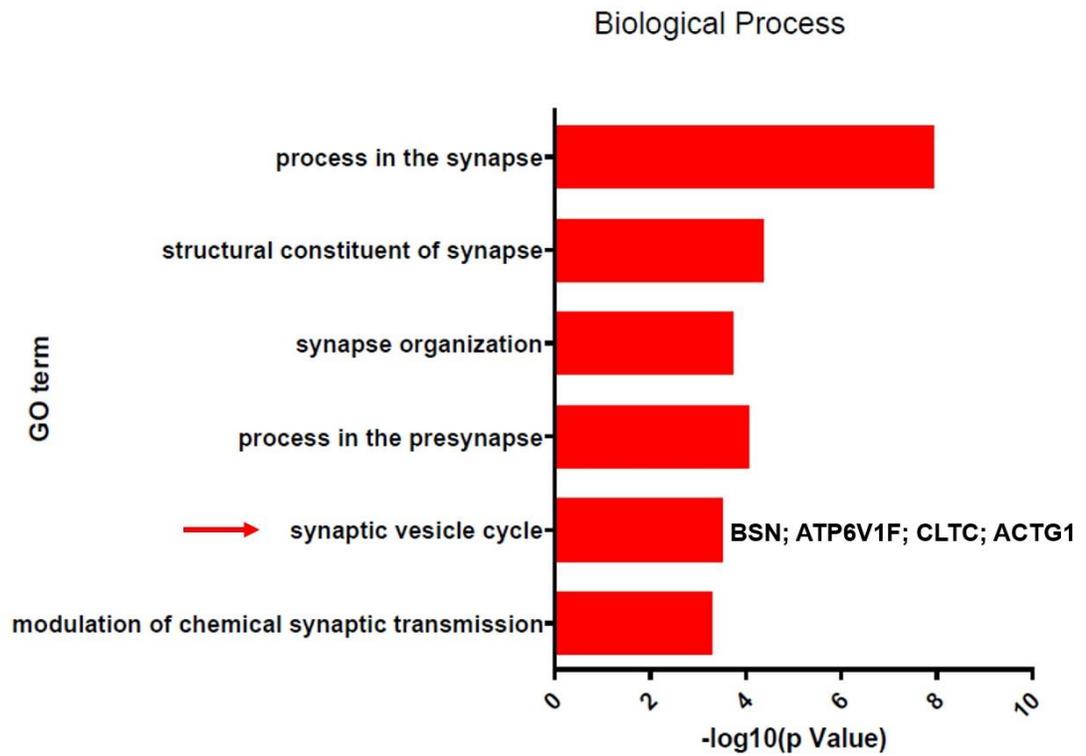
El análisis proteómico realizado para la cohorte D1, arrojó un total de 2976 proteínas identificadas. De ellas, sólo 37 proteínas cumplieron los criterios estadísticos para ser consideradas como diferencialmente expresadas (q-value <0,05, razón de cambio $\geq 1,5$). De las 37 proteínas diferencialmente expresadas, 22 proteínas aumentaron sus niveles respecto a la condición control, mientras que 15 disminuyeron.

Dado el reducido número de proteínas diferencialmente expresadas, fue complejo hacer un análisis bioinformático en las bases de datos. Sin embargo, fue posible utilizar la herramienta SynGO, que corresponde a una base de datos que contiene procesos biológicos y componentes celulares específicamente asociados a las sinapsis (Koopmans et al., 2019). Allí encontramos procesos biológicos entre los cuales destaca el ciclo de vesículas sinápticas que contiene proteínas como Bassoon, ATP-asa vacuolar 1F, la cadena pesada 1 de clatrina (Cltc) y gamma actina 1 (Actg1) (figura 3A, flecha roja).

Las proteínas identificadas dentro de los procesos biológicos que arrojó SynGO, fueron seleccionadas para ser analizadas con STRING, una plataforma que permite identificar interacción proteína-proteína, ya sea mediante unión física, o indirecta siendo parte de una misma vía metabólica o proceso celular (von Mering et al., 2005).

En cuanto a la interacción proteína-proteína fue posible observar un vínculo entre algunas proteínas localizadas preferentemente en el compartimento postsináptico. La mayoría de ellas subexpresadas con respecto a la condición control (figura 3B).

A



B

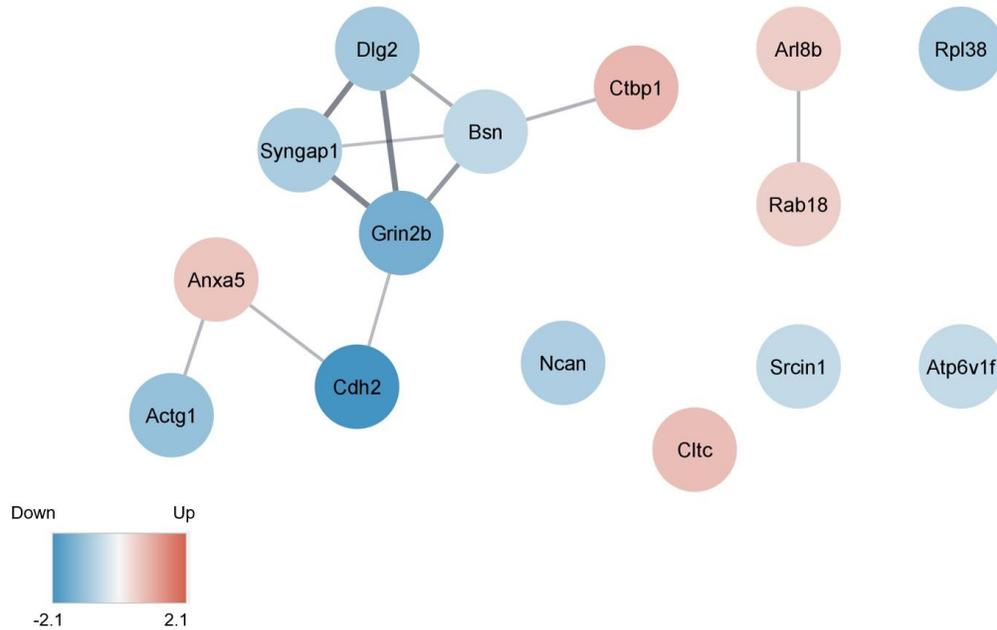


Figura 3. Proteínas sinápticas involucradas en procesos biológicos e interacciones proteína-proteína en la cohorte D1. A) La base de datos de SynGO identificó procesos biológicos regulados por la dieta cetogénica a corto plazo. Se destaca el ciclo de vesículas sinápticas (flecha roja) y las proteínas que forman parte de este proceso biológico están señaladas a la derecha en negrita. **B)** Análisis de STRING basado en interacciones proteína-proteína de las proteínas sinápticas contenidas dentro de los procesos biológicos que arrojó SynGO. Las esferas están coloreadas según la abundancia relativa (log ratio) de la razón condición cetogénica/condición control. De esta forma, colores cercanos al rojo indican sobreexpresión y colores cercanos al azul, subexpresión. Las proteínas están representadas en esferas y cada esfera está conectada por una línea recta cuyo grosor representa el poder estadístico de la evidencia experimental que existe para dicha interacción. Se utilizaron como fuentes de interacción, minería de datos, evidencia experimental, co-expresión, co-ocurrencia. El valor estadístico mínimo requerido para establecer una interacción fue de 0.4 (confianza estadística media).

La KD administrada de forma cíclica por seis semanas (D6), produce cambios principalmente en el proteoma presináptico del cerebro de ratones envejecidos.

Es importante destacar que, para esta cohorte, además de un tiempo de administración de seis semanas de dieta cetogénica intermitente, los cerebros de estos animales fueron procesados en una semana cetogénica y no en semana control.

El análisis proteómico identificó un total de 3346 proteínas. De ellas, 150 se encontraron diferencialmente expresadas. La dirección de cambio señala que existió un mayor número de proteínas subexpresadas (94 subexpresadas vs 56 proteínas sobreexpresadas) al comparar la condición cetogénica/control. Es importante destacar que a diferencia del tratamiento a corto plazo (D1), esta intervención produjo cambios mayoritariamente en las proteínas del compartimento presináptico. Dentro de las proteínas sobreexpresadas encontramos varios miembros de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.

Ampliando la búsqueda de procesos biológicos regulados por la dieta cetogénica en esta cohorte realizamos un análisis mediante ClueGO, plataforma que facilita la visualización de términos biológicos conteniendo grupos de proteínas en una red agrupada funcionalmente (Bindea et al., 2009). En este análisis seleccionando el grupo de proteínas sobreexpresadas, potenciación sináptica a

largo plazo, vesículas sinápticas y cadena transportadora de electrones fueron los procesos biológicos más destacados (figura 3).

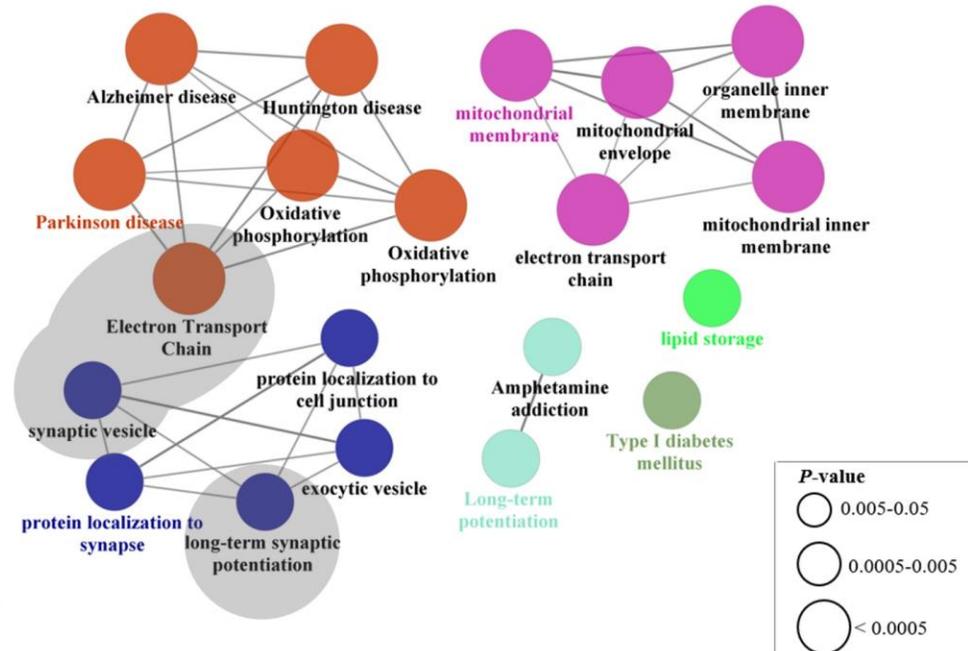
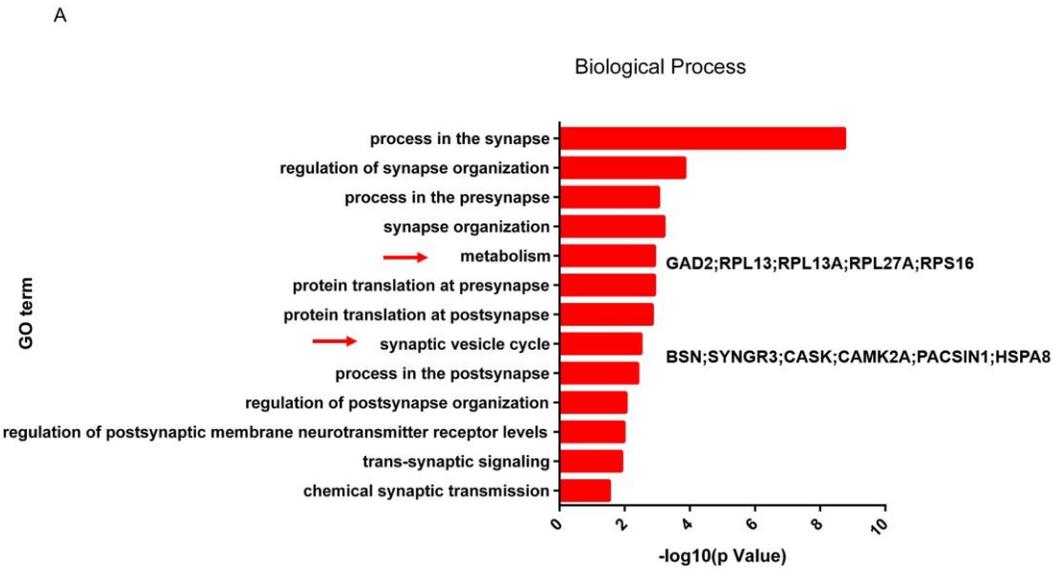


Figura 4. Procesos biológicos representados de proteínas sobreexpresadas en la corteza prefrontal de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica administrada a mediano plazo (D6). El software ClueGO permitió encontrar una serie de términos biológicos de Gene Ontology (GO) y KEGG/Biocarta que están siendo regulados por la dieta cetogénica. Las líneas que conectan los procesos biológicos representan índices de conectividad ($Kappa > 40\%$). Los procesos biológicos relacionados entre sí se encuentran agrupados por color. Se destaca con fondo gris claro la cadena transportadora de electrones, vesículas sinápticas y potenciación sináptica a largo plazo como procesos biológicos relevantes para la función sináptica.

Cuando analizamos las proteínas diferencialmente expresadas a través de SynGO, encontramos metabolismo y al igual que en D1, el ciclo de las vesículas sinápticas, entre los procesos biológicos más enriquecidos (figura 5A, flechas

rojas). Las proteínas contenidas en los procesos biológicos que entregó SynGO fueron analizadas por STRING. Allí encontramos un importante grupo de proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas sinápticas y regulación de la neurotransmisión, tales como Homer1, Camk2a, Grin2a, Flot1 y Scamp1 (figura 5B, círculos negros).



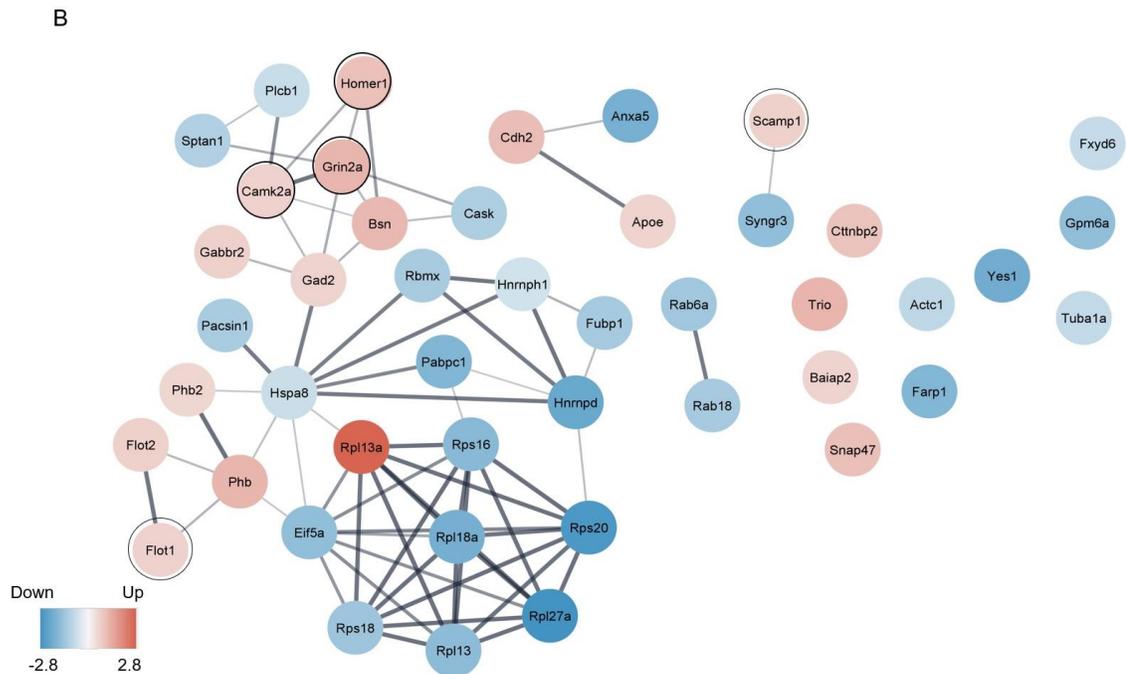


Figura 5. Procesos biológicos e interacción entre proteínas sinápticas diferencialmente expresadas de la cohorte D6. A) El análisis mediante SynGO identificó procesos biológicos relevantes asociados a las sinapsis que están siendo regulados por la dieta cetogénica a mediano plazo (flechas rojas). Se muestran las proteínas contenidas dentro de los términos biológicos señalados en negrita. **B)** Análisis de STRING basado en interacciones proteína-proteína de las proteínas sinápticas contenidas dentro de los procesos biológicos que arrojó SynGO. Las esferas contienen a las proteínas, las cuales están coloreadas según la abundancia relativa (log ratio) de la condición cetogénica/control. Cada esfera está conectada por una línea recta cuyo grosor representa el poder estadístico de la evidencia experimental que existe para dicha interacción. Se utilizaron como fuentes de interacción, minería de datos, evidencia experimental, co-expresión, co-ocurrencia. El valor estadístico mínimo requerido para establecer una interacción fue de 0.4 (confianza estadística media). Proteínas que participan en la regulación de la función sináptica están resaltadas con círculos negros. Camk2, calcium-calmodulin dependent protein kinase II; Grin2a, Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A; Homer1, Homer1; Flot1, Flotillin1; Scamp1, Secretory carrier-associated membrane protein 1.

La KD administrada de forma cíclica por cincuenta y dos semanas (D52), produce cambios en el proteoma presináptico del cerebro de ratones envejecidos, regulando la vía de señalización mediada por AMPc, el tráfico de vesículas sinápticas y citoesqueleto de actina.

Con el fin de observar efectos acumulativos del tratamiento con dieta cetogénica cíclica a largo plazo y descartar que los cambios que observáramos se debieran a un incremento agudo de cuerpos cetónicos en el cerebro durante una semana en tratamiento con dieta cetogénica, los tejidos de los ratones de esta cohorte fueron colectados en una semana con dieta control.

En este caso el análisis proteómico fue capaz de identificar un total de 3564 proteínas. 135 proteínas se encontraron diferencialmente expresadas. La dirección del cambio fue similar (67 proteínas sobreexpresadas y 68 subexpresadas) siendo el compartimento presináptico el componente que más se modificó (ver resumen en tabla 5).

Llamativamente, un número importante de proteínas que presentaron bajos niveles de expresión en la condición cetogénica respecto de la condición control correspondieron a miembros de la cadena transportadora de electrones mitocondrial Atp5f1, Ndubf7, Immt, Atp5c1, ATP5a1, (figura suplementaria 1).

Siguiendo con el análisis, ampliamos la búsqueda de procesos biológicos enriquecidos utilizando ClueGO. Para ello, separamos las proteínas

diferencialmente expresadas en dos grupos, sobreexpresadas y subexpresadas y luego ejecutamos el análisis. Gracias a este estudio, en el grupo de las proteínas sobreexpresadas identificamos 3 importantes procesos biológicos que la dieta cetogénica regula. Uno de ellos es el reciclaje y endocitosis de vesículas sinápticas y regulación de la organización del citoesqueleto de actina. Además, observamos la señalización mediada por AMP cíclico, que como fue mencionado en la introducción, es una vía de señalización que se encuentra desregulada durante el envejecimiento y juega un papel relevante en la función sináptica. Interesantemente, también encontramos un nodo denominado “ruta de regulación de la longevidad” (figura 6, fondo gris).

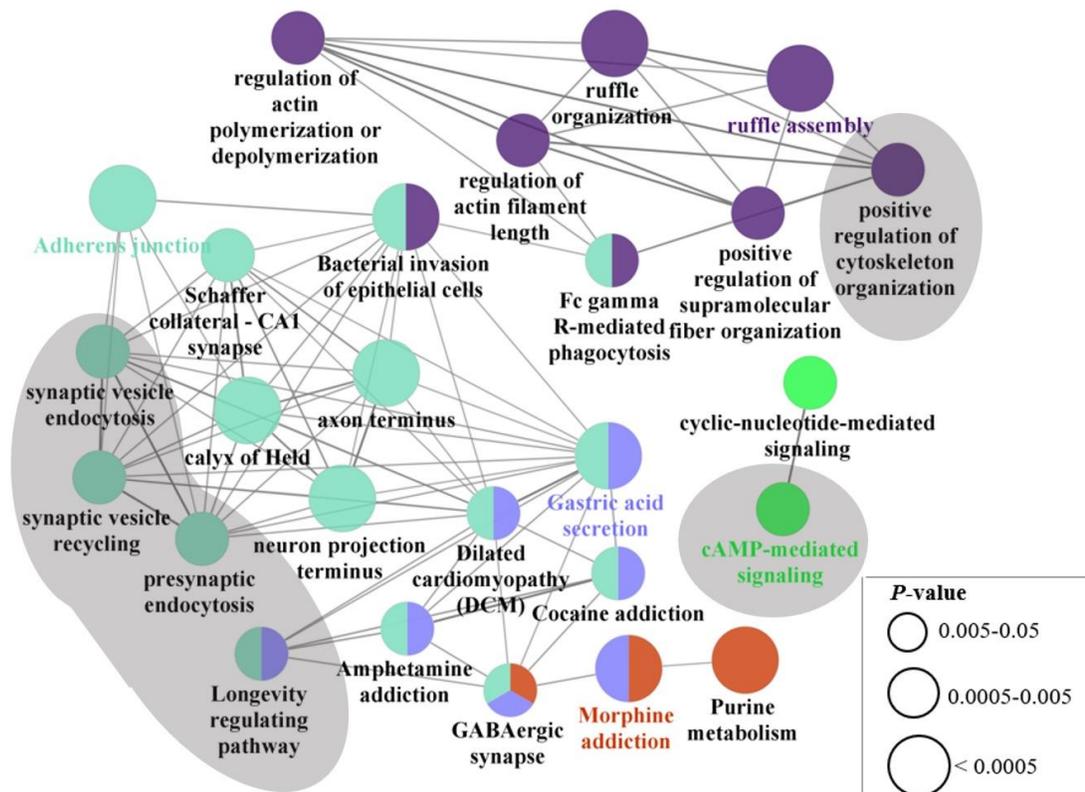


Figura 6. Procesos biológicos representados de proteínas sobreexpresadas en la corteza prefrontal de ratones envejecidos tratados con KD cíclica administrada a largo plazo (D52). El análisis por ClueGO permitió identificar cuatro grandes clústeres de procesos biológicos. Se destacan con fondo gris aquellos relacionados directamente con la función sináptica y neurotransmisión. Esferas del mismo color corresponden a una red de procesos biológicos funcionalmente relacionados. Esferas que tienen más de un color representan procesos biológicos compartidos en más de una red. Las líneas que conectan los procesos biológicos representan índices de conectividad Kappa >40%.

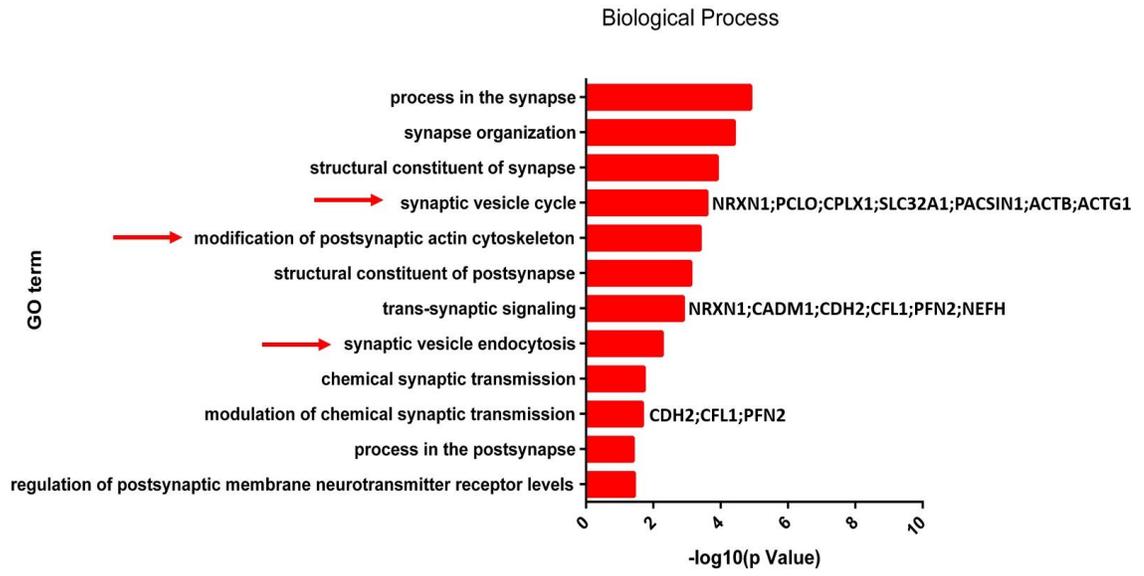
Para estudiar con mayor profundidad el proteoma cortical sináptico de D52, analizamos las proteínas diferencialmente expresadas a través de SynGO. El resultado indicó que las proteínas de la cohorte D52 están representadas en

varios procesos biológicos relevantes de las sinapsis, (figura 7A, flechas rojas), procesos que de forma consistente también han sido identificados en las cohortes D1 y D6. Es importante señalar que, si bien la dieta cetogénica genera cambios discretos en el componente postsináptico, encontramos en este análisis el proceso biológico de modificación del citoesqueleto de actina postsináptico, el cual podría tener relevancia por ejemplo en la organización de espinas dendríticas durante el envejecimiento.

Para indagar en la conectividad de proteínas sinápticas implicadas en los procesos biológicos obtenidos a partir de la plataforma SynGO y su relación entre ellas, decidimos analizarlas mediante STRING.

Los resultados revelaron un importante grupo de proteínas relacionadas con la dinámica del citoesqueleto de actina (Rac1, Cfl1, Actg1, Actb) y tráfico de vesículas sinápticas (Cplx1, Slc32a1, Pacsin1), (figura 7B).

A



B

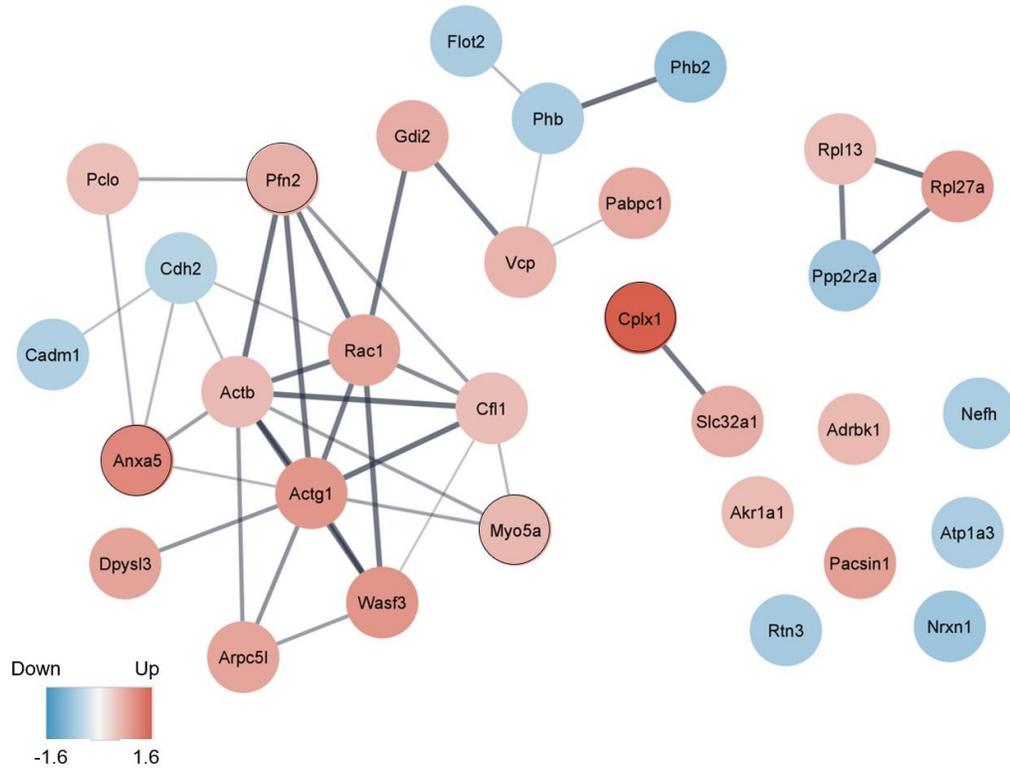


Figura 7. Procesos biológicos e interacción entre proteínas sinápticas diferencialmente expresadas de la cohorte D52. A) Análisis de SynGO identificó la regulación del citoesqueleto de actina y vesículas sinápticas como procesos biológicos relevantes para la función sináptica, regulados por la dieta cetogénica cíclica (flechas rojas). Se muestran las proteínas contenidas dentro de los términos biológicos señalados en negrita. **B)** Análisis de STRING basado en interacciones proteína-proteína de las proteínas sinápticas contenidas dentro de los procesos biológicos que arrojó SynGO. Las esferas contienen a las proteínas, las cuales están coloreadas según la abundancia relativa (log ratio) de la condición cetogénica/control. Cada esfera está conectada por una línea recta cuyo grosor representa el poder estadístico de la evidencia experimental que existe para dicha interacción. Se utilizaron como fuentes de interacción, minería de datos, evidencia experimental, co-expresión, co-ocurrencia. El valor estadístico mínimo requerido para establecer una interacción fue de 0.4 (confianza estadística media). Proteínas que participan en la regulación del citoesqueleto de actina y tráfico de vesículas sinápticas están resaltadas con

círculos negros. Pfn2, Profilin2; Anxa5, Annexin5; Myo5a, Myosin5a; Cplx1, Complexin1.

Cohorte	Tiempo de tratamiento	Total de proteínas identificadas	Proteínas diferencialmente expresadas	Pre	Post	Sobreexpresadas	Subexpresadas
Corto plazo (D1)	1 semana	2976	37	9	28	22	15
Mediano plazo (D6)	6 semanas	3346	150	124	26	56	94
Largo plazo (D52)	12 meses	3564	135	123	12	67	68

Tabla 5. Resumen del total de proteínas identificadas, proteínas diferencialmente expresadas, distribución y dirección de cambio para las cohortes D1, D6 y D52.

Ratones envejecidos tratados con KD cíclica presentaron aumento de BHB en sangre después de doce semanas de tratamiento.

A partir de los resultados obtenidos en los análisis del proteoma sináptico cortical de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica a corto, mediano y largo plazo, decidimos explorar los efectos de esta intervención mediante estudios *in vivo*.

Para ello, basándonos en nuestros datos y recopilando información bibliográfica tanto en modelos animales como en humanos (Hernandez et al., 2018; Krikorian et al., 2012) decidimos administrar dieta cetogénica intermitente a ratones C57BL/6 de 23 meses de edad y evaluar una serie de parámetros cognitivos doce semanas después de iniciado el tratamiento. La etapa de estudios conductuales tuvo una extensión de cuatro semanas ya que todas las pruebas realizadas se

hicieron en semanas control. De este modo, los tejidos fueron colectados en semana control, después de dieciséis semanas de tratamiento, cuando los ratones cumplieron veintiséis-veintisiete meses de edad. Esta cohorte será denominada como D16. (figura 8).

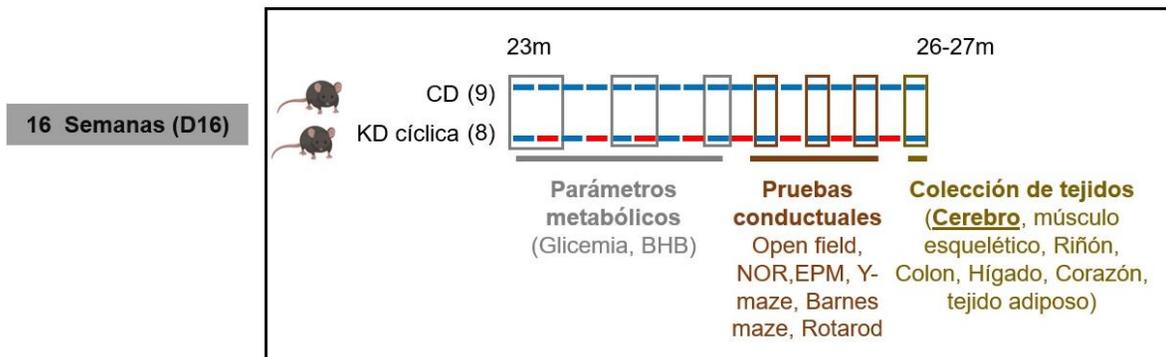


Figura 8. Diseño experimental de la administración de CD y KD cíclica aplicada en ratones envejecidos por dieciséis semanas (D16). Un grupo de nueve y ocho ratones macho fueron tratados con dieta control y dieta cetogénica cíclica respectivamente. El tratamiento comenzó cuando los ratones tuvieron veintitrés meses de edad y finalizó cuando estos cumplieron los veintiséis-veintisiete meses de edad. La administración de la dieta cetogénica se realizó semana por medio (bloques rojos), intercalando con dieta control (bloques celestes), de acuerdo a lo reportado por (Newman et al., 2017). Se tomaron muestras de sangre a una muestra representativa de n=5 ratones controles y n=5 ratones tratados con dieta cetogénica cíclica (recuadros en gris). Las pruebas conductuales fueron llevadas a cabo en semanas control (recuadros en café oscuro). La colección de tejidos se realizó a los 26-27 meses de edad en semana control (recuadro café claro). CD, dieta control; KD, dieta cetogénica cíclica; BHB, β -hidroxibutirato; NOR, reconocimiento de objetos nuevos; EPM, laberinto elevado en cruz; Y-maze, laberinto en Y; Barnes maze, laberinto de Barnes; m, meses de edad.

El tratamiento con dieta cetogénica intermitente produjo un incremento significativo en la concentración de BHB en sangre de los ratones tratados (figura 9A, p-valor=0.0291). Las concentraciones de BHB variaron según la semana de tratamiento. En semana cetogénica alcanzó valores promedio de 2mM, mientras que en semanas controles el BHB promedió 0.4-0.5mM. La glicemia se mantuvo en rangos similares a los controles (figura 9B).

Cabe destacar que, debido a la avanzada edad de estos ratones, sólo fue posible tomar muestras de sangre durante las primeras seis semanas de tratamiento. No obstante, lo anterior, se midió la ingesta calórica y el peso corporal durante nueve semanas.

Es así como encontramos que el peso de los ratones tratados con la dieta cetogénica fue mayor al de los controles (p-valor=0,0014). Además, la ingesta calórica diaria por ratón (p-valor=0,001) también fue superior con respecto a los controles (figuras 9C y 9D respectivamente). El resumen de los parámetros metabólicos medidos semana a semana se visualiza en la figura suplementaria 2.

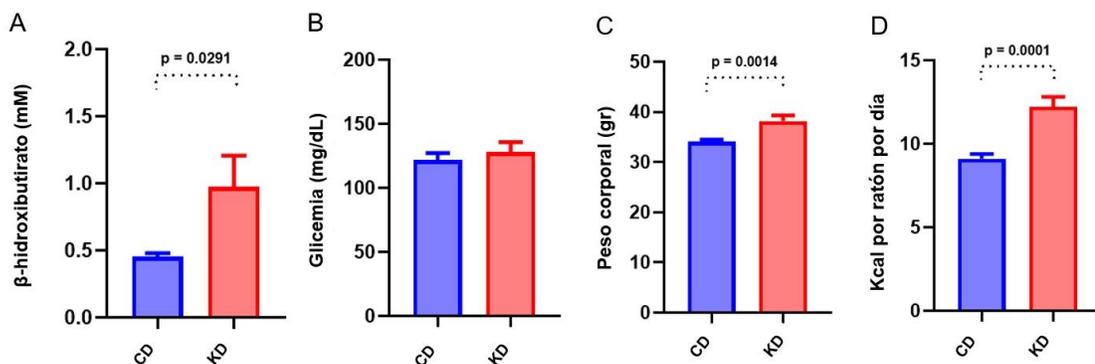


Figura 9. Parámetros metabólicos de ratones envejecidos tratados con KD cíclica por dieciséis semanas (D16). **A)** El tratamiento con dieta cetogénica cíclica produjo una elevación de los cuerpos cetónicos en sangre cercano a 1mM. **B)** No se observaron diferencias significativas en los niveles de glicemia en sangre. **C)** La ingesta de dieta cetogénica de forma cíclica provocó aumento de peso a lo largo del tratamiento. **D)** La ingesta calórica en los ratones tratados con la dieta cetogénica intermitente fue superior a la de los ratones sometidos a dieta control. Análisis estadístico t-student (p -value $<0,05$). Las barras representan el error estándar de la media (SEM). β -hidroxibutirato, BHB; CD, dieta control; KD, dieta cetogénica cíclica.

La KD cíclica administrada durante dieciséis semanas preserva significativamente la memoria de trabajo en ratones envejecidos cuando estos fueron analizados después de doce semanas de tratamiento.

A las 12 semanas de tratamiento, los animales fueron sometidos a diferentes pruebas para evaluar sus parámetros cognitivos y motores. La primera de ellas fue la prueba de campo abierto y de reconocimiento de objetos nuevos, sin

encontrar diferencias significativas entre ambos grupos (figura suplementaria 3). Tampoco observamos cambios en una prueba que evalúa ansiedad, conocida como la prueba de laberinto elevado en cruz. Esto señala que los ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica no sufrieron ningún tipo de estrés o ansiedad durante el tratamiento (figura 10A, 10B).

Interesantemente, la prueba de laberinto en Y que analiza la memoria de trabajo, determina la capacidad que tienen los ratones de recordar los brazos del laberinto que ya han recorrido en cortos periodos de tiempo. En esta prueba los ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica mostraron un desempeño notablemente superior a sus pares controles, dado por el porcentaje de alternaciones espontáneas, lo cual sugiere que la dieta cetogénica cíclica preserva funciones cognitivas asociadas a la corteza prefrontal (figura 10E).

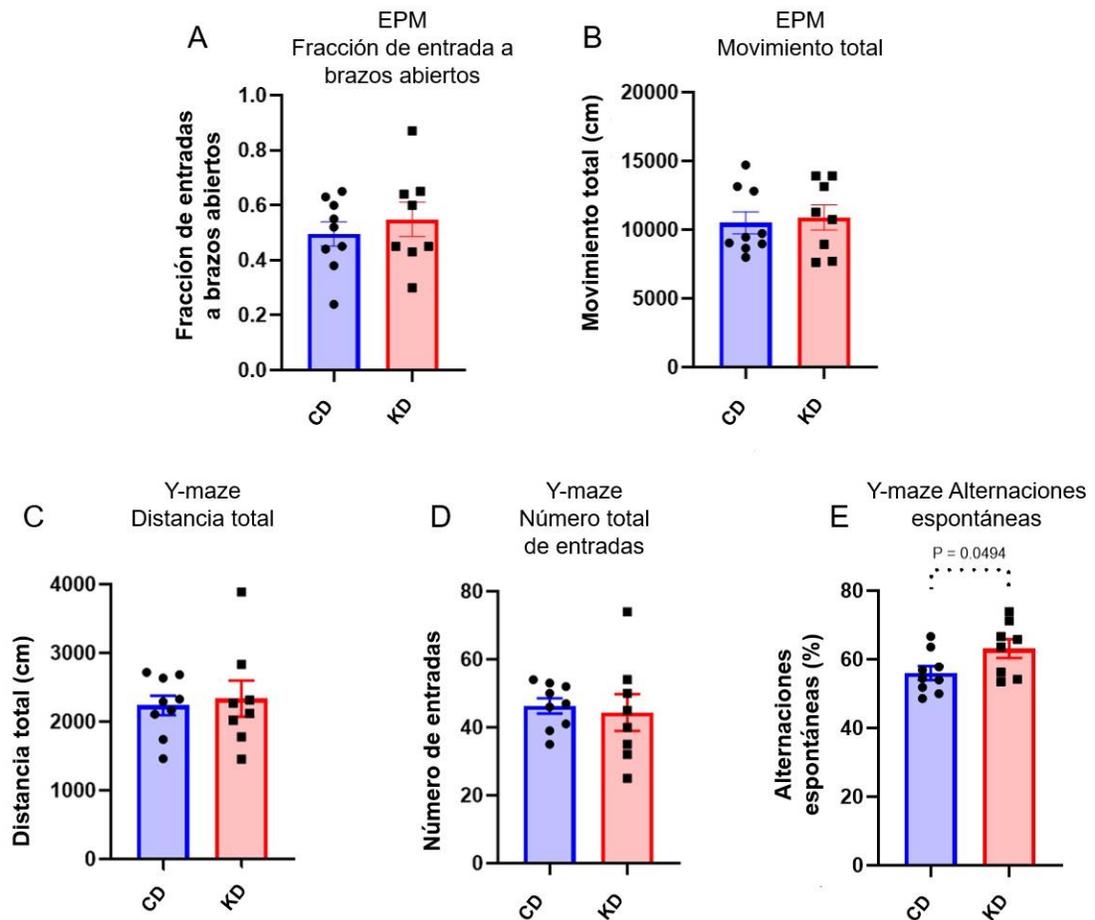


Figura 10. Ratones envejecidos tratados con KD cíclica no presentan ansiedad con el tratamiento y preservan la memoria de trabajo asociada a la función cortical después de doce semanas de tratamiento. A, B). Parámetros asociados a ansiedad de la prueba del laberinto elevado en cruz no evidenciaron diferencias entre ratones viejos controles y tratados con la dieta cetogénica intermitente. **C, D, E.** Memoria de trabajo y toma de decisiones son habilidades puestas a prueba en la prueba de laberinto Y, que muestra un evidente incremento en las alternaciones espontáneas de los ratones tratados con dieta cetogénica intermitente (N= 9, controles; N=8, cetogénicos). Análisis estadístico t-student (p-value <0,05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

Siguiendo con los análisis conductuales, no encontramos diferencias significativas en el laberinto de Barnes entre ambos grupos, a pesar de que los ratones tratados con la dieta cetogénica aprendieron más rápido la tarea durante los días de entrenamiento (figura 11A) y presentaron una menor latencia en la prueba realizada 12 días después del entrenamiento, que mide memoria a largo plazo (figura 11B, C). Esta tendencia fue corroborada cuando agrupamos por tratamientos la diferencia de tiempo que le toma a cada animal completar la tarea entre el día 5 y el día 12 (figura 11D, E).

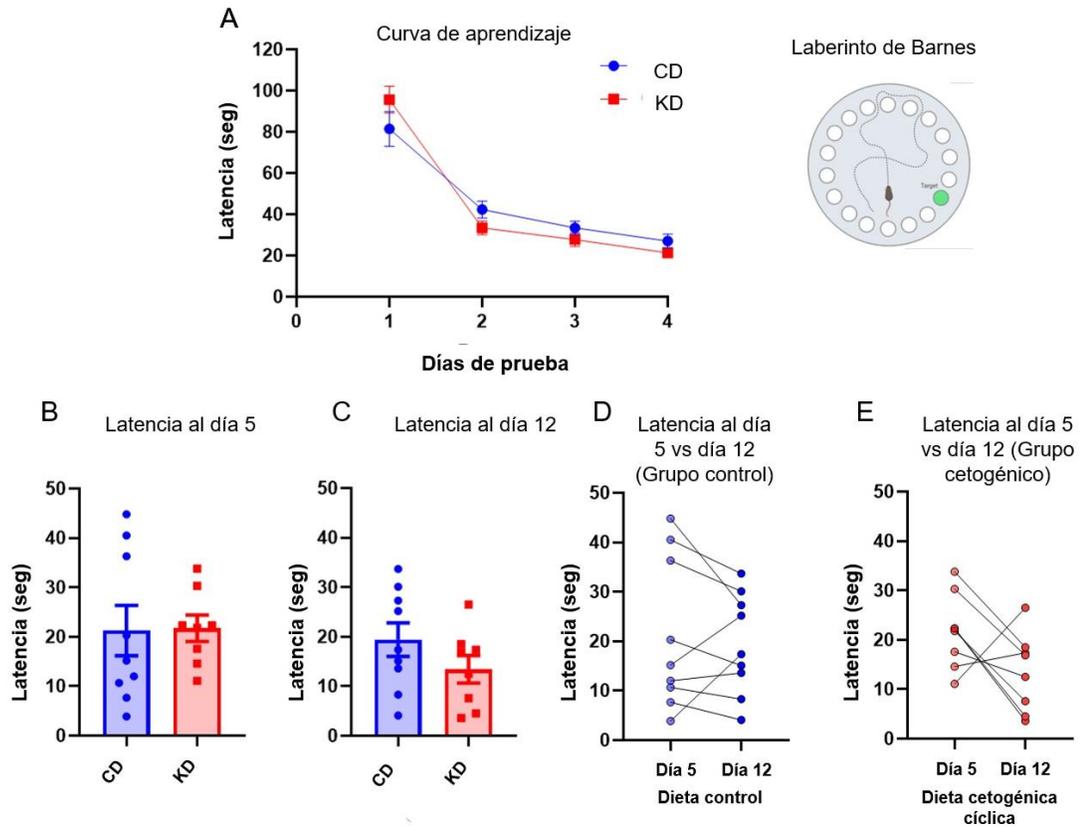


Figura 11. Ratones envejecidos muestran una tendencia a mejorar habilidad de memoria a largo plazo cuando son evaluados después de doce semanas de administración con KD cíclica. A) La prueba de Barnes consistió en cuatro días de entrenamiento donde los ratones colocados en una plataforma circular deben encontrar el orificio de salida en el menor tiempo posible, poniendo a prueba su orientación y memoria espacial. Durante el primer día de entrenamiento, ratones controles desarrollaron la tarea en un menor tiempo (latencia), sin embargo, en los días dos, tres y cuatro, los ratones tratados con dieta cetogénica cíclica completaron la tarea en menor tiempo. **B, C)** No hubo diferencias significativas en el primer día de prueba (día cinco), no obstante, en el día doce después de realizados los entrenamientos, los ratones tratados con dieta cetogénica cíclica muestran una tendencia a completar la tarea en menor tiempo. **D, E)** Esta tendencia se corrobora cuando se analizó el desempeño de

los animales agrupados por dieta. (N=9, controles; N=8, cetogénicos). Análisis estadístico t-student (p-value <0,05) y ANOVA de dos vías. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Latency, latencia o tiempo necesario para completar la tarea.

Con estos resultados, decidimos profundizar el análisis, incorporando en la caracterización de esta prueba, sólo a aquellos animales que fueron capaces de completar la tarea en un menor tiempo al comparar el día cinco vs el día doce. De esta forma excluimos del estudio a tres ratones controles y dos ratones tratados con dieta cetogénica, quienes no cumplían con este criterio. En este caso, las diferencias observadas fueron significativas (figura suplementaria 4).

Adicionalmente, incorporamos la prueba de rotarod que mide coordinación motora, balance y fatiga. En esta actividad, se evidencia una clara tendencia que indica que los ratones tratados con dieta cetogénica cíclica desarrollan más rápido la tarea asignada durante los primeros tres ensayos el día uno (figura 12A). Este rendimiento se corrobora el día dos, (día de prueba) en donde se observa que pasan más tiempo sostenidos en la barra del rotarod antes de caer (figura 12B).

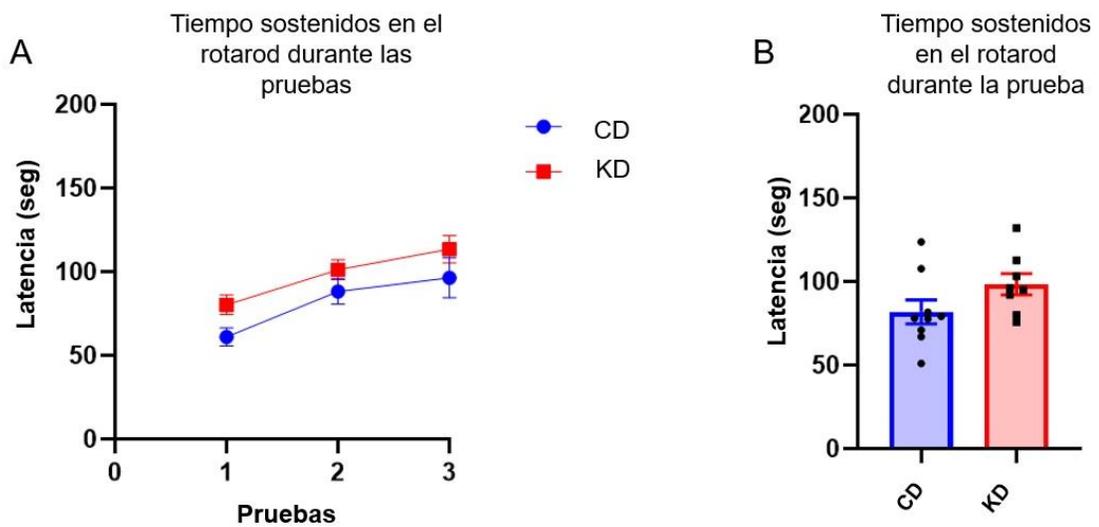


Figura 12. Ratones envejecidos tratados con KD cíclica tienden a preservar habilidades motoras después de doce semanas de tratamiento. A) Día uno de entrenamiento se evaluó la capacidad de los ratones envejecidos de permanecer sostenidos sobre la barra del rotarod a velocidad fija. Se observa que, desde la primera prueba, los ratones tratados con dieta cetogénica cíclica tienen a permanecer más tiempo sostenidos (latencia). **B)** Día dos (día de prueba), se evaluó el tiempo de permanencia en la barra a velocidades crecientes. Ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica tienden a permanecer en promedio más tiempo sostenidos en la barra que sus pares controles. Análisis estadístico t-student (p -valor $<0,05$). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

Neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza prefrontal de ratones envejecidos presentan mayor complejidad del árbol dendrítico después de dieciséis semanas de tratamiento con KD cíclica.

Al término de las pruebas conductuales, es decir, después de dieciséis semanas de tratamiento con dieta cetogénica cíclica y dieta control, se colectaron los cerebros para ser analizados mediante tinción Golgi.

Consistente con las observaciones obtenidas en las pruebas conductuales, los análisis de Sholl revelaron que las neuronas piramidales de corteza prefrontal de los ratones viejos tratados con dieta cetogénica cíclica presentaron mayor complejidad dendrítica evidenciado por un mayor número de intersecciones (16 intersecciones promedio, KD cíclica vs 11 intersecciones promedio, CD), (figura 13).

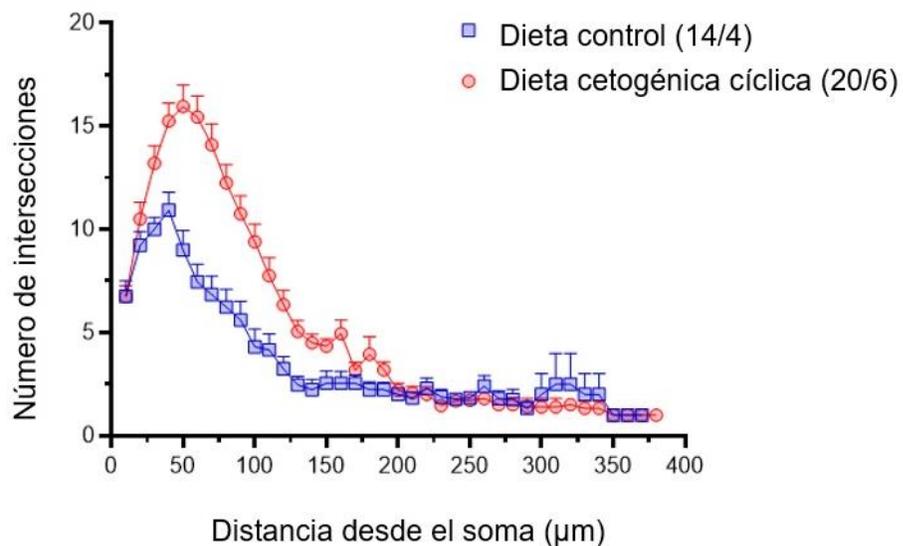


Figura 13. Neuronas piramidales de la corteza de ratones viejos tratados con KD cíclica desarrollaron mayor complejidad dendrítica que los controles, después de dieciséis semanas de tratamiento. Cortes coronales de ratones viejos de 26-27 meses de edad fueron obtenidos luego de las pruebas conductuales, para realizar una caracterización morfo estructural de la organización dendrítica. Se analizaron catorce neuronas provenientes de cuatro ratones controles y veinte neuronas provenientes de seis ratones tratados con KD cíclica. Como se observa en el gráfico, el mayor número de intersecciones se encontró en las primeras 100 micras de distancia desde el soma.

La KD cíclica promueve un aumento en la expresión de la subunidad catalítica de PKA y BDNF después de dieciséis semanas de tratamiento.

Luego de encontrar que la dieta cetogénica intermitente preserva ciertas habilidades cognitivas y motoras en ratones envejecidos, decidimos analizar la expresión de proteínas relacionadas con la función sináptica que nos permitan establecer un sustrato molecular que pudiera explicar en parte los cambios en las pruebas conductuales y motora. Para ello, tres ratones envejecidos controles y tratados con dieta cetogénica cíclica fueron sacrificados en semana control, sus cortezas prefrontales fueron removidas y se realizaron extractos de proteínas totales. Aquí nos enfocamos en proteínas que identificamos previamente en el análisis proteómico de la cohorte D52, esto con el fin de determinar si el tratamiento de dieciséis semanas recapitula los efectos de la administración a largo plazo.

Encontramos que la dieta cetogénica produjo un aumento significativo en los niveles de la subunidad catalítica β de PKA (Prkacb), mientras que se observó un aumento en la expresión de BDNF, aunque este no fue estadísticamente significativo (figura 14 A). Por otro lado, el tratamiento redujo significativamente los niveles de la subunidad del receptor AMPA Glua2. La abundancia relativa de estas proteínas fue cuantificada en las figuras 14 B, C, D.

De esta forma, los hallazgos encontrados se correlacionan parcialmente con lo reportado para la cohorte D52.

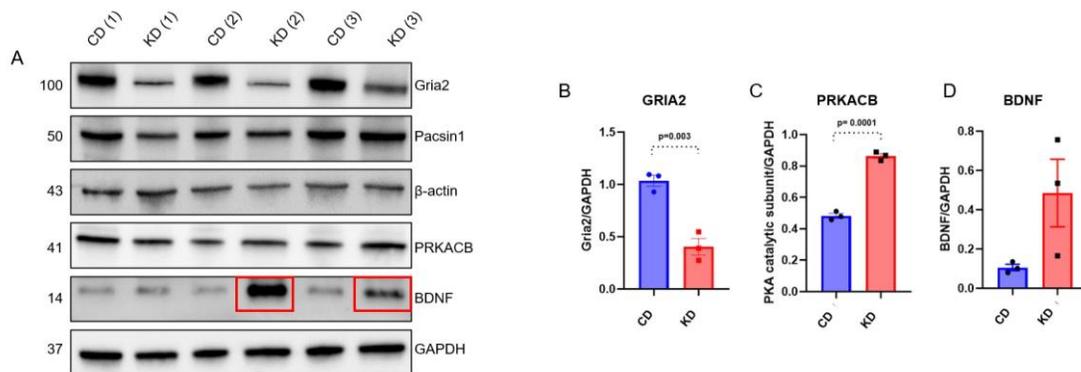


Figura 14. Análisis de proteínas asociadas a función sináptica en corteza de ratones envejecidos tratados con KD cíclica por dieciséis semanas. A). Western blot que representa las proteínas identificadas en las distintas condiciones experimentales y sus respectivos pesos moleculares. Se destaca el aumento en la expresión de BDNF (cuadro rojo). **B, C, y D).** Cuantificación relativa de la abundancia de las proteínas presentes en cada una de las muestras mediante el software ImageJ (n=3, controles; n=3, cetogénicos). Análisis estadístico t-student (p-value <0,05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Glua2, Glutamate receptor ionotropic, AMPA 2; PRKACB, Protein Kinase cAMP-Activated Catalytic Subunit Beta; BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor.

La KD cíclica aumenta la actividad de PKA en extractos de proteínas totales de PFC de ratones envejecidos después de dieciséis semanas de tratamiento.

En el análisis proteómico de la cohorte D52, encontramos que uno de los procesos biológicos que se activa con la dieta cetogénica es la vía de señalización mediada por AMP cíclico (AMPC) (ver figura 6. Allí observamos un incremento significativo en la expresión de la adenilato ciclasa 5 (Adcy5), así como también de la subunidad catalítica β de PKA (Prkacb). Este aumento en la expresión de la subunidad β de PKA lo pudimos corroborar esta vez *in vivo* en D16 a través de western blot.

En consecuencia, decidimos explorar en más detalle esta vía de señalización, investigando la activación de PKA mediante el análisis de los sustratos fosforilados por esta quinasa utilizando un anticuerpo que reconoce un sitio de consenso único de fosforilación, conformado por los aminoácidos RRXS*/T* (Muñoz-Llancao et al., 2017). Por lo tanto, todas aquellas proteínas que son fosforiladas por PKA en este sitio, son detectadas por el anticuerpo (observado como un patrón de bandeo en el western blot).

En este análisis seleccionamos 3 bandas entre las condiciones control y cetogénica que denominamos como banda 1, banda 2 y banda 3 ya que mostraron un cambio fácilmente identificable por inspección visual, y comparamos la abundancia relativa de las proteínas que tenían una movilidad

electroforética equivalente para ser comparadas entre las ambas condiciones. Encontramos que la dieta cetogénica efectivamente induce un aumento en la actividad de PKA evidenciado por un incremento significativo en los niveles de expresión de las proteínas de las bandas 2 (p-valor=0,0136) y 3 (p-valor=0,0436) con respecto a los controles (figura 15 A, B). Sin embargo, este aumento en la actividad de PKA probablemente ocurre de forma discreta, ya que al comparar el patrón de bandeo del carril completo por condición control vs cetogénica, este no alcanza a ser significativo (figura 15 C). No obstante lo anterior, existe una clara tendencia a una mayor inmunoreacción con el anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados por PKA en todos los pares de muestra control y cetogénica de las muestras estudiadas.

Siguiendo con la caracterización de esta vía de señalización, decidimos cuantificar los niveles de AMPc en las cortezas congeladas de los animales envejecidos a través de un ensayo colorimétrico. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de AMPc entre los controles y los tratados con la dieta cetogénica (figura 15 D).

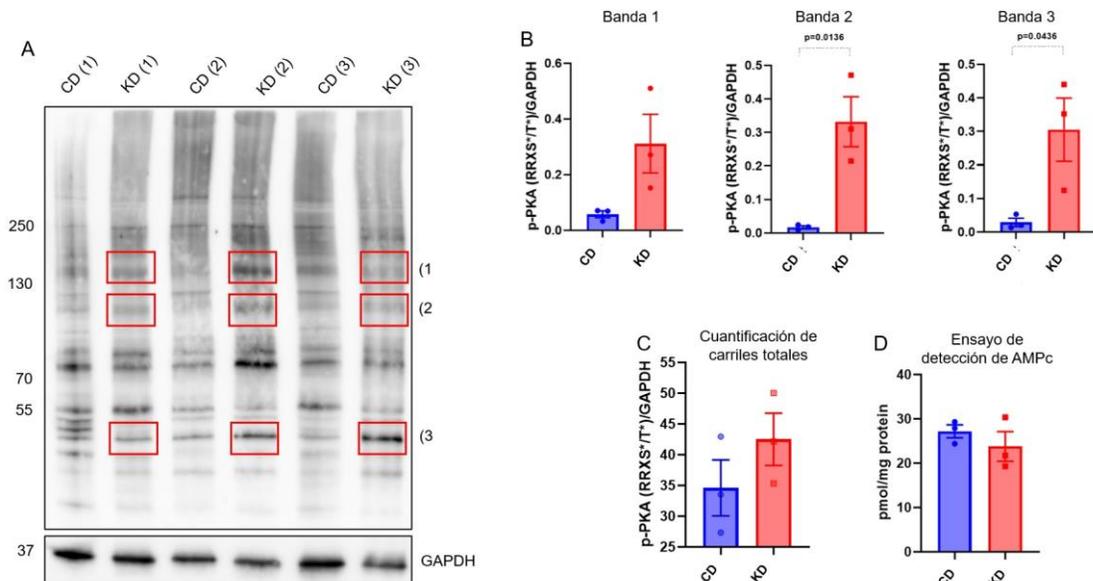


Figura 15. La KD cíclica indujo un aumento en la fosforilación de sustratos de PKA en la corteza de ratones envejecidos después de dieciséis semanas de tratamiento. A). Western blot donde se observan múltiples bandas que corresponden a las proteínas identificadas con el anticuerpo anti-p-PKA que reconoce todas las proteínas que son fosforiladas por la quinasa en el sitio de consenso RRXS*/T*. Las bandas 1, 2 y 3 (cuadros rojos), fueron cuantificadas para determinar su abundancia relativa. **B).** Abundancia relativa de las bandas 1, 2 y 3. **C).** Cuantificación de la abundancia relativa de todas las proteínas presentes en los carriles controles vs cetogénicos. **D).** Ensayo de Elisa para la detección de AMPc en los cerebros de los ratones controles y tratados con dieta cetogénica no evidenció diferencias significativas entre ambos tratamientos (N=3, controles; N=3, cetogénicos). Análisis estadístico t-student (p-value <0,05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

Para comprobar si la activación de PKA encontrada *in vivo* ocurre debido a una regulación mediada por la dieta cetogénica y específicamente por el BHB, decidimos realizar estudios *in vitro* cultivando células de neuroblastoma de ratón N2A con β -hidroxibutirato (BHB) 10mM a distintos tiempos. De esta manera, las

células fueron tratadas con vehículo o BHB por 24h, 6h, 30min y 10min, utilizando como control positivo forskolin, un conocido activador de la vía de AMPc.

Como se observa en la figura 16 A, BHB indujo un aumento en la actividad de PKA dado por el aumento en la expresión de sustratos fosforilados por esta quinasa (figuras 16 A, B).

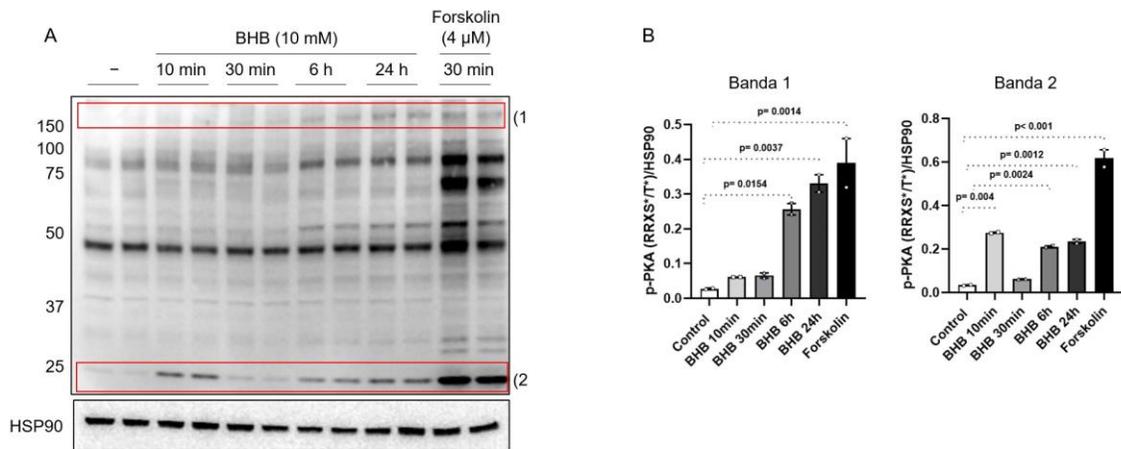


Figura 16. BHB induce un aumento de la actividad de PKA en células N2A.
A). Extractos de proteínas totales de células N2A tratadas con BHB 10mM a distintos tiempos utilizando el anticuerpo anti-p-PKA que reconoce todas las proteínas fosforiladas por esta quinasa en el sitio de consenso RRXS*/T*. Las bandas que fueron cuantificadas son identificadas con los números 1 y 2. (rectángulos rojos. **B).** Cuantificación de las bandas 1, y 2 muestran un incremento en la expresión de proteínas fosforiladas por PKA a distintos tiempos de tratamiento. Análisis estadístico t-student (p-valor <0,05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

Discusión

La KD administrada de forma cíclica regula predominantemente el compartimento presináptico de sinapsis corticales de ratones envejecidos a través del ciclo de vesículas sinápticas, citoesqueleto de actina y señalización mediada por AMPc.

En la permanente búsqueda de nuevas estrategias que permitan contrarrestar el deterioro del cerebro a medida que envejecemos, decidimos abordar los efectos de una intervención nutricional conocida como dieta cetogénica, la cual ha captado gran interés en el campo de la gerociencia durante la última década.

Estudios recientes en modelos murinos han demostrado de forma consistente que la KD cuando es administrada comenzando en etapa adulta (12-14 meses de edad), es capaz de preservar la memoria de estos animales cuando ya se encuentran en una etapa de avanzada edad (24-26 meses de edad), (Newman et al., 2017; Roberts et al., 2017). Estos hallazgos además de ser muy reveladores, al mismo tiempo plantean diversas interrogantes acerca de cuáles son los procesos biológicos y sustratos moleculares regulados por esta dieta que facilitan un adecuada función sináptica y a su vez favorecen la preservación de la memoria a nivel de la corteza cerebral durante la vejez. Por otro lado, se desconoce cómo es regulado el proteoma sináptico en función del tiempo de administración de esta dieta y cómo ocurren aquellos cambios necesarios para

sostener la actividad sináptica en condiciones óptimas en etapas avanzadas de edad.

Por lo tanto, para responder a estas interrogantes, decidimos evaluar el proteoma cortical sináptico de ratones envejecidos que previamente fueron tratados con dieta KD cíclica en distintos períodos de tiempo. La decisión de administrar dieta cetogénica cíclica fue clave en este proyecto, ya que como se había observado antes, la alternancia semanal de alimentación control-cetogénica favorece la adherencia al tratamiento, evita el sobrepeso en los animales a comparación de una dieta cetogénica administrada permanentemente y reduce el riesgo asociado de enfermedades crónicas vinculadas a este tipo de intervenciones (Newman et al., 2017).

Así es como desarrollamos un protocolo de preparación de sinaptosomas desde cortezas prefrontales de ratones envejecidos (24-26 meses), que fueron tratados con KD cíclica por una semana (D1), seis semanas (D6) y cincuenta y dos semanas (D52).

Gran parte de los estudios realizados en el campo de sinaptosomas, analizan estas fracciones subcelulares conteniendo el compartimento presináptico y postsináptico unidos. No obstante, dado que ambos componentes de las sinapsis son altamente especializados y cumplen funciones celulares complejas, decidimos separarlas obteniendo así una fracción enriquecida en un compartimento presináptico y otra en un compartimento postsináptico, lo cual

favorece un análisis más profundo de los cambios que la dieta cetogénica puede estar causando en esta estructura.

Las muestras fueron exitosamente fraccionadas como lo evidenció la identificación de marcadores presinápticos y postsinápticos por western blot (figura 2C.) Posteriormente llevamos a cabo una exhaustiva caracterización del proteoma cortical sináptico. Es ahí donde observamos que la dieta cetogénica cíclica administrada a corto plazo (1 semana), regula un reducido número de proteínas localizadas principalmente en el componente postsináptico (ver tabla 5). Entre las proteínas que más cambiaron en D1 encontramos algunas relacionadas con el crecimiento del cono dendrítico y regulación de la plasticidad sináptica neuronal (CLTC, clathrin heavy chain 1; Rab18, Grin2b, Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B). Adicionalmente, dentro de los procesos biológicos que más cambiaron encontramos la modulación de la transmisión de la sinapsis química y el ciclo de vesículas sinápticas.

Si bien, hay escasos reportes de tratamientos con dieta cetogénica por una semana en ratones, existe un estudio reciente de transcriptómica de célula única que señala que una semana de administración de dieta cetogénica es capaz de reducir la inflamación y activar la respuesta inmune innata en tejido adiposo de ratones de 1-4 meses de edad (Goldberg et al., 2020). Este hallazgo contrastado con lo evidenciado en el presente trabajo señala que la dieta cetogénica ejerce cambios tejido-específicos en los transcritos y proteínas del organismo, los cuales responden de manera diferencial a una semana de tratamiento y están

fuertemente influenciados por la edad en la cual éste se inicia. Por ende, dado que la proporción de proteínas sinápticas que cambia en D1 es reducido, la administración de la dieta cetogénica en cortos períodos de tiempo no es suficiente para producir cambios sustanciales en el cerebro y fundamentalmente en la función sináptica de ratones envejecidos.

Siguiendo con el análisis, identificamos que en períodos más largos de tratamiento la dieta cetogénica regula fundamentalmente el componente presináptico. Tal es el caso del proteoma de la cohorte D6, que experimentó aumentos significativos en la expresión de proteínas asociadas a mitocondria, tráfico de vesículas sinápticas y potenciación a largo plazo.

Dentro de las proteínas que más aumentaron, encontramos a Camk2a (Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha), Grin2a (Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A), Homer1 (Homer protein homolog 1), Cdh2 (Cadherin2) y Bsn (Bassoon), proteínas que cumplen un rol clave en la transmisión sináptica. Un estudio en neuronas corticales humanas obtenidas mediante resección quirúrgica reveló que existe un declive dependiente de la edad en la abundancia relativa de la subunidad Grin2a del receptor de NMDA en estas neuronas (Pegasiou et al., 2020), lo que va en la misma dirección de otros reportes que apuntan a que alteraciones en la composición de receptores sinápticos se asocian a deterioro cognitivo en modelos murinos y primates. Inclusive, una reducción en los niveles de Bsn se ha observado a nivel de la unión neuromuscular en ratas envejecidas (Nishimune et al., 2012). En este sentido,

nuestros resultados revelan que la dieta cetogénica administrada de forma cíclica por seis semanas es capaz de regular la expresión de componentes presinápticos y postsinápticos esenciales de las sinapsis tales como las subunidades de receptores NMDA y la quinasa Camk2a, la zona activa de liberación de neurotransmisores en el presináptico mediante Bassoon y estabilizando las conexiones sinápticas a través de uniones adherentes mediada por cadherinas de esta manera favoreciendo procesos tales como la fuerza sináptica y almacenamiento de memoria en ratones envejecidos.

Siguiendo con el análisis, para el caso de D52, encontramos que el proteoma presináptico fue el que más se modificó observando aumentos en la expresión de proteínas del componente presináptico y postsináptico relacionadas con la dinámica de actina (Rac1, Wasf3, G-Actin) y tráfico de vesículas sinápticas (Pacsin1, Myo5a, Pfn2, Slc32a1).

Rac1 es una proteína perteneciente a la familia de las Rho GTPasas pequeñas y cumple un rol fundamental en la organización de las espinas dendríticas en el componente postsináptico a través de la estabilización de filamentos de actina, mientras que en el presináptico Rac1 es capaz de mediar el “priming” y probabilidad de liberación de vesículas sinápticas estableciendo una barrera física entre éstas, F-actina y la zona activa (Keine et al., 2022). Un estudio en cerebros post mortem humanos de adultos mayores con enfermedad de Alzheimer evidenció una correlación directa entre un progreso del índice de Braak (que mide la severidad de la enfermedad en estos pacientes) y un declive en la

expresión de Rac1, lo cual estaría contribuyendo de manera importante al proceso de neurodegeneración (Kikuchi et al., 2020). Por otro lado, actina, dentro de los múltiples roles que desarrolla a nivel sináptico entre los que destaca la liberación del pool rápido de vesículas sinápticas y organización de las espinas dendríticas disminuye su abundancia relativa en fracciones de sinaptosomas derivados de cerebros de ratones viejos de 22 meses (Ve et al., 2020). Además, cabe destacar que Rac1 es capaz de reorganizar el citoesqueleto de actina favoreciendo su forma filamentosa (F-actina), (Moldovan et al., 1999), mientras que tratamientos con latrunculina A, droga que inhibe la polimerización de actina resultan en la dispersión de vesículas sinápticas (Zhang & Benson, 2001). Por tales razones, es plausible hipotetizar que la dieta cetogénica estimula la reorganización del citoesqueleto de actina favoreciendo su forma polimerizada o F-actina en las sinapsis, lo cual facilita el anclaje de las vesículas sinápticas a esta estructura a través de la activación de Rac1.

Esta hipótesis adquiere especial relevancia considerando que los análisis bioinformáticos del proteoma sináptico cortical a través de ontología génica (Gene Ontology, en inglés) arrojaron de forma consistente el término “vesículas sinápticas”, el cual se ve representado en las tres cohortes caracterizadas por las bases de datos. Es más, este proceso biológico llama particularmente la atención al ser contrastado con los antecedentes presentados por Van Guilder y colaboradores que en 2010 a través de proteómica de sinaptosomas

hipocampales de ratas de 26 meses hallaron una disminución en la expresión de las proteínas β -actina, Pacsin1 y Clatrina (Van Guilder et al. 2010).

En cuanto a cambios sustanciales en la expresión de proteínas sinápticas, tanto en D6 como en D52 la adenilato ciclasa 5 (ADCY5) es la proteína que más cambió sus niveles de expresión con el tratamiento. En D6 disminuyó, mientras que en D52 aumentó significativamente junto a la subunidad catalítica β de la proteína quinasa A (PRKACB). La sobreexpresión de ambas proteínas sumado a la vía de señalización mediada por AMPc que fueron uno de los procesos biológicos más representados en D52, lo que finalmente nos llevó a profundizar estudios en esta vía de señalización y sus implicancias en la función sináptica que discutiremos más adelante.

El proteoma cortical sináptico cambia de forma dinámica en respuesta a la reprogramación metabólica inducida por la alternancia semanal de la administración de CD y KD.

Dentro del presente estudio es relevante mencionar que las cortezas de D6 fueron extraídas en una semana cetogénica, período en el cual el cerebro y en especial las neuronas utilizan cuerpos cetónicos como fuente de energía, los cuales son metabolizados a Acetil CoA e incorporados al ciclo de Krebs en la mitocondria para generar ATP. Mientras que para el caso de D52, las cortezas fueron procesadas en una semana de dieta control, semana en la cual las

neuronas utilizan carbohidratos predominando la actividad glicolítica para la generación de energía.

Esta reprogramación metabólica influenciada por la alternancia semanal de dieta control y dieta cetogénica se vio reflejada en nuestros datos con un aumento en la expresión de proteínas mitocondriales en D6. Por el contrario, para el caso de D52 la expresión de proteínas mitocondriales específicamente de los complejos I, III y ATP sintasa de la cadena transportadora de electrones fue baja en el grupo tratado con dieta cetogénica en comparación al grupo control. Estos hallazgos revelan que los cambios que experimenta el proteoma sináptico cortical asociado al metabolismo energético son altamente dinámicos y dependientes de la fuente de energía que las neuronas estén utilizando, ya sea en una semana cetogénica en donde predomina la fosforilación oxidativa (D6) o en una semana control donde se estimula la glicólisis (D52).

Con respecto a la función mitocondrial durante el envejecimiento se ha reportado tanto en estudios proteómicos como transcriptómicos un incremento en la actividad de la cadena transportadora de electrones, probablemente como un mecanismo compensatorio en respuesta a la baja disponibilidad de ATP celular (Hamezah et al., 2018; Manczak et al., 2005). Por lo tanto, con nuestros antecedentes es posible hipotetizar que la dieta cetogénica cíclica sostiene el metabolismo de las sinapsis corticales durante el envejecimiento proporcionando la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones, alternando de forma

eficiente la actividad glicolítica en semana control, y oxidativa en semana cetogénica, evitando así una sobrecarga de la función mitocondrial.

El deterioro de la función mitocondrial es un rasgo característico durante el envejecimiento, lo cual conduce a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo. En el proteoma presináptico de D52 identificamos un aumento en la expresión de proteínas que regulan ROS (MIF, SOD2, PRDX1, 4, y 6) lo cual es relevante de destacar ya que da cuenta del control de la homeostasis redox que el BHB está ejerciendo. En efecto, el BHB ha sido ampliamente descrito como una molécula de respuesta al estrés capaz de orquestar programas de defensa antioxidante y mantener la homeostasis redox (Haces et al., 2008; Maalouf et al., 2007).

La administración de KD cíclica induce un aumento en la concentración de BHB en sangre y preserva la memoria de trabajo asociada a la corteza prefrontal en ratones envejecidos después de doce semanas de tratamiento.

Para analizar en más detalle los mecanismos moleculares que rigen los cambios a nivel cognitivo en los ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica en los estudios previamente reportados, decidimos basarnos tanto en nuestros antecedentes proteómicos obtenidos como en una búsqueda bibliográfica a modo de establecer un protocolo de administración de dieta cetogénica cíclica que nos permita indagar aquellos aspectos relevantes mediante aproximaciones

experimentales en el laboratorio. De esta forma, aplicamos un tratamiento de dieta control y cetogénica a ratones envejecidos de veintitrés meses de edad con una extensión total de dieciséis semanas. Durante las primeras doce semanas de tratamiento se midieron parámetros metabólicos en sangre, como la glicemia y el BHB y al término de la semana doce se iniciaron pruebas conductuales, las cuales sólo fueron ejecutadas en semana control, esto con el fin de ver si los efectos que observamos a nivel cognitivo se debían específicamente a un efecto acumulativo en el tiempo de BHB en el cerebro y no a un incremento agudo de BHB dado exclusivamente por hacer el estudio en una semana cetogénica.

Como se esperaba, el tratamiento indujo un aumento en la concentración de BHB en sangre en un 113% respecto de los controles, mientras que la glicemia se mantuvo similar entre ambos grupos. La dieta cetogénica utilizada en este estudio no contiene carbohidratos (90% grasa, 10% proteínas) por lo tanto se esperaba una reducción en los niveles de glucosa en sangre ya que esta dieta incluso se ha recomendado utilizar pacientes con diabetes tipo 2 (Z. Yang et al., 2021). A pesar de lo anterior, no es poco frecuente encontrar niveles equivalentes de glicemia entre animales controles y tratados con esta dieta. Una posible explicación de aquello, es que la dieta cetogénica estimula la gluconeogénesis y aumenta la sensibilidad a insulina (Z. Yang et al., 2021), evidenciado por un aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT1 en células endoteliales del cerebro de ratas que fueron tratadas con dieta cetogénica por 6 semanas (Leino et al., 2001). En ese sentido nuestro hallazgo cobra más

relevancia considerando que la dieta que aplicamos cicla semanalmente entre presencia/ausencia de carbohidratos, lo cual permitiría utilizar la glucosa de forma más eficiente en las semanas control, manteniendo los niveles de glucosa en concentraciones normales en estos ratones envejecidos.

Luego de las doce semanas de tratamiento, los animales fueron sometidos a diferentes tareas cognitivas y motoras tales como el laberinto elevado en cruz, laberinto en Y, laberinto de Barnes y Rotarod. Interesantemente, en la prueba de laberinto en Y los ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica intermitente preservaron la memoria de trabajo espacial a corto plazo, lo cual fue evidenciado por un mayor número de alternaciones espontáneas respecto a sus pares controles. Esta prueba requiere la interacción de varias regiones del cerebro como el hipocampo y la corteza, pero principalmente la corteza prefrontal, la cual se ve normalmente comprometida en animales envejecidos que han sido sometidos a este test (Li et al., 2020). Un trabajo reciente analizó distintas regiones del cerebro en personas entre 60-80 años de edad utilizando resonancia magnética, encontrando que el giro dentado del hipocampo es una de las regiones más vulnerables al envejecimiento, mientras que la corteza entorrinal aparece como la región más resistente (Feng et al., 2020). Este hallazgo sugiere que la dieta cetogénica intermitente podría rescatar el funcionamiento de aquellas regiones del cerebro que se ven parcialmente comprometidas por el paso de la edad como la corteza prefrontal, a diferencia de aquellas que presentan problemas más severos como el hipocampo.

A pesar de que cuando los ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica fueron sometidos a la prueba del laberinto de Barnes no presentaron diferencias significativas en su desempeño cognitivo en comparación a los controles, evidentemente sí mostraron una clara tendencia a preservar la memoria a largo plazo, sobre todo cuando fueron puestos a prueba doce días después de haber completado el período de entrenamiento, concluyendo la tarea en un menor tiempo (figura 10). Si bien las diferencias que encontramos entre ambos grupos no fueron más marcadas, podemos especular que esto se debe a que la prueba del laberinto de Barnes desafía diferentes áreas del cerebro las cuales ya se encontraban comprometidas en su funcionalidad antes de comenzar con la dieta cetogénica y éstas no pudieron ser revertidas con doce semanas de tratamiento de dieta cetogénica.

Siguiendo la misma línea, la prueba de Rotarod evidenció una mayor coordinación motora de las extremidades por parte de los animales tratados con dieta cetogénica. Aunque esta diferencia no fue significativa, pudimos confirmar que la dieta cetogénica efectivamente confiere una mejora notable en las habilidades motoras en una cohorte de ratones adultos de 16 meses (datos no mostrados).

La mejora en habilidades cognitivas de ratones envejecidos tratados con KD cíclica es acompañada de un cambio en la organización morfo estructural de neuronas piramidales de la corteza prefrontal, dada por una mayor complejidad del árbol dendrítico.

Una vez completadas las actividades conductuales que evidenciaron una mejora en la memoria de trabajo asociada a la corteza en ratones tratados con KD cíclica, decidimos coleccionar los cerebros para analizar la morfología de las neuronas piramidales corticales mediante tinción Golgi (Pannesse, 1999).

Estudios previos de caracterización estructural de neuronas de la corteza prefrontal realizados en ratas Wistar de dieciocho-veinte meses arrojaron una disminución significativa en la complejidad dendrítica con la edad, lo cual fue acompañado por una conducta asociada a ansiedad (Sotoudeh et al., 2020). En otro trabajo llevado a cabo en ratas de distintas edades se buscó estudiar plasticidad esta vez de espinas dendríticas inducido por estrés en la corteza prefrontal. Los resultados indicaron que ratas jóvenes experimentaron un gran cambio morfológico en espinas y dendritas inducido por estrés, sin embargo los ratones viejos no presentaron modificaciones en su organización estructural, lo cual pone de manifiesto la escasa capacidad de remodelación y reorganización de las neuronas en esta región del cerebro a edades avanzadas (Bloss et al., 2011).

Sorprendentemente, nuestros datos apuntan a que las neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza prefrontal de ratones viejos tratados con dieta cetogénica cíclica manifiestan cambios importantes a nivel morfológico que no se observan en individuos tratados con dieta control. Este hallazgo adquiere gran valor, considerando que no existen reportes que demuestren plasticidad neuronal en estadios tan avanzados de edad como los ratones de veintiséis-veintisiete meses utilizados en este trabajo.

Es evidente atribuir a los cuerpos cetónicos generados como consecuencia del tratamiento de dieciséis semanas con KD cíclica como principales responsables de los efectos moleculares que llevan a esta reorganización estructural que favorece el establecimiento de nuevas conexiones sinápticas y mejoras cognitivas, lo cual podría estar mediado por el citoesqueleto de actina y microtúbulos, procesos biológicos que emergen de los estudios bioinformáticos con cambios significativos en respuesta a la KD y que se sabe, cumplen un rol clave en este tipo de fenómenos.

La KD cíclica promueve la activación de la proteína quinasa A (PKA) y estimula la producción de BDNF *in vivo* en la corteza de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica durante 16 semanas.

Después de la caracterización conductual en donde encontramos que la dieta cetogénica preserva la memoria de trabajo de ratones envejecidos, nos

planteamos investigar en mayor profundidad cuáles son los mecanismos moleculares que podrían explicar estos cambios a nivel sináptico. Para ello, preparamos extractos de proteínas totales de corteza prefrontal de tres ratones tratados con dieta control y tres ratones tratados con dieta cetogénica cíclica que previamente fueron evaluados en las pruebas conductuales. Estos animales completaron dieciséis meses de tratamiento siendo sacrificados a una edad aproximada de veintiséis-veintisiete meses.

El perfil proteómico obtenido a través de diferentes herramientas bioinformáticas arrojó que la vía de señalización mediada por AMPc es un proceso biológico altamente regulado por la dieta cetogénica en las sinapsis corticales de ratones envejecidos (figura 5). Por lo tanto, a través de western blot utilizamos anticuerpos dirigidos contra proteínas que forman parte de esta vía de señalización. Es así como encontramos un aumento significativo en la expresión de la subunidad catalítica de PKA en la condición cetogénica, mientras que existió un aumento dramático de BDNF, en dos de tres muestras analizadas. El hecho que la tercera muestra no presentara un aumento consistente en la cantidad de BDNF provocó que, en su conjunto, las diferencias analizadas entre la condición control y el tratamiento con la dieta cetogénica no fuese estadísticamente significativo. No obstante, pensamos que con un número mayor de animales esta diferencia debería ser robusta. El BDNF es un factor neurotrófico que incrementa su expresión como consecuencia de la activación de la vía de señalización mediada por AMPc/PKA (Zhong et al., 2018). Para corroborar si efectivamente la

dieta cetogénica cíclica activa PKA, analizamos su actividad quinasa en extractos de proteínas totales de corteza prefrontal utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente un sitio único de fosforilación por esta proteína (RRXS*/T*). De esta manera, todos aquellos sustratos que hayan sido fosforilados en serina/treonina por PKA serán detectados en el western blot. Notablemente, encontramos un aumento en la expresión de algunas proteínas en este sitio de consenso en la condición cetogénica (figura 14), lo que da cuenta de la activación de esta quinasa en respuesta a la dieta cetogénica y adicionalmente corrobora lo encontrado en el análisis *in silico* del proteoma cortical sináptico.

La vía de señalización AMPc-PKA es fundamental para el establecimiento de las sinapsis ya que entre otros efectos, conduce a la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), un importante factor de transcripción involucrado con la activación de genes que participan en la formación de memoria a largo plazo (Deisseroth et al., 1996).

Con respecto a los niveles de AMPc durante el envejecimiento existen resultados controversiales. Mientras algunas investigaciones señalan que esta vía se encontraría desinhibida en la corteza prefrontal, afectando la memoria de trabajo en ratones envejecidos (Ramos et al., 2003; Vandesquille et al., 2013), otras investigaciones sugieren que el AMPc disminuye en la corteza prefrontal durante el envejecimiento (Hara et al., 1992; Puri, 1981; Wruck & Adjaye, 2020; Zimmerman & Berg, 1974). A partir de estos hallazgos que aparentemente son antagónicos, encontrar un balance en la producción y degradación de AMPc

parece ser el escenario idóneo para una adecuada señalización de esta vía en las sinapsis corticales.

Nuestros resultados van en línea de este último escenario, en donde la dieta cetogénica es capaz de restaurar niveles bajos de AMPc en la corteza prefrontal, activando PKA y la vía de señalización río abajo que conduciría a un aumento de BDNF. Pero al mismo tiempo, el aumento de AMPc estaría estrictamente regulado por un incremento en la expresión de fosfodiesterasas PDE1B y PDE10A que se encuentran sobre expresadas en el proteoma de D52 y que probablemente aumentan en la condición cetogénica después de dieciséis semanas de tratamiento. De la misma forma, en el análisis de western blot de sustratos fosforilados por PKA no observamos un incremento desregulado en la condición cetogénica y tampoco una diferencia significativa en la concentración de AMPc en cerebros de ratones viejos tratados con dieta cetogénica cíclica durante dieciséis semanas.

Es interesante señalar que la actividad de PKA juega un rol crítico en la plasticidad sináptica y memoria participando en el tráfico y liberación de vesículas sinápticas (Havekes et al., 2012; Park et al., 2014), siendo este precisamente un proceso biológico que emerge de forma consistente en la caracterización del perfil proteómico cortical de las tres cohortes de ratones envejecidos tratados con dieta cetogénica cíclica. De hecho un estudio reciente en neuronas humanas señala que la elevación de AMPc activa a PKA, el cual a su vez fosforila a la proteína synapsin 1, favoreciendo de esta manera la liberación de vesículas

sinápticas (Patzke et al., 2019). Además, la localización de PKA en el compartimento presináptico es clave para el normal funcionamiento de liberación de vesículas sinápticas ya que la inhibición farmacológica de proteínas de anclaje de PKA (AKAPs) reduce el pool de liberación rápida de vesículas y disminuye los niveles de SV2 (Park et al., 2014).

Interesantemente, estos datos apuntan a que una posibilidad de regulación inducida por la dieta cetogénica no esté relacionada con la inducción en cambios en la abundancia relativa de proteínas, que es lo abordado en esta tesis, sino en las modificaciones postraduccionales que afecten las funciones del proteoma sináptico. Además la vía de señalización AMPc/PKA se ha vinculado al citoesqueleto de actina, en donde se postula que PKA fosforila a Limk, una quinasa que a su vez fosforila a Cofilina, proteína que en su estado fosforilado lleva a la estabilización de los filamentos de actina (Nadella et al., 2009; Shabb, 2001).

Estudios posteriores centrados en estudiar el rol de PKA en respuesta a la dieta cetogénica en sinapsis corticales y su vínculo con el citoesqueleto de actina podrían ayudar a dilucidar en mayor detalle el rol de estas proteínas en los procesos biológicos identificados con este tipo de intervenciones, que contribuyen a preservar la función sináptica y memoria durante el envejecimiento.

Conclusiones

Como conclusiones de este trabajo podemos señalar lo siguiente:

Objetivo 1:

- Fue posible enriquecer fracciones subcelulares del cerebro de ratones envejecidos tratados con CD y KD cíclica en componentes presinápticos y postsinápticos para determinar cambios en el proteoma en respuesta a estas intervenciones nutricionales.

Objetivo 2:

- Una detallada caracterización del proteoma cortical presináptico y postsináptico de las cohortes analizadas, indica que, a tiempos cortos de administración, la dieta cetogénica cíclica regula el componente postsináptico.
- A tiempos prolongados de tratamiento la dieta cetogénica cíclica regula fundamentalmente el componente presináptico ejerciendo un efecto en el metabolismo oxidativo, ciclo de vesículas sinápticas, vía de señalización mediada por AMPc y citoesqueleto de actina.

Objetivo 3:

- Los hallazgos obtenidos en el análisis bioinformático fueron estudiados con mayor detalle en una cohorte de ratones envejecidos tratados con KD cíclica por dieciséis semanas. Estos animales preservaron la memoria de

trabajo con el tratamiento después de doce semanas. La preservación de la memoria de trabajo se correlacionó con una mayor complejidad del árbol dendrítico, lo cual sugiere fenómenos de plasticidad sináptica en el cerebro a edades avanzadas.

- Se demuestra por primera vez mediante estudios *in vivo* que los ratones tratados con dieta cetogénica cíclica presentan un aumento en la expresión de la subunidad catalítica de PKA y sustratos fosforilados por esta quinasa en respuesta a este tipo de intervenciones nutricionales. El hallazgo de la activación de esta vía de señalización permite ofrecer una posible explicación de los mecanismos moleculares que están implicados en las mejoras cognitivas de la corteza en ratones envejecidos.
- El desarrollo de futuros experimentos tales como una detallada caracterización de la actividad de PKA, la utilización de sensores de AMPc y el estudio del tráfico de vesículas sinápticas *in vitro* podrán entregarnos mayor información del rol que la KD y específicamente el BHB estarían cumpliendo en preservar la conectividad neuronal durante el envejecimiento.

Figuras suplementarias

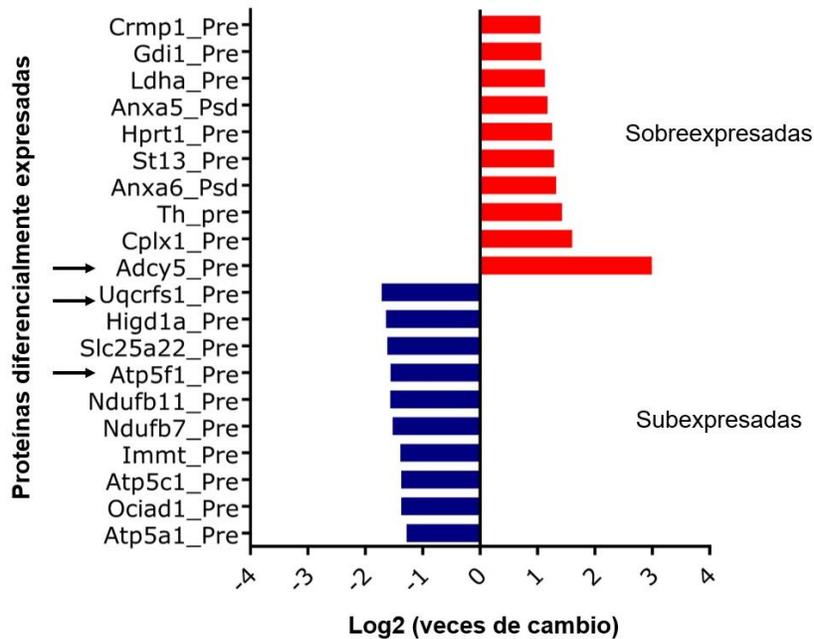
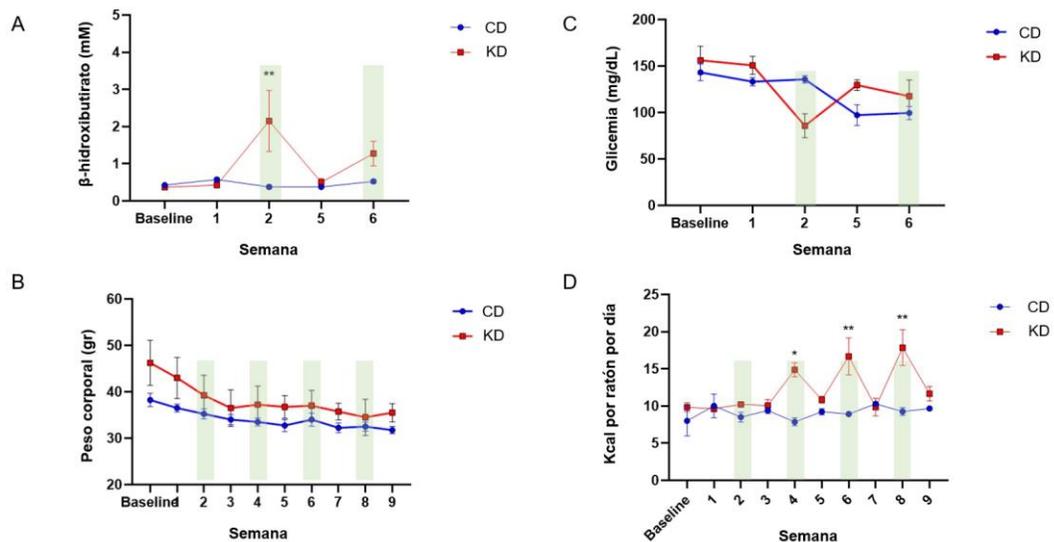
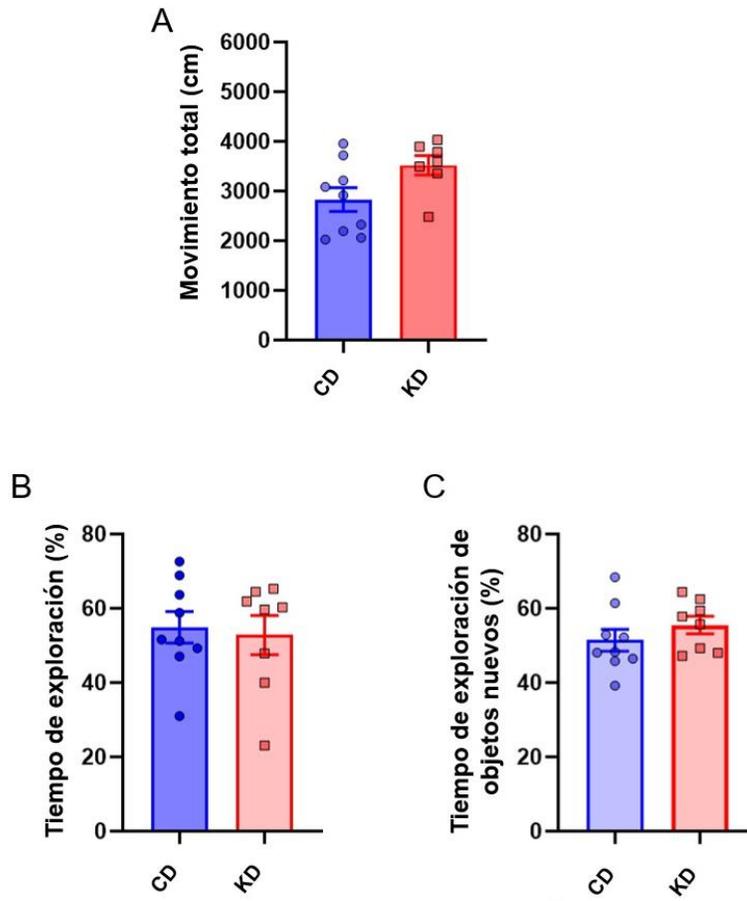


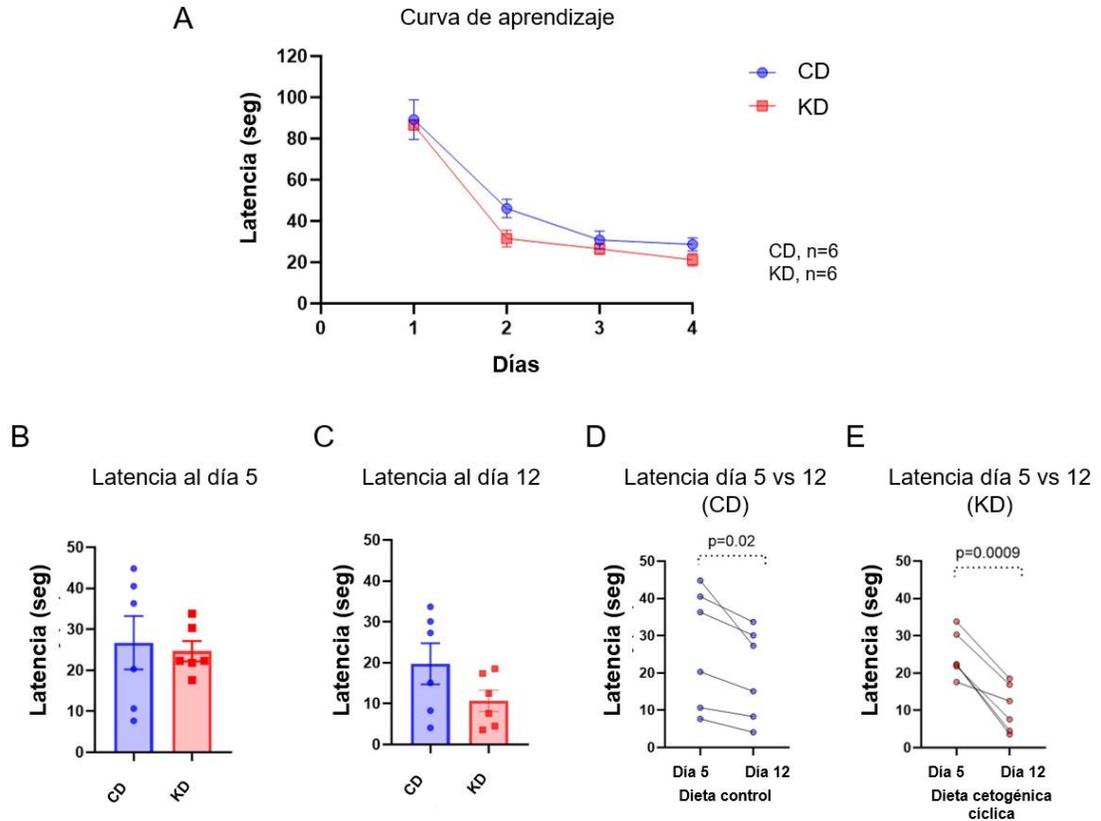
Figura S1. La KD cíclica administrada durante cincuenta y dos semanas produce una reducción en la expresión de proteínas mitocondriales en sinapsis corticales de cerebros de ratones envejecidos analizados en semana control. Se estableció una clasificación de las diez proteínas que más aumentaron su expresión (barras rojas) y las que más disminuyeron su expresión (barras azules) con el tratamiento de dieta cetogénica cíclica. Entre las proteínas que bajaron sus niveles de expresión destacan varias proteínas que forman parte de los complejos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (eje Y, flechas negras). También destaca la adenilato ciclasa 5, Adcy5 como una de las proteínas que más aumentó sus niveles de expresión en respuesta al tratamiento. (Razón de cambio > 1.5, q-valor <0.05).



FS2. La KD cíclica induce un aumento en la concentración de BHB en sangre de ratones envejecidos después de 12 semanas de tratamiento. A). Se observa la concentración de BHB a lo largo de las semanas (barras en verde indican semana cetogénica). **B).** Glicemia en sangre a lo largo de las semanas (barras en verde indican semana cetogénica). **C).** Peso corporal de los ratones a lo largo del tratamiento (barras verdes indican semana cetogénica). **D).** Ingesta calórica promedio semanal consumida por cada ratón a lo largo del tratamiento (barras en verde indican semana cetogénica). Análisis estadístico t-student (p -valor <0.05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).



FS3. Ratones envejecidos tratados con KD cíclica no evidenciaron diferencias significativas en las pruebas de campo abierto y de reconocimiento de objetos nuevos. A). Prueba de campo abierto que registró la distancia total recorrida entre ambos grupos. **B).** Tiempo que pasaron los ratones envejecidos explorando los objetos con los cuales se familiarizaron el primer día de entrenamiento. **C).** Tiempo de exploración del objeto nuevo con el que fueron puestos a prueba los ratones envejecidos de ambos grupos. Análisis estadístico t-student (p-valor <0.05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).



FS4. Análisis post-hoc de la prueba del laberinto de Barnes de ratones envejecidos tratados con CD y KD cíclica muestra diferencias significativas en las pruebas que evalúan memoria a largo plazo. A). La curva de aprendizaje realizada durante los primeros cuatro días de prueba muestra una tendencia en los ratones tratados con dieta cetogénica cíclica a completar la tarea en un menor tiempo al comparar con los controles. **B), C).** Latencia en completar la tarea el día cinco y día doce después de los primeros cuatro días de entrenamiento no evidenció diferencias significativas entre ambos grupos. **D), E).** Al comparar el desempeño de cada ratón de forma individual entre los días cinco y doce, encontramos diferencias significativas en el tiempo que requieren para completar la tarea. Análisis estadístico t-student (p -valor <0.05). Las barras representan el error estándar de la media (SEM).

Referencias

- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Bach, M. E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y. F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R. D., & Kandel, E. R. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5280–5285. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5280>
- Bai, F., & Witzmann, F. A. (2007). *Synaptosomes proteomics*. 77–98.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pagès, F., Trajanoski, Z., & Galon, J. (2009). ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529–535. <https://doi.org/10.1038/nature08983>
- Bloss, E. B., Janssen, W. G., Ohm, D. T., Yuk, F. J., Wadsworth, S., Saardi, K. M., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2011). Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7831–7839. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0839-11.2011>
- Bobkova, N. V., Evgen'ev, M., Garbuz, D. G., Kulikov, A. M., Morozov, A., Samokhin, A., Velmeshev, D., Medvinskaya, N., Nesterova, I., Pollock, A., &

- Nudler, E. (2015). Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 16006–16011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516131112>
- Buonomano, D. V., & Merzenich, M. M. (1998). Cortical plasticity: From synapses to maps. *Annual Review of Neuroscience*, 21, 149–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.149>
- Chen, J. J., Rosas, H. D., & Salat, D. H. (2011). Age-associated reductions in cerebral blood flow are independent from regional atrophy. *NeuroImage*, 55(2), 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.12.032>
- Chew, J., Gendron, T. F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Castanedes-casey, M., Lee, C. W., Jansen-west, K., Kurti, A., Murray, M. E., Bieniek, K. F., Bauer, P. O., Whitelaw, E. C., Stankowski, J. N., Stetler, C., Daugherty, L. M., Emilie, A., Desaro, P., Johnston, A., Overstreet, K., ... Petrucelli, L. (2015). *C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits*. 348(6239), 1151–1154. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9344.C9ORF72>
- Christensen, D. G., Meyer, J. G., Baumgartner, J. T., D'Souza, A. K., Nelson, W. C., Payne, S. H., Kuhn, M. L., Schilling, B., & Wolfe, A. J. (2018). Identification of novel protein lysine acetyltransferases in *Escherichia coli*. *BioRxiv*, 9(5), 1–24. <https://doi.org/10.1101/408930>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Collins, B. C., Hunter, C. L., Liu, Y., Schilling, B., Rosenberger, G., Bader, S. L., Chan, D. W., Gibson, B. W., Gingras, A. C., Held, J. M., Hirayama-Kurogi, M., Hou, G., Krisp, C., Larsen, B., Lin, L., Liu, S., Molloy, M. P., Moritz, R. L., Ohtsuki, S., ... Aebersold, R. (2017). Multi-laboratory assessment of

- reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00249-5>
- Deacon, R. M. J. (2013). Measuring motor coordination in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 75, 1–8. <https://doi.org/10.3791/2609>
- Deisseroth, K., Bitto, H., & Tsien, R. W. (1996). Signaling from synapse to nucleus: Postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 16(1), 89–101. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80026-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80026-4)
- Dosemeci, A., Tao-Cheng, J. H., Vinade, L., & Jaffe, H. (2006). Preparation of postsynaptic density fraction from hippocampal slices and proteomic analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(2), 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.069>
- Evans, C. G., Wisén, S., & Gestwicki, J. E. (2006). Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid β -(1-42) aggregation in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33182–33191. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606192200>
- Feng, X., Guo, J., Sigmon, H. C., Sloan, R. P., Brickman, A. M., Provenzano, F. A., & Small, S. A. (2020). Brain regions vulnerable and resistant to aging without Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 15(7 July), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234255>
- Gabuzda, D., Yankner, B. (2013). Inflammation links ageing to the brain. *Physiology, Nature* 497(197–198 (2013)), 2–3.
- Geerligs, L., Renken, R. J., Saliassi, E., Maurits, N. M., & Lorist, M. M. (2015). A Brain-Wide Study of Age-Related Changes in Functional Connectivity. *Cerebral Cortex*, 25(7), 1987–1999. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu012>
- Goldberg, E. L., Shchukina, I., Asher, J. L., Sidorov, S., Artyomov, M. N., & Dixit,

- V. D. (2020). Ketogenesis activates metabolically protective $\gamma\delta$ T cells in visceral adipose tissue. *Nature Metabolism*, 2(1), 50–61. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0160-6>
- Goyal, M. S., Vlassenko, A. G., Blazey, T. M., Su, Y., Couture, L. E., Durbin, T. J., Bateman, R. J., Benzinger, T. L. S., Morris, J. C., & Raichle, M. E. (2017). Loss of Brain Aerobic Glycolysis in Normal Human Aging. *Cell Metabolism*, 26(2), 353-360.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.010>
- Haces, M. L., Hernández-Fonseca, K., Medina-Campos, O. N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., Massieu, L., Maalouf, M., Sullivan, P. G., Davis, L., Kim, D. Y., & Rho, J. M. (2008). Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Experimental Neurology*, 145(1), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.029>
- Hamezah, H. S., Durani, L. W., Yanagisawa, D., Ibrahim, N. F., Aizat, W. M., Bellier, J. P., Makpol, S., Ngah, W. Z. W., Damanhuri, H. A., & Tooyama, I. (2018). Proteome profiling in the hippocampus, medial prefrontal cortex, and striatum of aging rat. *Experimental Gerontology*, 111(May), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.07.002>
- Hara, H., Onodera, H., Kato, H., & Kogure, K. (1992). Effects of aging on signal transmission and transduction systems in the gerbil brain: Morphological and autoradiographic study. *Neuroscience*, 46(2), 475–488. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90067-C](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90067-C)
- Havekes, R., Canton, D. A., Park, A. J., Huang, T., Nie, T., Day, J. P., Guercio, L. A., Grimes, Q., Luczak, V., Gelman, I. H., Baillie, G. S., Scott, J. D., & Abel, T. (2012). Gravin orchestrates protein kinase a and β 2-adrenergic receptor signaling critical for synaptic plasticity and memory. *Journal of Neuroscience*, 32(50), 18137–18149. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3612-12.2012>
- Hernandez, A. R., Hernandez, C. M., Campos, K., Truckenbrod, L., Federico, Q.,

- Moon, B., McQuail, J. A., Maurer, A. P., Bizon, J. L., & Burke, S. N. (2018). A Ketogenic Diet Improves Cognition and Has Biochemical Effects in Prefrontal Cortex That Are Dissociable From Hippocampus. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(December), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00391>
- Herskind, A. M., McGue, M., Holm, N. V., Sørensen, T. I. A., Harvald, B., & Vaupel, J. W. (1996). The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Human Genetics*, *97*(3), 319–323. <https://doi.org/10.1007/s004390050042>
- Hjelmborg, J. B., Iachine, I., Skytthe, A., Vaupel, J. W., McGue, M., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Pedersen, N. L., & Christensen, K. (2006). Genetic influence on human lifespan and longevity. *Human Genetics*, *119*(3), 312–321. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0144-y>
- Hof, P. R., & Morrison, J. H. (2004). The aging brain: Morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in Neurosciences*, *27*(10), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.013>
- Hu, E., Du, H., Zhu, X., Wang, L., Shang, S., Wu, X., Lu, H., & Lu, X. (2018). Beta-hydroxybutyrate Promotes the Expression of BDNF in Hippocampal Neurons under Adequate Glucose Supply. *Neuroscience*, *386*, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.036>
- Huang, J., Li, Y. Q., Wu, C. H., Zhang, Y. L., Zhao, S. T., Chen, Y. J., Deng, Y. H., Xuan, A., & Sun, X. D. (2019). The effect of ketogenic diet on behaviors and synaptic functions of naive mice. *Brain and Behavior*, *9*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1002/brb3.1246>
- Jacobs, B., Driscoll, L., & Schall, M. (1997). Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, *386*(4), 661–680. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971006\)386:4<661::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971006)386:4<661::AID-)

CNE11>3.0.CO;2-N

- Keine, Christian, Mohammed Al-Yaari, Tamara Radulovic, Connon I Thomas, Paula Valino Ramos, Debbie Guerrero-Given, Mrinalini Ranjan, Holger Taschenberger, Naomi Kamasawa, S. M. Y. J. (2022). *Presynaptic Rac1 controls synaptic strength through the regulation of synaptic vesicle priming*. 0–2.
- Kikuchi, M., Sekiya, M., Hara, N., Miyashita, A., Kuwano, R., Ikeuchi, T., Iijima, K. M., & Nakaya, A. (2020). Disruption of a RAC1-centred network is associated with Alzheimer's disease pathology and causes age-dependent neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 29(5), 817–833. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz320>
- Kim, J., Kwon, J. T., Kim, H. S., & Han, J. H. (2013). CREB and neuronal selection for memory trace. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00044>
- Koopmans, F., van Nierop, P., Andres-Alonso, M., Byrnes, A., Cijssouw, T., Coba, M. P., Cornelisse, L. N., Farrell, R. J., Goldschmidt, H. L., Howrigan, D. P., Hussain, N. K., Imig, C., de Jong, A. P. H., Jung, H., Kohansalnodehi, M., Kramarz, B., Lipstein, N., Lovering, R. C., MacGillavry, H., ... Verhage, M. (2019). SynGO: An Evidence-Based, Expert-Curated Knowledge Base for the Synapse. *Neuron*, 103(2), 217-234.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.002>
- Kraeuter, A., & Guest, P. C. (2019). *The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice*. 1916, 105–111.
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Dangelo, K., Couch, S. C., Benoit, S. C., & Clegg, D. J. (2012). Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 33(2), 425.e19-425.e27. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.006>

- Leclerc, E., Trevizol, A. P., Grigolon, R. B., Subramaniapillai, M., McIntyre, R. S., Brietzke, E., & Mansur, R. B. (2020). The effect of caloric restriction on working memory in healthy non-obese adults. *CNS Spectrums*, 25(1), 2–8. <https://doi.org/10.1017/S1092852918001566>
- Leino, R. L., Gerhart, D. Z., Duelli, R., Enerson, B. E., & Drewes, L. R. (2001). Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochemistry International*, 38(6), 519–527. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(00\)00102-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00102-9)
- Leni Moldovan, Kaikobad Irani, Nicanor Moldovan, T. F. and P. G.-C. (1999). *The actin cytoskeleton reorganization induced by rac1 requires the production of superoxide*. 1(1).
- Li, M., Su, S., Cai, W., Cao, J., Miao, X., Zang, W., Gao, S., Xu, Y., Yang, J., Tao, Y. X., & Ai, Y. (2020). Differentially Expressed Genes in the Brain of Aging Mice With Cognitive Alteration and Depression- and Anxiety-Like Behaviors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00814>
- Longo, V. D., & Panda, S. (2016). Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metabolism*, 23(6), 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.001>
- Maalouf, M., Sullivan, P. G., Davis, L., Kim, D. Y., & Rho, J. M. (2007). Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*, 145(1), 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.065>
- Manczak, M., Jung, Y., Park, B. S., Partovi, D., & Reddy, P. H. (2005). Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: Implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *Journal of Neurochemistry*, 92(3), 494–504. <https://doi.org/10.1111/j.1471->

4159.2004.02884.x

- Mattson, M. P., Longo, V. D., & Harvie, M. (2017). Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Research Reviews*, 39, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>
- Mohorko, N., Černelič-Bizjak, M., Poklar-Vatovec, T., Grom, G., Kenig, S., Petelin, A., & Jenko-Pražnikar, Z. (2019). Weight loss, improved physical performance, cognitive function, eating behavior, and metabolic profile in a 12-week ketogenic diet in obese adults. *Nutrition Research*, 62, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.007>
- Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 240–250. <https://doi.org/10.1038/nrn3200>
- Muñoz-Llancao, P., de Gregorio, C., Las Heras, M., Meinohl, C., Noorman, K., Boddeke, E., Cheng, X., Lezoualc'h, F., Schmidt, M., & Gonzalez-Billault, C. (2017). Microtubule-regulating proteins and cAMP-dependent signaling in neuroblastoma differentiation. *Cytoskeleton*, 74(3), 143–158. <https://doi.org/10.1002/cm.21355>
- Murphy, D. D., & Segal, M. (1997). Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1482–1487. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1482>
- Nadella, K. S., Saji, M., Jacob, N. K., Pavel, E., Ringel, M. D., & Kirschner, L. S. (2009). Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1. *EMBO Reports*, 10(6), 599–605. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.58>
- Newman, J. C., Covarrubias, A. J., Zhao, M., Yu, X., Gut, P., Ng, C. P., Huang,

- Y., Haldar, S., & Verdin, E. (2017). Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metabolism*, 26(3), 547-557.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.004>
- Nishimune, H., Numata, T., Chen, J., Aoki, Y., Wang, Y., Starr, M. P., Mori, Y., & Stanford, J. A. (2012). Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise. *PLoS ONE*, 7(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038029>
- Pannesse, E. (1999). *Journal of the History of the Neurosciences: Basic and Clinical Perspectives*. April 2012, 37–41.
- Park, A. J., Havekes, R., Choi, J. H. K., Luczak, V., Nie, T., Huang, T., & Abel, T. (2014). A presynaptic role for PKA in synaptic tagging and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.005>
- Patzke, C., Brockmann, M. M., Dai, J., Gan, K. J., Grauel, M. K., Fenske, P., Liu, Y., Acuna, C., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2019). Neuromodulator Signaling Bidirectionally Controls Vesicle Numbers in Human Synapses. *Cell*, 179(2), 498-513.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.011>
- Pegasiou, C. M., Zolnourian, A., Gomez-Nicola, D., Deinhardt, K., Nicoll, J. A. R., Ahmed, A. I., Vajramani, G., Grundy, P., Verhoog, M. B., Mansvelder, H. D., Perry, V. H., Bulters, D., & Vargas-Caballero, M. (2020). Age-dependent changes in synaptic NMDA receptor composition in adult human cortical neurons. *Cerebral Cortex*, 30(7), 4246–4256. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHAA052>
- Peters, A., Sethares, C., & Luebke, J. I. (2008). Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*, 152(4), 970–981. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.014>

- Peters, R. (2006). Ageing and the brain. *Postgraduate Medical Journal*, 82(964), 84–88. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.036665>
- Porte, Y., Buhot, M. C., & Mons, N. (2008). Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiology of Aging*, 29(10), 1533–1546. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.023>
- Puri, S. and V. L. (1981). Age-related changes of cyclic nucleotide levels in rat brain regions. *Mechanisms of Ageing and Development*, 3(September), 773–787.
- Ramos, B. P., Birnbaum, S. G., Lindenmayer, I., Newton, S. S., Duman, R. S., & Arnsten, A. F. T. (2003). Dysregulation of Protein Kinase A Signaling in the Aged Prefrontal Cortex: New Strategy for Treating Age-Related Cognitive Decline functions dependent on the amygdala and posterior cor-tices (Barros et al PKA activity can also be increased through the sys. *Neuron*, 40, 835–845. https://ac.els-cdn.com/S0896627303006949/1-s2.0-S0896627303006949-main.pdf?_tid=fadb8d9e-443f-4627-b2bc-6030b26af523&acdnat=1541277355_48cdc04a947a877f6309db105ecc1c41
- Roberts, M. N., Wallace, M. A., Tomilov, A. A., Zhou, Z., Marcotte, G. R., Tran, D., Perez, G., Gutierrez-Casado, E., Koike, S., Knotts, T. A., Imai, D. M., Griffey, S. M., Kim, K., Hagopian, K., Haj, F. G., Baar, K., Cortopassi, G. A., Ramsey, J. J., & Lopez-Dominguez, J. A. (2017). A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice. *Cell Metabolism*, 26(3), 539-546.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.005>
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6), 801–810. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9)
- Scheetz, A. J., Nairn, A. C., & Constantine-paton, M. (2000). *NMDA receptor-mediated control of.* 211–216.

- Schilling, B., Gibson, B. W., & Hunter, C. L. (2017). Generation of high-quality SWATH® acquisition data for label-free quantitative proteomics studies using tripleTOF® mass spectrometers. *Methods in Molecular Biology*, 1550, 223–233. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6_16
- Shabb, J. B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chemical Reviews*, 101(8), 2381–2411. <https://doi.org/10.1021/cr000236l>
- Sharma, S., & Jain, P. (2014). The ketogenic diet and other dietary treatments for refractory epilepsy in children. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17(3), 253–258. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.138471>
- Smith, D. L., Pozueta, J., Gong, B., Arancio, O., & Shelanski, M. (2009). Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39), 16877–16882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908706106>
- Sotoudeh, N., Namavar, M. R., Zarifkar, A., & Heidarzadegan, A. R. (2020). Age-dependent changes in the medial prefrontal cortex and medial amygdala structure, and elevated plus-maze performance in the healthy male Wistar rats. *IBRO Reports*, 9(June), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.08.002>
- Stern, P., Hines, P. J., & Travis, J. (2014). THE AGING brain. *Science*, 346(6209), 567. <https://doi.org/10.1126/science.346.6209.566>
- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., & Lubner, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.390>
- Van Cauwenberghe, C., Vandendriessche, C., Libert, C., & Vandembroucke, R. E. (2016). Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease. *Mammalian Genome*, 27(7–8), 300–319. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9647-6>

- Vandesquille, M., Baudonnat, M., Decorte, L., Louis, C., Lestage, P., & Béracochéa, D. (2013). Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiology of Aging*, *34*(6), 1599–1609. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.006>
- Vanguilder, H. D., Yan, H., Farley, J. A., Sonntag, W. E., & Freeman, W. M. (2010). Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *Journal of Neurochemistry*, *113*(6), 1577–1588. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06719.x>
- Ve, H., Cabana, V. C., Gouspillou, G., & Lussier, M. P. (2020). Quantitative Immunoblotting Analyses Reveal that the Abundance of Actin, Tubulin, Synaptophysin and EEA1 Proteins is Altered in the Brains of Aged Mice. *Neuroscience*, *442*, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.044>
- Vecchio, L. M., Meng, Y., Xhima, K., Lipsman, N., Hamani, C., & Aubert, I. (2018). The Neuroprotective Effects of Exercise: Maintaining a Healthy Brain Throughout Aging. *Brain Plasticity*, *4*(1), 17–52. <https://doi.org/10.3233/bpl-180069>
- Verhage, M., Besselsen, E., Lopes Da Silva, F. H., & Ghijzen, W. E. J. M. (1988). Evaluation of the Ca²⁺ Concentration in Purified Nerve Terminals: Relationship Between Ca²⁺ Homeostasis and Synaptosomal Preparation. *Journal of Neurochemistry*, *51*(6), 1667–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb01143.x>
- von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M. A., & Bork, P. (2005). STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Research*, *33*(DATABASE ISS.), 433–437. <https://doi.org/10.1093/nar/gki005>

- Whittaker, V. P., Michaelson, I. A., & Kirkland, R. J. (1964). The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *The Biochemical Journal*, *90*(2), 293–303. <https://doi.org/10.1042/bj0900293>
- Wruck, W., & Adjaye, J. (2020). Meta-analysis of human prefrontal cortex reveals activation of GFAP and decline of synaptic transmission in the aging brain. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00907-8>
- Wu, J. Y., Matsuda, T., & Roberts, E. (1973). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(9), 3029–3034.
- Yang, W., Zhou, X., & Ma, T. (2019). Memory Decline and Behavioral Inflexibility in Aged Mice Are Correlated With Dysregulation of Protein Synthesis Capacity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00246>
- Yang, Z., Mi, J., Wang, Y., Xue, L., Liu, J., Fan, M., Zhang, D., Wang, L., Qian, H., & Li, Y. (2021). Effects of low-carbohydrate diet and ketogenic diet on glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic mice. *Nutrition*, *89*, 111230. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111230>
- Yaple, Z. A., Stevens, W. D., & Arsalidou, M. (2019). Meta-analyses of the n-back working memory task: fMRI evidence of age-related changes in prefrontal cortex involvement across the adult lifespan. *NeuroImage*, *196*(April), 16–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.03.074>
- Zhang, W., & Benson, D. L. (2001). Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *Journal of Neuroscience*, *21*(14), 5169–5181. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-14-05169.2001>
- Zhong, Y., Chen, J., Li, L., Qin, Y., Wei, Y., Pan, S., Jiang, Y., Chen, J., & Xie, Y. (2018). PKA-CREB-BDNF signaling pathway mediates propofol-induced

long-term learning and memory impairment in hippocampus of rats. *Brain Research*, 1691, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.022>

Zhou, Z., Ramsey, J. J., Long, M., Wang, R., Kim, K., Graham, J., & Rutkowsky, J. (2021). Continuous and intermittent ketogenic diets initiated in late middle-aged mice improves cognition and motor endurance at advanced age. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 17, e052443. <https://doi.org/10.1002/alz.052443>

Zimmerman, I., & Berg, A. (1974). Levels of adenosine 3',5' cyclic monophosphate in the cerebral cortex of aging rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 3(C), 33–36. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(74\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0047-6374(74)90003-7)

Zou, X. H., Li, H. M., Wang, S., Leski, M., Yao, Y. C., Yang, X. Di, Huang, Q. J., & Chen, G. Q. (2009). The effect of 3-hydroxybutyrate methyl ester on learning and memory in mice. *Biomaterials*, 30(8), 1532–1541. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.012>