



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Efecto del reciclamiento de vitamina C en la formación de neuritas



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Francisca Nicole Espinoza Romero
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

Profesor Guía: Francisco Nualart Santander
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Francisco Nualart Santander
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ariel Castro Alma
Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Jorge Fuentealba Arcos
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Nelson Osses Rivera
Profesor Evaluador Externo
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Dr. Ariel Castro Alma
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Tesis de doctorado financiada por:

FONDECYT regular #1181243

FONDECYT regular #1140477

FONDECYT iniciación #11150678

ECM-12 PIA-CONICYT



Beca CONICYT doctorado nacional #21150842

Beca CONICYT eventos y cursos cortos 2016

Beca CONICYT gastos operacionales 2018

Beca CONICYT pasantía doctoral en el extranjero 2018

Beca CONICYT extensión de beca para redacción de tesis doctoral 2019

FENS-IBRO/PERC travel grant 2018

Beca décimo semestre proyecto EDPG

Young investigator training programme (YITP) grant, International Brain Research Organization (IBRO) 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Nualart por recibirme muy joven en su laboratorio, por todo el conocimiento y experiencia que me entregó durante estos años, por guiar mi trabajo y la escritura de esta tesis.

Dr. Fernando Martínez, por entregarme todo el conocimiento necesario sobre el trabajo con animales, por mostrarme el camino de la docencia y por su fabulosa amistad. Dra. Katterine Salazar, por su apoyo en la ejecución y discusión de este trabajo. Dra. Nery Jara, por enseñarme durante horas infinitas a hacer neuroesferas, por su cariño y amistad. A todo el personal del CMA, Asia, Germán, Gustavo y Paul, por su invaluable aporte a este trabajo.

A todas mis compañeras y compañeros de trabajo en el Laboratorio de Neurobiología, por su tremenda calidad humana, por hacer del lab un espacio cálido en donde poder trabajar. María José Oviedo, Eder Ramírez, Dra. Romina Bertinart, Dr. Luciano Ferrada y Roberto Gajardo. Rocío Magdalena, fue un honor verte crecer científica y personalmente mientras desarrollé esta tesis. Gracias por todos estos años de trabajo.

A la Dra. Christine Rose por guiar mi pasantía doctoral y a su equipo por recibirme en su instituto.

A Ximena Koch por enseñar y guiar mi trabajo en histología. A Felipe Ávila por su disposición a realizar los análisis de modificaciones proteicas. Don Luis y Don Manuel, gracias por su vital trabajo dentro de esta tesis.

Natalia Saldivia, gracias por ayudarme con tu amistad, los experimentos y los animales. Gracias por ser parte de esta historia y por compartir la tuya. A Diego Zelada, por ser luz en el camino. A Víctor Baeza, gracias por seguir siendo parte de mis agradecimientos después de 10 años de universidad colega. A Laura Trigueros, por entregarle la música de su amistad a mi vida. Te quiero guapa.

Dra. Antonia Recabal y Dr. Carlos Farkas, gracias por acompañarme con su amor y apoyo durante éstos años.

Amigos incondicionales de toda la vida: Ariel, Alicia, Bea y Mateo, Conchu, Pauli y Lio; sin sus risas, sus abrazos, cervezas y su amistad a prueba de cualquier grado, esto no sería posible.

To Nana, Kathi and Laura, for being my family in Düsseldorf and for be part of my heart.

Hermanita y Rodolfo gracias por apoyarme en todo, sin ustedes irradiando felicidad, el camino habría sido más oscuro.

Mamá y Papá, ojalá estén tan orgullosos de mí que olviden todos los años que estuve en la universidad. Este grado es para que por fin tengan una hija doctora, gracias por ser mi vida. Los amo.

Walther, esposo, colega, amigo. Esta tesis es para tí, nunca olvides que es tan tuya como mía, porque sin tus cuidados diarios, sin tu amor infinito, sin tu abrazo al llegar cada domingo después de suplementar...nunca lo hubiera logrado. Gracias por la fortuna de tenernos.

Esta tesis se escribió mientras Chile despertaba y se defendió en medio de una pandemia mundial. Nada es imposible.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE ESQUEMAS	xii
INDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Desarrollo del sistema nervioso central.....	1
1.2 Establecimiento de la morfología neuronal.....	2
1.3 Descubrimiento de las vitaminas.....	7
1.4 Biodisponibilidad y funciones de la vitamina C	7
1.5 Transporte de vitamina C y su fisiología en el sistema nervioso central (SNC).	9
1.6 Función de vitamina C durante el desarrollo cerebral.....	11
1.7 Efecto de vitamina C en células indiferenciadas.....	13
1.8 Acoplamiento neurona-astrocito y reciclamiento de vitamina C.....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	22
5.1 Animales de experimentación	22
5.2 Cultivos celulares	22

5.3	Cultivo de células HL60.....	22
5.4	Cultivo de células U87.....	23
5.5	Cultivo primario de astrocitos corticales	23
5.6	Cultivo primario de neuronas corticales.....	23
5.7	Cultivo primario de neuroesferas.....	24
5.8	Suplementación con Ácido retinoico.....	25
5.9	Suplementación con Ácido ascórbico.....	25
5.10	Suplementación con DHA	25
5.11	Co-cultivos	26
5.12	Citometría de flujo.....	26
5.13	Viabilidad celular.....	27
5.14	Medición de viabilidad celular mediante IncuCyte®.....	27
5.15	Análisis inmunocitoquímico.....	28
5.16	Determinación de AA intracelular	29
5.17	Análisis de transporte.....	29
5.18	Extracción de ARN.....	30
5.19	Transcripción reversa del ARN total (RT).....	30
5.20	Amplificación del ADNc por PCR.	31
5.21	Electroforesis en geles de agarosa.....	31
5.22	RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).....	32
5.23	Western Blott	33
5.24	Inmunodetección de carboximetil-lisina (CML) y proteínas carboniladas.....	34

5.25	Producción de lentivirus EGFP.....	35
5.26	Ensayos <i>in vivo</i>	36
5.27	Fijación	37
5.28	Inmunofluorescencia.....	38
5.29	Impregnación Golgi-Cox.....	40
5.30	Cuantificación de procesos neuronales.....	40
5.31	Obtención de <i>slices</i> agudos	41
5.32	Análisis de niveles de sodio y calcio intracelulares.....	41
5.33	Marcaje con TTC.....	42
5.34	Análisis estadístico.....	42
6.	RESULTADOS.....	43
6.1	Capítulo 1. Análisis del efecto de AA en la formación de procesos neuríticos en células progenitoras neurales <i>in vitro</i> y efecto de DHA en este modelo.	43
6.2	Caracterización del cultivo primario de NE crecidas en adhesión.....	43
6.3	Efecto del tratamiento prolongado con AA en NEs adheridas.	48
6.4	Efecto de DHA en el crecimiento de neuritas e impacto en balance redox de NE <i>in vitro</i>	58
6.5	Capítulo 2. Determinación del efecto del reciclamiento de vitamina C en la mantención de procesos neuríticos <i>in vitro</i>	70
6.6	Caracterización de células recicladoras de DHA.	70
6.7	Reciclamiento de DHA <i>in vitro</i> permite la mantención de neuritas.....	71
6.8	Inhibición del reciclamiento de DHA <i>in vitro</i>	78

6.9	Capítulo 3. Estudio del reciclamiento de vitamina C <i>in vivo</i> y su posible función en la morfología neuronal durante el desarrollo postnatal temprano de la corteza cerebral.....	89
6.10	Caracterización histológica de la corteza cerebral postnatal y transporte de AA en neuronas corticales postnatales.....	89
6.11	Inhibición del transporte del DHA a través de GLUT1 induce daño neuronal en corteza de ratas postnatales.....	96
6.12	Cambios en la morfología neuronal inducidos por la inhibición del reciclamiento de vitamina C en la corteza cerebral postnatal.....	103
7.	DISCUSIÓN.....	118
7.1	Efecto diferenciador de AA y efecto de DHA en NE adheridas.....	118
7.2	Reciclamiento de vitamina C y regulación de estructuras neuríticas mediante balance redox.....	121
7.3	Transporte de AA en neuronas corticales y presencia del reciclamiento de vitamina <i>in vivo</i>	122
7.4	Inhibición del reciclamiento de vitamina C <i>in vivo</i> induce lesión cortical afectando la morfología neuronal.....	124
8.	PROYECCIONES.....	128
9.	CONCLUSIONES.....	130
10.	REFERENCIAS.....	131

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracterización inmunocitoquímica de cultivos de NEs crecidas en adhesión. 45	45
Figura 2. Expresión de SVCT2 en células con compromiso neuronal en NE adheridas. . 46	46
Figura 3. Expresión, función y localización de los transportadores de vitamina C en NE adheridas. 50	50
Figura 4. Análisis comparativo del crecimiento de neuritas estimulado por AA y AR. 53	53
Figura 5. Análisis de viabilidad celular durante el tratamiento con AA y AR..... 55	55
Figura 6. Análisis de los niveles de expresión de SVCT2 y GLUT1, durante el tratamiento con AA. 56	56
Figura 7. Cambios en los niveles intracelulares de vitamina C durante el tratamiento con AA en NE adheridas. 57	57
Figura 8. El tratamiento con DHA en NE diferenciadas <i>in vitro</i> , disminuye el crecimiento neurítico. 62	62
Figura 9. Tratamiento prolongado con AA induce un incremento en los niveles intracelulares de ROS. 64	64
Figura 10. Análisis de los niveles de GSH durante el tratamiento con AA. 68	68
Figura 11. Ambiente oxidativo inducido por la acumulación de DHA induce modificación de proteínas. 69	69
Figura 12. Expresión y función del transportador GLUT1 en líneas celulares utilizadas para la captación de DHA. 74	74
Figura 13. Reciclamiento de DHA mediante células HL60 permite la mantención de neuritas durante el tratamiento con AA y DHA. 75	75
Figura 14. Células HL60 no secretan factores que afecten el crecimiento de neuritas. ... 76	76
Figura 15. Cultivo mixto con células U87 permite la mantención de neuritas..... 79	79

Figura 16. Reciclamiento de DHA utilizando astrocitos corticales permite la mantención de neuritas <i>in vitro</i>	80
Figura 17. Análisis de viabilidad en células utilizadas para el reciclamiento de DHA expuestas a WZB117.....	82
Figura 18. Inhibición de GLUT1 en co-cultivos con células HL60 disminuye el crecimiento de neuritas.....	86
Figura 19. Inhibición del reciclamiento de DHA en cultivo mixto con células U87.....	88
Figura 20. Análisis inmunocitoquímico de la población neuronal y astrocítica en corteza cerebral postnatal.....	92
Figura 21. Ácido ascórbico incrementa los niveles de sodio intracelular en neuronas y astrocitos corticales.....	94
Figura 22. Caracterización de señales de calcio en neuronas y astrocitos corticales expuestos a AA.....	95
Figura 23. Expresión de GLUT1 en astrocitos corticales de rata postnatal.....	97
Figura 24. Efecto de la ausencia de glucosa y presencia de WZB117 en viabilidad neuronal.....	98
Figura 25. Efecto morfológico de inyección intracortical de WZB117 y DHA en rata postnatal.....	100
Figura 26. Inyección de lentivirus control induce expresión de EGFP a nivel neuronal..	101
Figura 27. Caracterización inmunocitoquímica de la lesión cortical inducida por WZB117.	104
Figura 28. Análisis morfológico de diferentes zonas, en la lesión cortical inducida por WZB117.....	106
Figura 29. Análisis mediante microscopía confocal de impregnación Golgi-Cox en la corteza cerebral de rata postnatal, inyectada con lentivirus+WZB117.....	109
Figura 30. Análisis de la morfología neuronal en la zona de inhibición con WZB117, mediante impregnación de Golgi-Cox.....	112

Figura 31. Caracterización inmunocitoquímica de una zona inyectada con lentivirus EGFP+DHA en corteza cerebral de rata postnatal.	114
Figura 32. Inyección de lentivirus EGFP+DHA no induce cambios en la morfología neuronal cortical.....	116
Figura 33. Inyección intracortical de lentivirus EGFP+WZB117, induce lesión cortical con muerte celular.	117
Figura 34. Modelo final del estudio.....	127

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Polarización neuronal <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	5
Esquema 2. Reciclamiento de vitamina C.	18

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en RT-PCR convencional y qRT-PCR.....	33
Tabla 2. Anticuerpos utilizados.....	38

ABREVIATURAS

5-hmC: 5-hidroximetil citosina

5-mC: 5-metil citosina

AA: Ácido Ascórbico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia

AGE: Producto Final de Glicación Avanzada

AR: Ácido Retinoico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero



BBB: Barrera Hematoencefálica

BP: Célula Bipolar

CC: Corteza Externa

CML: Carboximetil Lisina

Cy: Cianina

DHA: Ácido Dehidroascórbico

DIV: Días *in vitro*

DMEM: Medio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

E: Embrionario

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EGFP: Proteína Fluorescente Verde mejorada

EPSC: Corriente Postsináptica Excitatoria

ESC: Célula Madre Embrionaria

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar de la Glia

GLUT: Transportador de Glucosa

GR: Glia Radial

GSH: Glutación

HIF: Factor Inducible por Hipoxia

IMDM: Medio Iscove modificado por Dulbecco

iPSC: Célula Madre Pluripotente inducida

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

MP: Célula multipolar

NE: Neuroesfera

P: Postnatal

PC: Plato Cortical

PKC: Proteína Quinasa C

PM: Peso Molecular

PPP: Vía de la Pentosa Fosfato

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SBF: Suero Bovino Fetal



SNC: Sistema Nervioso Central

SVCT: Co-transportador de Sodio-Vitamina C

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

TTC: Cloruro de Trifeniltetrazolio

URG: Tinción de Golgi Ultra rápida

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

ZI: Zona Intermedia

ZM: Zona Marginal

ZSG: Zona Subgranular

ZSV: Zona Subventricular

ZV: Zona Ventricular



RESUMEN

Vitamina C en su forma reducida, ácido ascórbico (AA), se encuentra altamente concentrada en la corteza cerebral y su transportador, el co-transportador de sodio/vitamina C isoforma 2 (SVCT2), se expresa principalmente a nivel neuronal permitiendo su entrada y acumulación. Debido a su función antioxidante, AA es rápidamente oxidado hacia ácido dehidroascórbico (DHA) al interior de las neuronas, sin embargo, si esta molécula se acumula puede inducir fuertes cambios metabólicos y muerte neuronal. En este contexto se ha descrito un tipo de acoplamiento neurona-astrocito conocido como *reciclamiento de vitamina C*, en el cual el astrocito capta el DHA para evitar su acumulación en el parénquima cerebral y así mantener la razón AA/DHA. Hasta la fecha se desconoce el rol de este mecanismo en la regulación de la morfología neuronal inmadura, particularmente, en el crecimiento de neuritas. En este trabajo, hemos desarrollado un cultivo primario de neuroesferas (NE) adheridas *in vitro* durante 12, 24, 48 y 72 horas utilizando AA o ácido retinoico (AR) como control positivo. Observamos que la acumulación gradual de DHA disminuye el crecimiento de neuritas, condición que fue inducida por tratamientos largos con AA. Esto se encuentra relacionado con un cambio en el ambiente redox, aumentando los ROS e induciendo modificaciones proteicas irreversibles, como carbonilación y glicación. Sin embargo, en presencia de células que captan eficientemente DHA, como astrocitos corticales, se mantiene el crecimiento de neuritas en el tiempo. Adicionalmente, realizamos aproximaciones *in vivo* para alterar el reciclamiento de vitamina C inyectando intracorticalmente un inhibidor del transporte de DHA mediante GLUT1. De esta manera, determinamos que una inyección aguda en la corteza externa con el inhibidor WZB117 induce una lesión cortical, en donde las neuronas postnatales presentan menor cantidad de neuritas, análisis que se llevo a cabo utilizando la impregnación de Golgi-Cox.

Por lo tanto, hemos demostrado por primera vez que el reciclamiento de vitamina C puede regular la morfología neuronal inmadura durante el proceso de diferenciación y maduración.

ABSTRACT

Vitamin C in its reduced form, ascorbic acid (AA), is highly concentrated in the cerebral cortex and its transporter, the co-transporter of sodium vitamin C isoform 2 (SVCT2), is expressed at neuronal level allowing AA uptake and accumulation. Due to its antioxidant function, AA is rapidly oxidized to dehydroascorbic acid (DHA), however, DHA cannot accumulate intracellularly because it induces metabolic changes and cell death. In this context, it has been proposed that the neuron-astrocyte coupling allows the recycling of vitamin C, where the astrocyte captures DHA released by the neuron, which prevents its parenchymal accumulation and thus maintain the AA/DHA ratio. To date, the role of this mechanism in the regulation of immature neuronal morphology, particularly in the growth of neurites, is unknown. In this work, we have used neurospheres of primary culture (NE) adhered for 12, 24, 48 and 72 h *in vitro* to stimulate neuronal differentiation using AA or retinoic acid (RA), as a positive control. We observed that neurites growth is decreased by DHA accumulation, condition that was induced with long periods of treatment with AA. This is related to a change in the redox environment, increasing ROS and inducing irreversible protein modifications, such as carbonylation and glycation. Surprisingly, when we use different cells (that efficiently capture DHA) co-incubated with neurospheres, the growth of neurites is maintained over-time.

Additionally, we performed approaches *in vivo* to alter the recycling of vitamin C by intracortical injections of a GLUT1 inhibitor to above DHA uptake by astrocytes. We determined that an acute injection into the external cortex with WZB117 inhibitor induces a cortical lesion, where postnatal neurons have less neurites, an analysis that was carried out using the Golgi-Cox impregnation.

Therefore, we have demonstrated for the first time that vitamin C recycling can regulate immature neuronal morphology during the process of differentiation and maturation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo del sistema nervioso central

El Sistema nervioso central (SNC) se encuentra formado principalmente por células neuronales y células gliales, si bien ambos tipos celulares se originan a partir de una zona particular del ectodermo, conocida como placa neural, actualmente identificamos como neurogénesis a una serie de pasos que comienzan con la división de una célula precursora y que finalizan con la existencia de una nueva y funcional neurona. Por otra parte, existe la gliogénesis, que se encarga de dar origen a las células gliales, que brindan sustento metabólico y protección al SNC.

Durante el desarrollo embrionario existe una matriz neural, ubicada en la pared interna del tubo neural, con la capacidad de generar éstos elementos celulares. En esta matriz se encuentran las células neuroepiteliales, que corresponden a una población celular que posee una marcada polaridad apical-basal, uniones estrechas y que se observa como un epitelio pseudoestratificado, este grupo celular dará origen a distintos tipos celulares que forman parte del SNC (Huttner & Brand, 1997; Mori, Buffo, & Gotz, 2005).

En ratón, la neurogénesis parte entre los días 9-10 del desarrollo embrionario y comienza con una serie de cambios morfológicos en las células neuroepiteliales, las cuales adquieren características de células gliales, dando origen a una nueva población celular, denominada Glia Radial (GR) (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

Las células de GR se caracterizan morfológicamente por tener un núcleo en la Zona Ventricular (ZV), un proceso corto que se extiende hasta la superficie ventricular, y un proceso radial que se extiende a la superficie pial, donde se encuentra en contacto con los vasos sanguíneos de las meninges (Noctor, Flint, Weissman, Dammerman, & Kriegstein, 2001). La génesis de nuevas neuronas contempla diferentes formas de división por parte de la GR, que

prolifera de manera simétrica expandiendo el *pool* de precursores neurales, divisiones asimétricas que dan origen a una neurona y a una glia radial (Noctor, Martínez-Cerdeno, Ivic, & Kriegstein, 2004). De esta manera, la GR puede generar neuronas y funcionar como guía migratoria para su progenie neuronal, estableciendo así un importante y especializado mecanismo para generación de la neocorteza, durante el desarrollo embrionario. Al culminar el período perinatal, la GR retrae su proceso ventricular, adquiere una morfología de transición, para luego diferenciarse mayoritariamente en astrocitos (deAzevedo et al., 2003).

Si bien durante el desarrollo existen dos sitios principales donde ocurre la proliferación neuronal: la ZV y la zona subventricular (ZSV), se ha descrito que es en ésta última donde continúa la proliferación postnatal en mamíferos. Por su parte, la gliogénesis siempre tiene lugar en la ZSV post-natal; sin embargo, diferentes autores (Alvarez-Buylla & Lois, 1995; Reynolds & Weiss, 1992) describieron que las células presentes en esta zona retienen su capacidad auto-regenerativa y podrían generar tanto células gliales como neuronas.

Hasta la fecha las zonas más estudiadas como nichos neurogénicos en el cerebro adulto, son la ZSV de los ventrículos laterales y la Zona Subgranular (ZSG) en el giro dentado del hipocampo, existiendo también evidencia de la presencia de células precursoras en hipotálamo, sustancia nigra, cerebelo, amígdala y médula espinal (Braun & Jessberger, 2014; Oyarce et al., 2018).

1.2 Establecimiento de la morfología neuronal

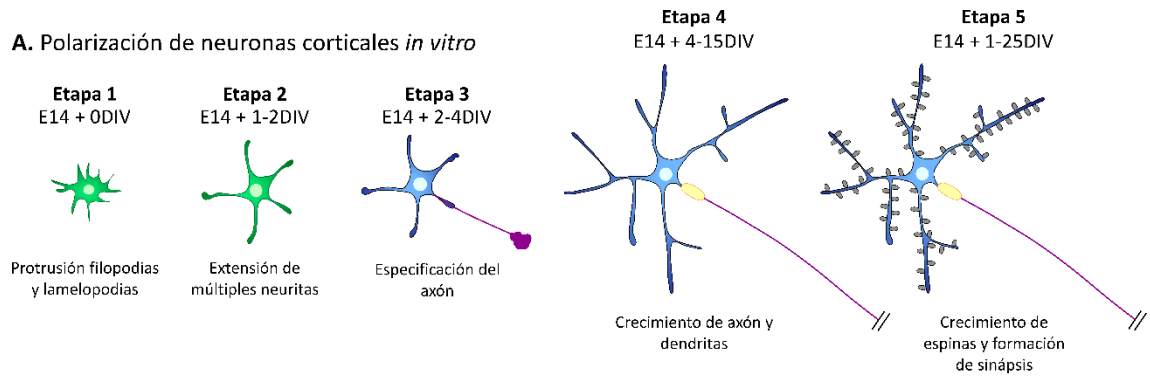
Una vez generadas a partir de la glia radial, las neuronas postmitóticas deben migrar a través de la diferentes zona de la corteza en desarrollo, hasta alcanzar su localización final, y durante este proceso migratorio ocurre la polarización axón-dendrita. Sin importar el tipo de neurona y la morfología de esta, el brote inicial de una neurita que corresponde a una extensión cilíndrica con un cono de crecimiento distal, sin características claras de axón o dendrita; será

el primer paso que rompe con la forma esférica de la neurona recién diferenciada y marca el comienzo de la polarización neuronal (da Silva & Dotti, 2002). Estudios *in vitro* han dividido la polarización neuronal en 5 etapas (**Esquema 1A**): primero las neuronas extienden filopodias dinámicas que sufren procesos de extensión/retracción, luego se forman múltiples neuritas menores, de las cuales una de ellas, crece rápidamente hasta transformarse en axón, mientras tanto, el resto de las neuritas se especifican como dendritas. Finalmente, ocurren los procesos de maduración, como la morfogénesis de espinas dendríticas y la formación de sinápsis (Barnes & Polleux, 2009; Takano, Xu, Funahashi, Namba, & Kaibuchi, 2015). Estudios *in vivo*, utilizando cerebros embrionarios intactos o *slices*, han permitido describir que en la corteza cerebral el proceso de polarización ocurre al mismo tiempo que la diferenciación neuronal (**Esquema 1B**) (Noctor et al., 2004). Las neuronas generadas en la ZV a partir de la GR migran hacia la Zona Intermedia (ZI), a través de la ZSV, durante este proceso extienden múltiples neuritas menores, transformándose en células multipolares (MP) (**Esquema 1B-2**). Una de éstas neuritas se transforma en el *leading process* que posteriormente será la dendrita y se extiende un *trailing process* que luego será el axón (**Esquema 1B-3**), de esta manera la neurona adopta una morfología bipolar (BP). Esta neurona migrará hacia el plato cortical (PC) y la zona marginal (ZM), siguiendo la migración radial que la llevará hasta su posición final donde ocurrirán los procesos de maduración neuronal (**Esquema 1B-7**) (Barnes & Polleux, 2009; Takano et al., 2015). La presencia de moléculas de la matrix extracelular, como el colágeno, laminina y tenascina, han sido descritas como importantes en el crecimiento axonal. Pero también moléculas solubles como, el factor de crecimiento fibroblasto 2 (FGF2), el factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico y neurotrofinas pueden regular los cambios morfológicos asociados al desarrollo neuronal (da Silva & Dotti, 2002).

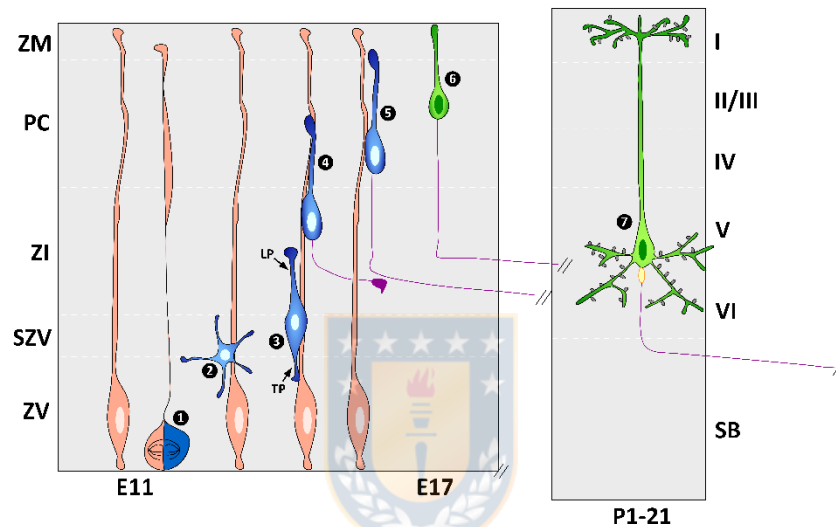
La sinaptogénesis es un proceso que ocurre durante el desarrollo postnatal y que involucra la formación de nuevas conexiones nerviosas y eliminación de otras. La formación de espinas

dendríticas (estructuras que nacen desde las dendritas compuestas por un cuello y una cabeza, altamente dinámicas y que pueden presentar diferentes morfologías) son cruciales en la sinaptogénesis y su análisis permite conocer el nivel de maduración y plasticidad que presenta la población neuronal en un momento dado. En la zona CA1 del hipocampo se ha determinado un importante incremento en la presencia de espinas dendríticas entre los estadios P1-P12 en ratas (von Bohlen Und Halbach & von Bohlen Und Halbach, 2018). En corteza cerebral, se determinó que neuronas piramidales de las capas I y II de ratones transgénicos jóvenes (1 mes de edad), que fueron observados *in vivo* durante 3 días, existe un 80% de pérdida de filopodias pre-existentes, mientras se formaron más de un 100% de estructuras nuevas. Por el contrario, las espinas dendríticas de ratones adultos se mantuvieron estables por hasta 4 meses (Grutzendler, Kasthuri, & Gan, 2002). Finalmente, en macacos se ha determinado que las neuronas piramidales, de la capa V, retraen sus árbol dendrítico en la zona V1, mientras que, en el área 12, incrementan el área dendrítica entre los 2 días postnatales y los 4,5 años de vida (Oga, Elston, & Fujita, 2017).

Estas evidencias apuntan a que cambios tanto en el número, como en la morfología (largo y diámetro), ya sea de espinas dendríticas, como de estructuras anteriores (filopodios y lamelopodios), podrían relacionarse con procesos tan importantes como la memoria a largo plazo y el almacenamiento de información a corto plazo (Grutzendler et al., 2002). Es por ello, que la búsqueda de nuevos mecanismos, ya sean moleculares o celulares, que puedan regular estos cambios morfológicos durante la maduración neuronal, se vuelve interesante y trascendental para comprender cómo se establece finalmente la estructura neuronal postnatal.



B. Polarización de neuronas corticales *in vivo*



Esquema 1. Polarización neuronal *in vitro* e *in vivo*.

A. Etapas de polarización de neuronas corticales *in vitro*, descrito clásicamente en cultivos de neuronas hipocampales disociadas que sufren una serie de transiciones descritas a continuación. Etapa 1, las neuronas presentan una intensa actividad protrusiva de filopodias y lamelopodias que conlleva la emergencia de múltiples neuritas inmaduras en la etapa 2. Durante la etapa 3, ocurre un paso crítico cuando se rompe la simetría y una neurita crece rápidamente para transformarse en axón (célula en azul, extensión violeta). La etapa 4, se caracteriza por el rápido crecimiento del axón y dendritas. Finalmente, en la etapa 5, las neuronas se diferencian terminalmente en neuronas piramidales desarrollando espinas dendríticas (célula en azul, espinas en gris). **B.** Polarización neuronal *in vivo*. Una vez que ocurre la división asimétrica, la neurona postmitótica (1, azul) transita por un estado multipolar, donde múltiples neuritas emergen rápidamente desde el cuerpo celular (2). Un proceso mayor, toma una dirección radial y se transforma en leading process (3, LP), mientras la neurona comienza su traslocación radial a través del proceso glial generando un *trailing process* (3,

TP), el cual elongará tangencialmente hasta la zona intermedia (ZI) (4, violeta). El cuerpo celular continúa traslocando hacia el plato cortical (PC), mientras se elonga el axón (5). El LP se convertirá en dendrita apical (6, extensión verde). Al culminar el proceso, la neurona piramidal desarrollará sus características de maduración como el segmento de iniciación axonal (7, segmento amarillo) y espinas dendríticas (protrusiones grises) durante las primeras semanas de desarrollo postnatal. Modificado de (Barnes & Polleux, 2009; Takano et al., 2015).



1.3 Descubrimiento de las vitaminas

La idea de que existen factores distintos a las proteínas, sal, almidón, azúcar o minerales, fue un concepto novedoso que comenzó antes del término de 1880 (Benbrook, Chambon, Rochette-Egly, & Asson-Batres, 2014). Esta noción fue verificada por una serie de estudios de suplementación de la dieta humana y experimentos controlados en modelos animales entre 1880 y 1920, los cuales demostraron que removiendo éstos factores desde la dieta se causaban enfermedades debilitantes y muerte (Piro, Tagarelli, Lagonia, Tagarelli, & Quattrone, 2010). Los primeros descubrimientos en este campo fueron hechos por Christiaan Eijkman y Frederick Gowland Hopkins, que encontraron que el pulido de arroz contiene sustancias que pueden prevenir el beriberi, enfermedad que afecta al sistema nervioso (Carpenter & Sutherland, 1995). En 1912, Casimir Funk identificó la fracción activa presente en el pulido de arroz, que llamó factor hidrosoluble b, más tarde descrito como tiamina (Carpenter, 2012). Antes de 1920, varios otros factores de baja abundancia en la dieta fueron también descritos, las que hoy conocemos como “vitaminas” y que clasificamos como vitamina A, vitamina B (1-12), vitamina C, entre otras.

1.4 Biodisponibilidad y funciones de la vitamina C

La vitamina C es un micronutriente necesario para mantener diferentes funciones en los mamíferos. La mayoría de éstos pueden sintetizar esta vitamina en el hígado a partir de la glucosa, sin embargo, los humanos carecen de la enzima L-gulonolactona oxidasa que es necesaria para la biosíntesis de vitamina C, siendo ésta obtenida directamente del consumo en la dieta (Nishikimi & Yagi, 1991). La deficiencia de vitamina C en seres humanos se conoce como escorbuto, en el año 1747 James Lind descubrió que esta enfermedad podía ser prevenida mediante el consumo de cítricos y, posteriormente, se describió que vitamina C sería el factor anti-escorbútico que contenían estos alimentos (Svirbely & Szent-Gyorgyi, 1932).

Químicamente, vitamina C es una molécula soluble en agua con dos protones disociables, con valores de pKa de 4.2 y 11.8, por lo tanto a pH fisiológico se encuentra como anión monovalente (Rice, 2000). Debido a sus propiedades químicas la función más conocida de la vitamina C es su poder antioxidante, que le permiten ser un dador de electrones. Es por esto, que esta vitamina actúa como *scavenger* frente a diversas especies reactivas de oxígeno (ROS, tales como anión superóxido, radical hidroxil y peróxido de hidrógeno, impidiendo que éstos ataquen a las membranas y moléculas biológicas. En el ambiente celular, vitamina C también permite la recuperación de antioxidantes como α -tocoferol (Vitamina E) (Niki, 1991), por el contrario, vitamina C luego de cumplir su función y oxidarse, puede ser recuperada a expensas de otras moléculas antioxidantes, como glutatión (GSH) (Meister, 1994).

Adicional al reconocido rol antioxidante que posee esta vitamina, se destaca además, por ser cofactor en importantes reacciones enzimáticas que incluyen: biosíntesis de norepinefrina, hidroxilación del colágeno, amidación de hormonas peptídicas, metabolismo de la tirosina y regulación del factor HIF (Padayatty & Levine, 2016). También se ha descrito que vitamina C podría regular la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y colinérgica (Sandstrom & Rebec, 2007).

En el organismo, la vitamina C se incorpora a través del intestino mediante transporte activo, para luego ser distribuido ampliamente por el torrente sanguíneo. De esta forma, es capaz de concentrarse en distintos órganos, donde destacan la glándula adrenal, el hígado, bazo, hipófisis y en el cerebro (Rose, 1988).

En el plasma sanguíneo la concentración de vitamina C es cercana a 50 μ M, en su forma reducida que predomina a pH fisiológico, Ácido ascórbico o ascorbato (AA) y en su forma oxidada, Ácido dehidroascórbico (DHA), las concentraciones sanguíneas varían de 2 a 5 μ M (Rice, 2000).

1.5 Transporte de vitamina C y su fisiología en el sistema nervioso central (SNC).

La incorporación de vitamina C al organismo se realiza mediante dos mecanismos de transporte. Uno de ellos corresponde al transporte facilitado de la forma oxidada de vitamina C, DHA, mediante transportadores multifuncionales de hexosas: GLUTs (F. Nualart et al., 2014; F. J. Nualart et al., 2003). El segundo mecanismo, se encarga de mantener las diferentes concentraciones de ascorbato (AA) presentes en el organismo, mediante la existencia de los co-transportadores sodio-dependientes, conocidos como SVCTs. Se conocen dos isoformas de éstos últimos: SVCT1 y SVCT2, ambas se clonaron en el año 1999 por Tsukaguchi y cols. a partir de una biblioteca de cDNA de rata (Tsukaguchi et al., 1999).

El transportador SVCT1 es una proteína de 604 aminoácidos que está presente en el intestino, riñón e hígado; se relaciona con los tejidos epiteliales que están involucrados en la absorción de la vitamina C desde la dieta y la reabsorción renal (T. Castro et al., 2008; Harrison & May, 2009). Por su parte, SVCT2 se localiza en células metabólicamente activas como retina, páncreas, pulmón, ovario, entre otros (Padayatty & Levine, 2016).

SVCT2 es una proteína de 12 dominios transmembrana, con 592 aminoácidos y una masa molecular de 75 KDa. El análisis hidropático estima 12 dominios transmembrana, con extremos N-terminal y C-terminal, ubicados en el citoplasma (Tsukaguchi et al., 1999). Presenta además 2 sitios de posibles glicosilaciones y 5 sitios de posible fosforilación por proteína quinasa C (PKC) dos de los cuales están presentes en el extremo C-terminal (Liang, Johnson, Ma, Jarvis, & Wei-Jun, 2002; F. Nualart et al., 2014).

A nivel cerebral, se ha reportado *in vitro* que células de papiloma de plexo coroideo humano transportan eficientemente AA a través de SVCT2, sumado a esto, recientemente se determinó la localización de SVCT2 en la membrana baso-lateral de las células epiteliales de los plexos ploroideos (Ulloa et al., 2013; Ulloa et al., 2019). Por lo tanto, vitamina C en su forma reducida (AA) puede ser transportada a través de las células de los plexos coroideos, lo cual permite su llegada al líquido cefaloraquídeo (LCR), donde alcanza una concentración de 500

μM (Spector & Lorenzo, 1974). Desde el LCR, la concentración de AA se equilibra con el parénquima cerebral alcanzando concentraciones entre 200-400 μM y desde allí es transportado a los diferentes tipos celulares. Específicamente, se ha detectado la expresión de SVCT2 mediante RT-PCR en neuronas de la corteza cerebral, neuronas hipocámpales y cerebelo (Astuya et al., 2005; M. Castro et al., 2001; Garcia Mde et al., 2005; Tsukaguchi et al., 1999; Ulloa et al., 2013). Así como, mediante hibridación *in situ*, se ha descrito la expresión de SVCT2 en tanicitos hipotalámicos y la microglia (Garcia Mde et al., 2005; F. Nualart et al., 2014; F. Nualart et al., 2012).

AA atraviesa la membrana plasmática en contra del gradiente electroquímico, la energía para realizar este transporte proviene de la entrada de 2 moléculas de Na^+ por cada molécula de AA (Godoy et al 2006), por lo que este transporte ocurre de manera unidireccional (Savini, Rossi, Pierro, Avigliano, & Catani, 2008). En neuronas corticales se ha determinado una K_m aparente de 20 μM para SVCT2 (Caprile et al., 2009), lo que a concentraciones del parénquima cerebral, indica que el transporte de AA se encuentra saturado. Hasta la fecha se ha determinado una concentración de 10 mM en neuronas y de 1 mM en células gliales (Rice, 2000).

Respecto al transporte de la forma oxidada de vitamina C, DHA, se describió por primera vez en ovocitos de *Xenopus*, que los transportadores GLUT1 y GLUT3 tienen la capacidad de transportar DHA con K_m s de 1,1 y 1,7 mM, respectivamente. Posteriormente, se demostró en adipocitos de rata y oocitos de *Xenopus* el transporte de DHA a través de GLUT4, sin embargo, GLUT2 y GLUT5 no transportan esta molécula (Rumsey et al., 2000; Rumsey et al., 1997; Vera, Rivas, Fischbarg, & Golde, 1993). El transporte de DHA, a través de los transportadores facilitativos de glucosa, se debe principalmente a que la forma hidratada de DHA forma un hemiacetal bicíclico, el cual presenta una conformación tridimensional similar a la glucosa (Corpe et al., 2005).

En el cerebro GLUT1 y GLUT3 son los transportadores de glucosa más ampliamente caracterizados, tanto en muestras humanas como en análisis realizados en roedores (F. Nualart, Godoy, & Reinicke, 1999). GLUT1 se encuentra expresado principalmente en astrocitos, los plexos coroideos y en células endoteliales de los vasos sanguíneos que conforman la barrera hematoencefálica (BBB); durante el desarrollo postnatal se ha descrito que la expresión de este transportador es regulada por el crecimiento y estado nutricional del animal. Por su parte, GLUT3 ha sido caracterizado como el transportador de glucosa expresado en neuronas y su expresión aumenta significativamente con el aumento y maduración de la población neuronal (F. Nualart et al., 1999; Vannucci, 1994; Vannucci, Maher, & Simpson, 1997).

De esta manera, a nivel neuronal tanto AA como DHA pueden ser transportados gracias a la presencia de SVCT2 y GLUT3, respectivamente. Por el contrario, a nivel astrocítico, sólo DHA puede ser movilizado a través de GLUT1, estableciéndose así una importante diferencia entre neurona y astrocitos, frente al transporte de vitamina C.

1.6 Función de vitamina C durante el desarrollo cerebral.

Se ha estudiado en los últimos años el rol que podría tener vitamina C en el desarrollo cerebral embrionario, la necesidad de esta vitamina a través de este proceso se relaciona con su rol antioxidante, que combatiría el estrés oxidativo presente durante las etapas tempranas del desarrollo, resultado de la organogénesis y la maduración neuronal (Harrison & May, 2009; F. J. Nualart et al., 2003). Se ha determinado que las concentraciones de vitamina C son variables a lo largo del desarrollo, alcanzando una elevada concentración al final de la gestación en el cerebro de rata (E20) y cayendo progresivamente en el estado adulto (Kratzing, Kelly, & Kratzing, 1985). Luego, en la vida postnatal la concentración de AA tiene un nivel máximo al tercer día, donde la matriz cortical presenta mayor número de neuronas que de

células gliales, para luego ir disminuyendo al mismo tiempo que se inicia la gliogénesis cortical (Rice, 2000).

En el año 2002, Sotiriou y cols. generaron ratones knock-out para el gen que codifica para SVCT2 (Slc23a2), observaron que las crías se desarrollaban con normalidad en el útero, pero murieron a los pocos minutos de nacer. Los ratones presentaron problemas respiratorios y bajos niveles de AA en el parénquima cerebral, además, existieron hemorragias a nivel de la corteza cerebral. Este estudio evidenció la importancia que tendría el transportador durante el desarrollo embrionario y la entrada de AA al cerebro (Sotiriou et al., 2002).

Los niveles de AA se mantienen altos durante la embriogénesis y decrecen postnatalmente, sin embargo, la expresión relativa del ARNm y de la proteína SVCT2 en los estadios tempranos es menor de lo esperado, por lo que se ha sugerido un mecanismo adicional que permita la alta concentración de AA en los tejidos cerebrales embrionarios (Meredith, Harrison, & May, 2011). Los análisis cinéticos del ingreso de AA en cultivos primarios neuronales, muestran la existencia de dos constantes de afinidad, 8 y 103 μM . La primera se relaciona con lo previamente reportado para el transportador SVCT2 (Tsukaguchi et al., 1999), mientras que la segunda constante evidenciaría la presencia de un transporte alternativo de vitamina C, en neuronas embrionarias de ratón. Mediante diferentes métodos se logró demostrar la presencia de SVCT2 en las áreas ventricular y subventricular del cerebro fetal de rata, lo cual sumado a los análisis funcionales llevados a cabo en neuronas inmaduras, aisladas desde corteza cerebral o cerebelo; demuestran que SVCT2 se localiza en la membrana celular y está involucrado en el ingreso de vitamina C a éstas células (Salazar et al., 2014). De esta manera, el transportador estaría involucrado en la maduración neuronal regulando la diferenciación de precursores embrionarios corticales hacia neuronas y astrocitos.

1.7 Efecto de vitamina C en células indiferenciadas.

Si bien en la literatura existe bastante evidencia sobre el rol que tendría la presencia de AA a nivel cerebral durante el desarrollo embrionario, por su efecto en las células precursoras neurales, los reportes a la fecha se contraponen y dan pie a diferentes interpretaciones.

En el año 2003, precursores neurales corticales que fueron tratados con AA 200 μ M adoptaron morfología neuronal e incrementaron la amplitud de corrientes postsinápticas en miniatura (mEPSC), concluyendo que AA estaría involucrado en procesos de diferenciación y maduración neuronal (Lee et al., 2003). Adicionalmente, cuando la línea celular P19 (que posee características de células progenitoras) fue tratada con AA, se observó un incremento en la expresión de tubulina β III y SVCT2, acompañado de un aumento en el transporte de AA (Pastor et al., 2013). En 2007, Qiu y cols. estudiaron neuronas hipocampales embrionarias que provenían de ratones knock-out, para el transportador SVCT2, éstas desarrollaron un menor número de neuritas e incrementaron la susceptibilidad a daño oxidativo. Este efecto se relacionó entonces con la importancia que tiene SVCT2 en el mantenimiento de las concentraciones de AA a nivel cerebral. De esta manera, la muerte de las ratas knock-out podría explicarse por un déficit en la función de las neuronas individuales, formación de conexiones aberrantes dentro de la corteza y/o de otras áreas cerebrales o por falta de diferenciación neuronal (Qiu, Li, Weeber, & May, 2007). Menores son las evidencias que relacionan el estímulo de AA con la obtención de un tipo neuronal específico. En relación a esto, cuando se aíslan precursores desde la zona ventral del mesencéfalo, y son tratadas con AA 100 μ M, se obtienen mayoritariamente neuronas Th+, marca clásica de neuronas dopaminérgicas (Yan, Studer, & McKay, 2001). Recientemente, se ha descrito que AA induciría la generación de neuronas DA, debido a su función como cofactor de una familia de enzimas que regulan cambios epigenéticos, lo que finalmente, incrementaría la expresión tanto

de genes dopaminérgicos, como también de genes astrocíticos como Gfap y S100b (He et al., 2015; Kim et al., 2018).

Recientemente, Scheffer y colaboradores han descrito que células PC12 crecidas en presencia de NFG, inducen una morfología neuronal, la cual se ve disminuída al ser tratadas con concentraciones crecientes de AA (0.1-0.3 mM) y DHA (0.1-0.3 mM). Este efecto estaría relacionado con la presencia de productos de glicación terminal de proteínas (AGEs), como carboximetilisina (CML), la cual se encuentra aumentada en las células tratadas con AA y DHA por 24 horas (Scheffler et al., 2019). Hasta la fecha, ésta es la única evidencia que relaciona a la vitamina C con la disminución de neuritas durante el proceso de diferenciación neuronal.

Todas éstas evidencias apuntan a que AA podría regular e inducir procesos de diferenciación neuronal, sin embargo, en la última década las investigaciones se han enfocado mucho más en describir a AA como una molécula necesaria para inducir un fenotipo más indiferenciado, ya sea en un contexto de reprogramación celular o al realizar tratamientos con AA en células indiferenciadas (Gao et al., 2013; Wu et al., 2014).

En este contexto, se ha demostrado que vitamina C puede inducir la generación de células precursoras inducidas (iPCS), ayudando a su mantención y favoreciendo su proliferación. Esto podría deberse en parte a la reducción de los niveles de p53, la proteína supresora tumoral que provoca muerte celular (Esteban et al., 2010). El tratamiento con ácido ascórbico 2-fosfato, incrementa la proliferación de células mesenquimáticas humanas *in vitro* mediante la inhibición de HIF1 α y la activación de la actividad mitocondrial (Fujisawa et al., 2018). Recientemente, se ha descrito que ascorbato funciona como cofactor de una familia de dioxigenasas (proteínas TET), las cuales catalizan la hidroxilación de ácidos nucleicos, permitiendo el paso de 5-metilcitosina (5-mC) hacia 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), siendo esta reacción crucial para la activación de la demetilación del ADN (H. Chen et al., 2015; Minor,

Court, Young, & Wang, 2013). Particularmente, se ha determinado que AA incrementa y restaura la actividad de Tet2 en células madres hematopoiéticas y modelos murinos de leucemia *in vivo*, pero también podría regular la función de Tet1 y 3 (Agathocleous et al., 2017; Cimmino et al., 2017). Previamente, se ha descrito que existe una alta abundancia de 5-hmC en el cerebro y que sus niveles aumentan conforme ocurre la neurogénesis y el desarrollo postnatal (Hahn et al., 2013; Szulwach et al., 2011). Por lo tanto, AA podría funcionar como cofactor de algunas enzimas epigenéticas que permitan la reprogramación celular, la obtención de iPCS y la proliferación de células precursoras (Rony et al., 2015; Tran et al., 2015).

Independiente de la dualidad frente a los efectos de AA en células indiferenciadas, todas éstas evidencias nos sugieren que la expresión del transportador SVCT2 sería crucial durante el desarrollo pre y postnatal, con un rol trascendental en mantener las concentraciones de AA primero, en las células precursoras, y posteriormente, a nivel neuronal para permitir su correcto desarrollo, maduración y función.

1.8 Acoplamiento neurona-astrocito y reciclamiento de vitamina C

Los astrocitos son las células gliales más numerosas en el SNC y se forman a partir de la misma GR que da origen a las neuronas, esto ocurre durante los últimos días de desarrollo embrionario (E16-E21) y proliferan localmente en la corteza cerebral entre P2-P20 (Ge, Miyawaki, Gage, Jan, & Jan, 2012; Tabata, 2015). La primera población astrocítica se posiciona en la zona marginal de la corteza cerebral, donde forman una capa de astrocitos marginales, que ya en la primera semana postnatal, poseen finos procesos distales que generan una densa red, contactando principalmente zonas de alta densidad dendrítica y axonal al interior de la corteza cerebral (Gao et al., 2013; Olude, Mustapha, Aderounmu, Olopade, & Ihunwo, 2015).

Entre la semana 3-4 postnatal, los astrocitos obtienen una morfología madura (Freeman, 2010). Durante éstas primeras semanas postnatales, la población astrocítica extiende finos procesos que toman contacto con las sinápsis de las neuronas generadas, las cuales sufren procesos de maduración neuronal (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018). Durante los últimos años se han intentado dilucidar los mecanismos que relacionen la maduración astrocítica y la neuritogénesis, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos específicos por los cuales los astrocitos podrían regular la morfología neuronal.

El acoplamiento metabólico neurona-astrocito, es un concepto que ha permitido comprender distintos mecanismos por los cuales el astrocito brinda sustento energético a la neurona, también regula procesos como la sinápsis glutamatérgica, captando el glutamato y devolviendo glutamina a la neurona (Magistretti & Pellerin, 1999). Además, el astrocito entrega lactato a la neurona en ocasiones de alta actividad neuronal y permite el reciclamiento de glutatión (Magistretti & Allaman, 2015).

Respecto a vitamina C, neuronas y astrocitos poseen características diferentes frente al transporte y estado redox intracelular de esta molécula, por lo tanto, éstos dos tipos celulares se acoplan para mantener la disponibilidad de la forma reducida, AA.

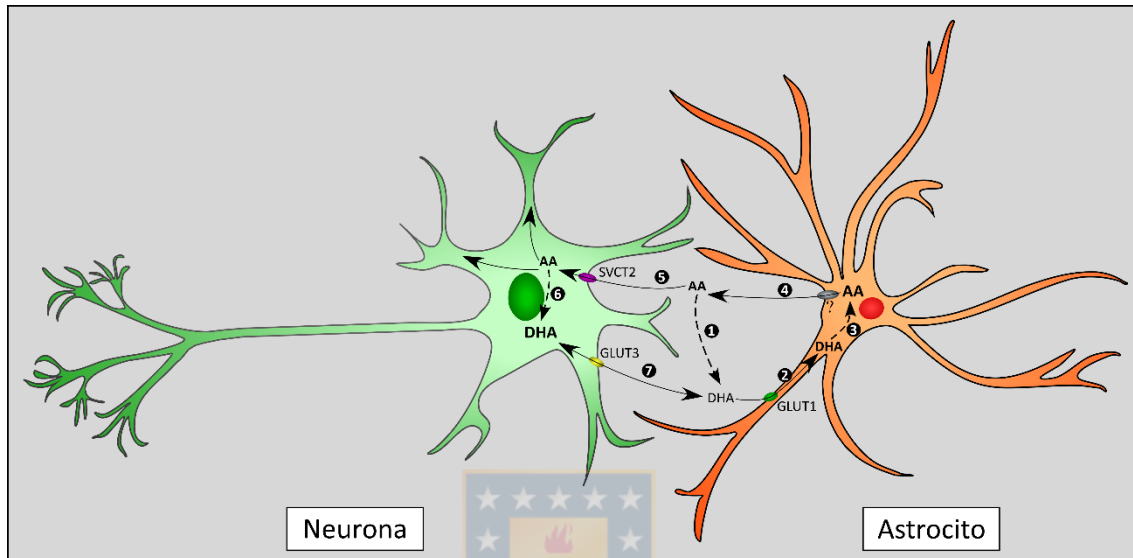
Por una parte las neuronas captan AA a través de SVCT2, estudios *in vitro* muestran que neuronas corticales expuestas a AA lo oxidan intracelularmente hasta en un 70%. En contraparte, los astrocitos, que sólo pueden captar DHA a través de GLUT1, al ser tratados con AA lo mantienen reducido intracelularmente en un 80% (Cisternas et al., 2014). Esto se explicaría por las altas concentraciones de glutatión que poseen los astrocitos, lo que les brinda un alto poder reductor (Rice & Russo-Menna, 1998). Recientemente, se ha demostrado que la acumulación de DHA en neuronas corticales induce importantes cambios metabólicos, dentro de los cuales destacan la disminución de la glicólisis, acompañado de un incremento en la actividad de la vía de las pentosas (PPP) y la captación de lactato (Cisternas et al., 2014).

Posteriormente, se describió que células de cáncer de colon incrementan la actividad de PPP y disminuyen significativamente los niveles de GADPH, al ser expuestas a DHA (Yun et al., 2015). Por otra parte, en neuronas corticales expuestas a estrés oxidativo, después de tratamiento con peróxido de hidrógeno, la acumulación intracelular de DHA induce muerte celular de tipo necroptótica, lo cual puede ser revertido en presencia de astrocitos (Ferrada, Barahona, Salazar, Vandenabeele, & Nualart, 2020; Garcia-Krauss et al., 2015).

De esta manera, es necesario un mecanismo de acoplamiento neurona-astrocito que permita la regulación de las concentraciones de AA y DHA dentro de la neurona. Así nace el concepto de *reciclamiento de vitamina C* (F. Nualart et al., 2014; F. J. Nualart et al., 2003; Rice, 2000), donde las neuronas captan AA a través de SVCT2, lo oxidan intracelularmente hacia DHA y el DHA es liberado al medio extracelular a través de GLUT3 (Esquema 2 5-7). Desde allí es captado por el astrocito a través de GLUT1, el cual puede reducir el AA hacia DHA y mantener reducido al AA, debido a su poder reductor; luego AA puede salir al medio extracelular y ser utilizado nuevamente por la neurona (Esquema 2 1-4) (F. Nualart et al., 2014).

Este mecanismo sólo ha sido descrito en el contexto del cerebro adulto, donde neuronas y astrocitos maduros se acoplan principalmente para mantener los niveles de AA disponibles para la neurona y prevenir procesos de muerte celular. Sin embargo, se desconoce el rol que podría tener durante el desarrollo postnatal temprano del cerebro.

En este periodo, las neuronas corticales sufren procesos de maduración, que involucran finos cambios morfológicos, los cuales podrían ser regulados por el mecanismo de reciclamiento de vitamina C.



Esquema 2. Reciclamiento de vitamina C.

Mecanismo de acoplamiento entre neurona (verde) y astrocito (naranja), para el reciclamiento de vitamina C. Bajo condiciones fisiológicas, existe una constante producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden oxidar AA a DHA (1) el cual es captado preferentemente por el astrocito a través de GLUT1 (verde, 2). Debido al alto poder reductor presente en el astrocito, DHA puede ser reducido a AA (3), molécula que puede ser liberada al espacio extracelular (gris, 4). AA puede ser ingresado a la neurona, a través de SVCT2 (violeta, 5). Una vez oxidada a DHA (6), sale de la neurona a través del transportador GLUT3 (amarillo, 7), para evitar la acumulación intracelular de DHA. De esta forma, DHA puede ser nuevamente captado por el astrocito, completando el mecanismo de reciclamiento. Modificado de (F. Nualart et al., 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios recientes demuestran la existencia de hipovitaminosis en los países de occidente, en donde la mala alimentación se encuentra estrechamente relacionada con el estrato socioeconómico de pertenencia. En Chile, las mujeres de los estratos socioeconómicos bajos presentan una menor concentración de vitamina C sanguínea, lo cual pone en duda si las madres durante el período de lactancia exclusiva logran entregar a través de la leche materna las concentraciones suficientes de AA al recién nacido. Hasta la fecha, no existen estudios en nuestro país sobre concentraciones de AA en leche materna, ni si los niños y niñas durante los primeros días de vida logran tener las concentraciones adecuadas de esta vitamina a nivel sanguíneo, y por consecuencia, a nivel cerebral.

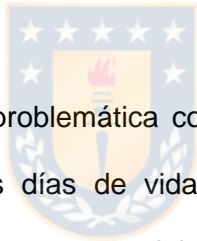
Nuestro trabajo preliminar y distintos modelos *in vitro* demuestran que la presencia de AA en cultivos de células progenitoras neuronales induce fuertemente un fenotipo neuronal. Así como también, se sugiere que la presencia del transportador de AA, SVCT2, es necesaria para un correcto desarrollo del SNC.

En el contexto del desarrollo postnatal temprano se ha descrito que existe un fuerte incremento en la expresión del transportador SVCT2 en la corteza cerebral, lo que nos sugiere nuevamente, la importancia que tendría AA, pero en un contexto más tardío de diferenciación. Durante este período las neuronas generadas previamente en el desarrollo embrionario están sufriendo importantes cambios morfológicos que se relacionan con procesos de maduración y sinaptogénesis. El incremento en la presencia de SVCT2 involucra que las neuronas estarían captando AA durante los primeros días de desarrollo postnatal, molécula que debería ser oxidada a DHA y que normalmente es liberada al espacio

extracelular. Una vez que DHA aumenta su concentración extracelular, puede ser captada por el astrocito, célula que recicla la vitamina C debido a que tiene un alto poder reductor.

La interacción neurona-astrocito permite el *reciclamiento de la vitamina C en el cerebro maduro*, sin embargo, se desconoce la existencia de este mecanismo durante el desarrollo postnatal temprano, cuando las neuronas desarrollan un fuerte proceso de arborización.

En base a éstas evidencias, nos planteamos la siguiente hipótesis: **la relación en la concentración neuronal de AA/DHA, establecida por el reciclamiento de vitamina C entre neuronas y astrocitos, mantiene la formación de procesos neuríticos durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebral.**



Esta tesis abordará esta problemática con el fin de dilucidar la relevancia de este mecanismo durante los primeros días de vida, y así comprender de mejor manera la importancia de la vitamina C durante este crucial período del desarrollo.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar si la forma reducida de vitamina C, AA, estimula la formación de procesos neuríticos, los cuales requieren del mecanismo de reciclamiento de la vitamina C para depurar el DHA del medio extracelular, molécula que inhibe el desarrollo de neuritas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar si AA estimula la formación de procesos neuríticos en células progenitoras neurales *in vitro* y estudiar el efecto que ejerce DHA en este modelo.



2. Determinar si el reciclamiento de vitamina C permite la mantención de los procesos neuríticos formados por el estímulo de AA, en un modelo *in vitro*.

3. Definir si el reciclamiento de vitamina C *in vivo* regula la formación de los procesos neuríticos durante el desarrollo postnatal temprano de la corteza cerebral.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 17 días de gestación y 1 a 5 días postnatal de ambos sexos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25°C, fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad, recibieron acceso libre al agua y fueron alimentados diariamente. Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del National Institutes of Health, Bethesda, MD y por el manual de Bioseguridad (2008) de CONICYT.

5.2 Cultivos celulares

Los cultivos celulares fueron realizados en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 5% v/v en nitrógeno líquido.

5.3 Cultivo de células HL60

Correspondiente a una línea celular humana promielocítica, éstas células fueron crecidas en suspensión en frascos de 75 cm² utilizando con medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 10% v/v de SBF, glutamina 2mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y fungizona 2,5 µg/ml. Se realizó cambio de medio cada 2 días y se mantuvieron a una densidad inferior de 1x10⁶ cél/ml.

5.4 Cultivo de células U87

Línea celular que se origina de una glioblastoma humano que presenta características astrocíticas y crece en adhesión. fueron cultivadas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro con medio DMEM suplementado con SBF 10% v/v, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y fungizona 2,5 µg/ml, con cambio de medio de cultivo cada 2 días.

5.5 Cultivo primario de astrocitos corticales

Los cultivos primarios de astrocitos fueron preparados a partir de ratas de 1-4 días post natal, las cuales fueron anestesiadas por frío y posteriormente sacrificadas por dislocación cervical para la obtención del cerebro. Utilizando lupa estereoscópica se extrajeron las cortezas cerebrales y se eliminaron las meninges, las cortezas fueron cortadas en pequeños trozos en presencia de tripsina 0,25% p/v (Gibco) y EDTA 0,20% p/v (Sigma). Luego se sometieron a disgregación enzimática por 15 min a 37°C. Posteriormente, se realizó disgregación mecánica en medio completo DMEM suplementado con SBF 10% v/v, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y fungizona 2,5 µg/ml. Las células obtenidas fueron sembradas en placas de cultivo a una densidad aproximada de 1.5×10^5 células/cm². El primer cambio de medio se realizó 3.5 horas de realizada la disección para remover los restos celulares adheridos a la placa y restos que queda en suspensión, este fue realizado utilizando medio DMEM completo. Se realizó cambio de medio cada 2 días, los cultivos fueron mantenidos como máximo hasta 7 días *in vitro*.

5.6 Cultivo primario de neuronas corticales

Los cultivos primarios fueron obtenidos de embriones de ratas *Sprague-Dawley* de 17 días de gestación y mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en incubadora. La corteza cerebral fue diseccionada bajo lupa estereoscópica, se retiraron las meninges y el tejido se sometió a

disgregación mecánica enzimática en presencia de tripsina 0,25% p/v (Gibco)/EDTA 0,20% p/v (Sigma). Luego, se llevó a cabo digestión enzimática a 37 °C durante 10 minutos, la cual fue detenida agregando medio MEM completo con 10% de SBF (Gibco), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y fungizona 2,5 µg/ml (Gibco). El tejido disgregado se resuspendió en medio MEM completo, la estimación de viabilidad celular fue realizada por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v. Las células obtenidas se sembraron en placas de cultivo de 12 y 24 pocillos cubiertos previamente con poli-L-lisina 0,2 mg/ml (Sigma-aldrich®), a una densidad aproximada de 1×10^5 células/cm² por 30 min, al cabo de los cuales se reemplazó el medio de cultivo por medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), glutamina 2mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 mg/mL y fungizona 2,5 mg/mL. Las células fueron mantenidas en cultivo por 7 días, se realizó cambio parcial de medio cada 5 días.



5.7 Cultivo primario de neuroesferas

Los cultivos primarios fueron obtenidos de ratas Sprague-Dawley de 17 días de gestación y mantenidos a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora. Luego de aislar el encéfalo, el área de la corteza cerebral se obtuvo por microdissección. Posteriormente, el tejido se sometió a disgregación mecánica en medio de proliferación para neuroesferas (Stem Cells Technologies Inc), que consta de NeuroCult® NS-A Proliferation Kit, suplementado con EGF 20 ng/ml, FGF 10 ng/ml y heparina 2 µg/ml (NeuroCult completo) (Oyarce et al., 2018). Luego se descartó el tejido no disociado y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 ml el cual fue centrifugado a 800 rpm por 5 min. El pellet fue resuspendido y se realizó el recuento y la estimación de la viabilidad celular que fue realizada por el método de exclusión con azul de tripán 0,2% p/v. Se sembraron en frascos de 25 cm² con 5 ml de medio de proliferación a una densidad de 100.000 cél/cm², 12 horas luego del sembrado se tomaron los

5 ml presentes en los frascos originales y se sembraron en nuevos frascos de 25 cm² estériles para asegurar la limpieza del cultivo.

La condición de adhesión de las NE se realizó tratando previamente cubreobjetos de 12 mm de diámetro con poli-L-lisina durante 20 minutos. Se recolectó el medio de los frascos de 25 cm² con las NE en suspensión y se sembraron en placas de 12 o 24 pocillos con los cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

5.8 Suplementación con Ácido retinoico.

Se utilizó Ácido todo-*trans*-retinoico (Sigma-aldrich®) el cual fue resuspendido en DMSO. La suplementación de las NE, ya sea, recién adheridas a cubreobjetos con poli-L-lisina (condición de adherencia) o en frasco de 25 cm² (condición de suspensión), se realizó al día 2 *in vitro*. La concentración utilizada fue de 10 µM y se utilizó como control la suplementación con el mismo volumen de DMSO, sólo se realizó una suplementación al 2DIV y se mantuvieron las NE en cultivo durante 12, 24, 48 y 72 horas post-suplementación.

5.9 Suplementación con Ácido ascórbico.

La suplementación con Ácido ascórbico se realizó utilizando una concentración de 100 µM de L-ácido ascórbico (Sigma), preparada al momento de ser utilizado en tampón salino PBS frío pH 7,4. Las neuroesferas fueron suplementadas a las 12, 24 y 48 horas, como control, se suplementó con el mismo volumen de PBS, solvente del AA.

5.10 Suplementación con DHA

Para realizar el tratamiento con DHA se utilizó L-ácido dehidroascórbico dimérico (Sigma Aldrich) el cual se agregó a los cultivos a las 24 y 48 horas post-adhesión a una concentración final de 100 µM.

5.11 Co-cultivos

En el caso de los co-cultivos con células HL60, a las 24 horas de tratamiento se agregó directamente a cada pocillo una suspensión de células HL60 en 100 μ L de medio NeuroCult completo para alcanzar una densidad de 100.000 $\text{cél}/\text{cm}^2$. Para la realización del ensayo de medio condicionado con células HL60, éstas fueron incubadas en medio NeuroCult completo durante 48 horas, luego se centrifugaron a 100 g x 5 min para remover las células, y el medio sobrenadante fue agregados a las diferentes condiciones de cultivo. Para los cultivos mixtos realizados con células U87 y astrocitos corticales, 2 días previos a realizarse el co-cultivo las células fueron sembradas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ $\text{cél}/\text{cm}^2$ en placas de 24 pocillos con vidrios de 18 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina. Cumplidos los 2 primeros días *in vitro* de las NEs, éstas fueron sembradas directamente en los vidrios en donde fueron crecidas las células en monocapa. Para la realización de las inhibiciones, las células fueron incubadas con WZB117 (Sigma Aldrich) 5 μ M durante 24 horas previas a realizarse el sembrado de las NEs o las células fueron incubadas con citocalasina B (Sigma Aldrich) 20 μ M durante 5 minutos a 37°C previo al sembrado de las NE.

5.12 Citometría de flujo

Se obtuvieron las muestras a partir del cultivo de NE a los distintos tiempos de tratamiento, las células fueron disociadas mediante tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C, luego fueron centrifugadas por 10 minutos a 1.200 rpm. El pellet fue resuspendido en medio DMEM_{F12} completo (10% v/v SBF (Gibco), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml y fungizona 2,5 μ g/ml (Gibco)) en donde se incubaron las siguientes sondas: Intracellular GSH (1X, Immunochemistry Technologies), CellROX® (1 μ M, Invitrogen), SYTOX™ AADvanced™ (1 μ M, Invitrogen) o SYTOX® Green (1X, Invitrogen). Se utilizó el equipo BD FACSAria III, cada

análisis se realizó en duplicado y se adquirieron 20.000 eventos. Los niveles de GSH, ROS y viabilidad celular fueron monitoreados según la intensidad de fluorescencia detectada en el canal APC o FITC según correspondiera. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo (Tree Star).

5.13 Viabilidad celular.

Para medir la viabilidad de las células presentes en los cultivos de NE posterior al tratamiento de 72 horas con AA o AR, se utilizó el kit Cell Proliferation kit (XTT) (Biological Industries). Para esto se sembraron 500 μ L de medio de proliferación que contenían NE de 2DIV en cada pocillo de placas de 24 wells previamente tratados con poli-L-lisina. La medición se llevó a cabo a las 12 y a las 72 horas post-tratamiento siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.



5.14 Medición de viabilidad celular mediante IncuCyte®

Para realizar estos análisis las NE fueron sembradas en placas de fondo ultra transparente, grado microscópico, de 24 pocillos, en presencia de la sonda SYTOX® Green (1X, Invitrogen). Las imágenes fueron adquiridas en el equipo IncuCyte®S3 el cual fue configurado para tomar 4 fotos por cada pocillo (se consideraron 4 campos por pocillo, tomándose 1 foto por cada uno de ellos) con un aumento de 10X cada una hora, por un período de tiempo de 72 horas. Posterior a esto, las imágenes fueron procesadas utilizando el software IncuCyte S3 y el módulo básico que permite analizar la cantidad de objetos que presentan la fluorescencia verde respecto del total de células identificadas mediante contraste de fase. IncuCyte®S3 se puede encontrar en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción.

5.15 Análisis inmunocitoquímico.

Para estos estudios las células fueron cultivadas en placas de 12 o 24 pocillos a una en vidrios de 18 o 12 mm de diámetro. En el caso de las células HL60 se utilizaron vidrios previamente tratados con poli-L-lisina en donde las células fueron adheridas durante 30 minutos previos a la fijación. Primero, las células fueron lavadas con tampón PBS 1X estéril y fueron fijadas durante 30 min en paraformaldehído al 4% (Merck) preparado en el mismo tampón. Posteriormente, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 (Sigma) al 0.2% por 10 min, y se incubaron con el primer anticuerpo (Tabla 1) diluído en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) BSA 1%, en cámara húmeda durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron tres veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y se incubaron con el segundo anticuerpo (Tabla 2) marcado con un fluoróforo durante 2 h, para realizar marcaje nuclear se utilizó Hoechst 33342 (1:1000, Invitrogen) el cual fue incubado junto con el segundo anticuerpo. Una vez terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón Tris-fosfato y se realizó el montaje con solución líquida de montaje (DAKO). Como control negativo se utilizó el mismo procedimiento pero en ausencia del primer anticuerpo. Las muestras fueron analizadas utilizando microscopía confocal convencional en el equipo confocal Zeiss (Confocal NLO 780, Carl Zeiss, Germany) y para los estudios de súper-resolución se utilizó el equipo SIM-SR (ELYRA S1, Carl Zeiss, Germany). Todo este equipamiento se encuentra en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción. <http://cmabiobio.cl/>.

5.16 Determinación de AA intracelular

Las determinaciones se realizaron en NE cultivadas y tratadas con AA durante 12, 24, 48 y 72 horas, utilizando el kit EnzyChrom™ Ascorbic Acid Assay Kit (BioAssay Systems EASC-100). Para ello, se sembraron 2 mL de medio con NE de 2DIV en cada pocillo de placas de 6 pocillos previamente tratados con poli-L-lisina. El protocolo se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.17 Análisis de transporte

Para caracterizar el transporte de vitamina C se utilizó 100 μ M de ácido-L-[¹⁴C]-ascórbico (actividad específica 2,6 mCi/mmol, PerkinElmer, USA) en presencia de 0,1 mM DTT, para los ensayos de captación de DHA, esta misma concentración fue oxidada utilizando ascorbato oxidasa 0,5 U/ μ L durante 5 minutos a 37°C. Para éstos análisis las NE o las células HL60, U87 y astrocitos corticales, fueron sembrados en placas de 6 pocillos con 2 mL de medio; previo a realizar los experimentos se seleccionaron los pocillos que mostraron un sembrado homogéneo. Las células fueron incubadas con 500 μ L/pocillo de tampón de transporte (15 mM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, and 0.8 mM MgCl₂) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se retiró el tampón, se agregaron nuevamente 500 μ L del mismo a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos en el caso de AA y 10 minutos en los ensayos de DHA. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el proceso de transporte fue detenido con 500 μ L de tampón de transporte conteniendo HgCl₂ 0,2 mM. Finalmente, las células fueron lisadas con 400 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, SDS 0,2% p/v) y el lisado fue mezclado con 4 mL de líquido de centelleo (EcoScint, National Diagnostics). La incorporación de radiactividad a las células fue medida en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 4810 TR

(Cisternas et al., 2014). Además, para cada condición se realizó el recuento celular, utilizando el método de exclusión con azul tripán 0,2% p/v.

5.18 Extracción de ARN.

El ARN de las NE de cultivo primario de 4 días *in vitro* sin tratamiento, células HL60, U87 y astrocitos corticales en cultivo, fue extraído homogenizando las muestras en 500 µL de Trizol® e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con 100 µL de cloroformo, agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C, para separar las fases. Una vez recuperada la fase acuosa de cada muestra, se agregaron 250 µL de isopropanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente para luego centrifugar nuevamente a 12.000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado dos veces con 500 µL de etanol 70% v/v y centrifugado a 7.500 x g por 5 min a 4°C. El sobrenadante alcohólico fue eliminado y el pellet fue resuspendido en volúmenes desde 10 a 50 µL de agua libre de ARNasa. El ARN total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza se midió por la relación 260/280 nm. Los extractos de ARN total de las NE tratadas en tiempo dependencia fueron aislados mediante el kit Nucleospin®RNA XS de acuerdo a los protocolos del fabricante (Macherey-Nagel).

5.19 Transcripción reversa del ARN total (RT).

El ARN total fue utilizado para sintetizar ADNc utilizando el RevertAid® H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). En un volumen final de 20 µl, se utilizó 2 µg del ARN total de las muestras y se incubó con 0,5 µg de OligodT, denaturado a 70 °C por 5 min y luego se llevó a hielo por 2 min. Inmediatamente después, se agregó el tampón de

transcripción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U de inhibidor de ARNasa y luego se incubó por 5 min a 37 °C. Finalmente, a la mezcla de reacción se agregó 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV y se incubó a 42 °C por 1 hora. Luego, una vez finalizada la reacción, la muestra fue calentada durante 10 min a 70 °C. En los controles negativos, se utilizaron las mismas muestras tratadas con el mismo protocolo de transcripción pero sin añadir la enzima transcriptasa reversa.

5.20 Amplificación del ADNc por PCR.

La reacción de PCR del ADNc fue realizada en un volumen final de 12,5 µl en un termociclador ProFlex PCR system (Life Technologies) y contenía los partidores específicos (0,2 µM de cada uno) (Tabla 2), Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8% v/v, MgCl₂ 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno), Taq ADN polimerasa 0,31 U (Fermentas) y 1 µl del ADNc. El programa de PCR consistió en una incubación inicial de 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50-65 °C (dependiendo de los partidores) por 30 segundos y 72 °C por 30-90 segundos. Finalmente, el programa realizó una extensión final de 7 min a 72 °C. Todos los cADNs utilizados fueron testeados con partidores específicos para β-actina y/o ciclofilina. Los partidores usados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa Oligo Primer®, teniendo en cuenta su T_m, el porcentaje de GC y la formación de dímeros y loops (Tabla 2).

5.21 Electroforesis en geles de agarosa.

Para la identificación de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa 1,2% p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se utilizó tampón de carga 6X que contenía glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,5% p/v en tampón

TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM). Como estándar de peso molecular se sembraron 0,5 µg de un estándar de 100 pares de bases (pb) (Thermo Scientific). Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 100 V por 35 min en tampón TAE en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN en el gel fueron visualizados utilizando GelRed staining (1X, Biotium), en un transiluminador de luz ultravioleta.

5.22 RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

Este ensayo fue realizado en muestras de NE obtenidas de cultivo primario y tratadas según el protocolo de tiempo dependencia (12 y 48 horas). Para ello, la extracción del ARN total y la transcripción reversa fueron realizadas de la misma forma que para el RT-PCR convencional. La cuantificación del ARNm de SVCT2 fue realizada en forma relativa al gen de referencia β -actina. Para la cuantificación se adaptaron los protocolos utilizados para los partidores de RT-PCR convencional (Tabla 2) y se aplicó el kit “Brilliant®SYBR® Green QPCR master mix” (Stratagene) que utiliza SYBR green para la detección de amplicones. Se utilizó el equipo Mastercycler epgradient realplex2 (Eppendorf). Se realizaron curvas de calibración, con diluciones seriadas, de una de las muestras para determinar la eficiencia de las reacciones. Para cada gen, la cuantificación se realizó comparando los ciclos que eran requeridos para lograr una amplificación sobre el ciclo umbral (Ct); esto en relación al número de ciclos requeridos para amplificar un de referencia, sobre su ciclo umbral. Los resultados fueron graficados aplicando el método $\Delta\Delta C_t$ s, donde se expresa la expresión relativa de los genes de interés sobre las muestras control.

Tabla 1. Partidores utilizados en RT-PCR convencional y qRT-PCR.

Nombre partidor	Secuencia (5'- 3')	Sentido(*)	Producto (pb)
mrSVCT2	TGCCAGGAAGGGTGTACTTC	SN	255
mrSVCT2	CCGGTACCAAATATGCCATC	AS	
rGLUT1	TCAAACATGGAACCACCGCT	SN	203
rGLUT1	AGAAACCCATAAGCACGGCA	AS	
hGLUT1	GTGGAGACTAAGCCCTGTCTG	SN	200
hGLUT1	GATGGGAAGGGGCAAATCCT	AS	
Ciclofilina	ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC	SN	239
Ciclofilina	ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC	AS	

5.23 Western Blott

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de células U87, HL60, astrocitos corticales y neuroesferas utilizando buffer de lisis NP-40 con inhibidor de proteasas (Cell signaling #5872). Las muestras fueron centrifugadas 10 min a 4°C a 12.000 rpm, se rescató el sobrenadante y se realizó la cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford. Las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE 10% en donde se cargaron entre 30 a 70 ug dependiendo de la proteína a analizar, posteriormente fueron transferidas a una membrana PVDF (0,45 µm, Immobilon-P, Merck Millipore). Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau-S 0,2% p/v para confirmar

la correcta transferencia de las proteínas. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche descremada 5% p/v en tampón TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) y Tween-20 0,05% v/v (TBS-TL) durante 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el primer anticuerpo (Tabla 1), diluído en TBS-TL por 12 h a 4°C. Terminada esta incubación, la membrana fue lavada con TBS-T y bloqueada con TBS-TL. La membrana fue incubada por 2 h con un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa diluído en TBS-TL. Una vez finalizada la incubación, la membrana fue lavada con TBS-T y luego revelada con un sistema de detección quimioluminiscente (Western Lighting® Plus-ECL Perkin Elmer).

5.24 Inmunodetección de carboximetil-lisina (CML) y proteínas carboniladas

La determinación de los niveles de CML y proteínas carboniladas intracelulares fue realizada por inmunoblot usando anticuerpo primario anti-CML (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) y el kit de detección de oxidación de proteínas OxyBlot™ (Chemicon International, Temecula, CA), respectivamente. Los lisados celulares fueron obtenidos desde las diferentes condiciones de tratamiento de NE adheridas utilizando CellLytic™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), las proteínas fueron cuantificadas mediante el método BCA utilizando BSA como estándar de proteínas (Smith et al., 1985). Las proteínas (15 µg) fueron derivatizadas hacia 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por la incubación con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH). Para análisis de SDS-PAGE y CML, 22,5 µg de proteínas fueron calentadas durante 5 minutos en buffer Tris 62,5 mM pH 6,8 con 2% SDS, 10% glicerol y 100 mM de β-mercaptoetanol como agente reductor más trazas de azul de bromofenol como marcador de carga. Todas las muestras fueron separadas en gel de poliacrilamida al 12% por electroforesis. Las muestras en SDS-PAGE fueron teñidas con solución de azul brillante de Coomassie R-250 (Biorad, USA) y luego lavadas con solución de ácido metanol-acético. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Pierce, Rockford, IL, USA) por 60 minutos a 100 V. Luego,

las membranas fueron incubadas con 1% de BSA y PBSA-Tween 20 (0,05%) durante toda la noche. Para los análisis de CML, se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-CML (1:1000) en PBS-Tween 0.05% con BSA 1% (solución de bloqueo) durante 1 hora. Las muestras derivatizadas hacia DNP fueron incubadas con el anticuerpo policlonal específico para el motivo DNP (1:5000, conejo) durante 1 hora en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS-Tween 0,05%, las membranas fueron incubadas con IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:10000) dirigido contra el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación con reactivo quimioluminiscente (Western Lightning chemiluminescence reagent, Perkin Elmer-Life Sciences, Boston, USA) las membranas fueron expuestas a un film ECL (hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Les Ulis, France). El escaneo de los films se hizo con Hewlett Packard Image Scanner. La intensidad de las señales se cuantificó con ImageJ software (NIH). Todos los análisis se hicieron al menos en triplicado y fueron expresados como el promedio \pm SD.

5.25 Producción de lentivirus EGFP

El lentivirus generado corresponden a una versión modificada del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Naldini et al., 1996). Una falla en la replicación del virus y la utilización de 4 plásmidos que contienen los genes virales, le otorga una alta bioseguridad al proceso de obtención de los lentivirus. Para obtener las partículas lentivirales se hicieron transfecciones transientes en células HEK293T. Para esto $1,8 \times 10^7$ células fueron sembradas en placas de 15 cm de diámetro (Corning Costar) utilizando 22 ml del medio completo descrito anteriormente. Luego de 6 horas sembradas las células, se realizó un cambio de medio completo y 2 horas después, se realizó la co-transfección de los 4 plásmidos. El constructo pCMVdR8.74, contiene la secuencia RRE que codifica para los genes gag y pol del VIH-1; el constructo pRSV-Rev, codifica la proteína Rev; el constructo pMD2.VSVG, produce la

glicoproteína G del virus de estomatitis vesicular (que le otorga tropismo neuronal a los lentivirus). Para la formación del lentivirus control se utilizó el vector de transferencia (pRRLsin.PPTs.hCMV.GFPpre) que codifica la proteína fluorescente verde (EGFP) como gen reportero. La co-transfección se realizó utilizando el método de precipitación del ADN con fosfato de calcio (C. Chen & Okayama, 1987). Las células co-transfectadas se incubaron en estufa de cultivo a 37 °C toda la noche, luego de lo cual, se realizó un cambio a medio completo. Pasadas 48 horas, los 22 ml del medio de cultivo conteniendo los distintos lentivirus fue recogido, centrifugado a 2500 rpm x 5 min y filtrado a través de filtros de 0,45 µm (Advantec®). El filtrado fue alicuotado y almacenado a -80 °C hasta utilizar. Para la titulación de los lentivirus se sembraron 3.5×10^4 células HEK293T en cubreobjetos y medio completo. Luego de 8 horas sembradas las células se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-8} de cada lentivirus y se transdujeron las células. A las 12 horas se realizó cambio del medio y 48 horas más tarde las células fueron fijadas con PFA 4%, para luego ser montadas en medio de montaje para fluorescencia y observadas por microscopía. La cosecha del virus control EGFP utilizada en esta tesis mostró una titulación de 10^{-7} .

5.26 Ensayos *in vivo*

Los estudios *in vivo* fueron llevados a cabo en ratas de 5 días postnatales, las cuales fueron sometidas a una inyección intracortical en la zona externa de la corteza cerebral. Se utilizaron 3 tipos de inyección: inyección de 4 µL del lentivirus EGFP (control), lentivirus EGFP mezclado en razón 1:1 con el inhibidor WZB117 (Sigma Aldrich) o lentivirus EGFP mezclado con DHA hasta llegar a una concentración de 100 µM, éstas últimas en un volumen final de 6 µL. Los animales fueron anestesiados por frío durante 3 minutos en hielo, luego se realizó la inyección trazando una línea imaginaria entre el ojo izquierdo y la intersección de las suturas sagitales y coronales, punto conocido como "*Bregma*". Se buscó el punto medio de esa línea realizando

la punción a 1,5 mm de profundidad, esta fue realizada a mano alzada con una jeringa Hamilton biselada de uso exclusivo para este procedimiento. Luego de la inyección los animales fueron mantenidos en una caja separada de la madre a 37 °C para su recuperación, cuando recuperaron la movilidad fueron devueltos a la caja en donde estaba la madre. Fueron monitoreados durante 72 horas post-inyección siguiendo el procedimiento de supervisión y punto final de animales postnatales aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de forma diaria para evitar dolor y angustia a causa del procedimiento. En cada camada se inyectaron entre 2 a 3 animales por condición, y se utilizaron al menos 3 camadas diferentes para realizar los estudios. Cumplidas las 72 horas, al día P8, los animales fueron sacrificados por decapitación y se realizó la extracción de su cerebro.

5.27 Fijación

Para la obtención de cerebros de ratas 5 u 8 días post-natal (P5-P8) los animales fueron anestesiados con mezcla de anestésico (ketamina 40% v/v, xilacina 40% v/v y pacifor 20% v/v) la cual fue inyectada intraperitonealmente una vez cumplido el tiempo de tratamiento correspondiente. Posteriormente, los animales fueron perfundidos transcardialmente con NaCl 0,9% seguido de paraformaldehído (PFA) 4% y luego decapitados para extraer su cerebro. Se realizaron cortes frontales del tejido y se mantuvieron en PFA por al menos 48 h en inmersión, luego se realizó el proceso de corte en vibrátomo (Vibratome line, Leica VT 10005) para obtener cortes de entre 80-150 μ m. Para localizar el área de inyección y obtener cortes adyacentes, se montaron cortes seriados (1 cada 5 cortes) y se observaron al microscopio. Los cortes positivos para la transducción fueron seleccionados para realizar análisis de inmunocitoquímica y microscopía confocal.

5.28 Inmunofluorescencia

Los cortes fueron lavados 3 veces en tampón Tris- fosfato 10 mM (pH 7,8), luego, el primer anticuerpo preparado en Tris-BSA-Tritón X-100 0,2% v/v se incubó por 16 h en las diluciones correspondientes (Tabla 1). Posterior a la incubación con el primer anticuerpo y sus respectivos lavados en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) las muestras fueron incubadas durante 2 a 4 h con los segundos anticuerpos (Tabla 1) unidos a cianinas, dependiendo del origen del primer anticuerpo, en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako). Como tinción nuclear se utilizó Hoechst 33342 (1:1000, Invitrogen) el cual fue diluido junto con el segundo anticuerpo. Los estudios asociados a microscopía confocal convencional fueron realizados en el equipo confocal Zeiss (Confocal NLO 780, Carl Zeiss, Germany). Las reconstrucciones bidimensionales en los planos xz e yz y las proyecciones tridimensionales fueron realizadas con el programa Zen 2011 V7.0.7.2 (Zeiss) o con el programa Imaris 7.4 (BitPlane). Todos estos equipos y software se encuentran disponibles en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción. <http://www.cmabiobio.cl/>

Tabla 2. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos Primarios			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-GFAP	Conejo	1:400	Dako
Anti-SVCT2	Conejo	1:200	Novus Biologicals
Anti-Nestina	Ratón	1:50	BD Biosciences

Anti- Tubulina β III	Ratón	1:1000	Promega
Anti-Sox2	Conejo	1:100	Abcam
Anti-GLUT1	Conejo	1:100	EMD Millipore, USA
Anti-vimentina	Ratón	1:300	Dako
Anti- GLUT3 (M-20)	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotech

Anticuerpos Secundarios			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
Anti-IgG conejo – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo – Cy ²	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG conejo – Cy ⁵	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón – Cy ²	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG ratón – Cy ⁵	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG cabra – Cy ³	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch

5.29 Impregnación Golgi-Cox

Esta impregnación se realizó siguiendo el protocolo publicado por Kassem y cols. en 2017 (Kassem, Fok, Smith, Kuligowski, & Balleine, 2018) llamado *Ultra-rapid Golgi stain* (URG, sigla en inglés). Para ellos se obtuvieron cerebros de rata P8 fijados mediante perfusión vascular con PFA 4% y mantenidos en inmersión con el mismo fijador por 1 hora, adicionalmente, se realizó esta impregnación en cortes de 150 μm obtenidos desde los mismos cerebros, previamente identificados como cortes que pertenecían a la zona de inyección. El cerebro completo o los cortes, fueron lavados en PBS 1x y luego incubados en solución URG (cloruro de mercurio 5% m/v, dicromato de potasio 5% m/v y cromato de potasio 1,6% m/v) durante 36 horas a 37°C. Cumplido el periodo de incubación, se realizaron lavados con H₂O destilada y posteriormente, se incubó con hidróxido de amonio 10% v/v durante 20 min a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, se incubó durante 20 minutos con tiosulfato de sodio 10% m/v, se realizaron 2 lavados con H₂O destilada y en el caso de la impregnación en cerebro completo se procedió a cortar en vibrátomo (cortes de 150 μm). Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos previamente cubiertos con gelatina, se secaron en oscuridad durante 15 minutos y se utilizó medio de montaje para fluorescencia (Dako).

5.30 Cuantificación de procesos neuronales

Para el análisis de imágenes obtenidas en Z-stack mediante microscopía confocal se utilizó el programa Imaris 7.4 (BitPlane), se realizó una reconstrucción tridimensional de todos los procesos y se descartó manualmente la superficie de la estructura central de la NE. Luego, se generaron 4 cuadrantes de un área total de 10.000 μm^3 los que se posicionaron aleatoriamente en 4 posiciones adyacentes a la estructura central y se calculó el volumen total de procesos en éstas áreas establecidas. En el caso de la cuantificación en imágenes obtenidas mediante

campo claro, la presencia de neuritas y el largo total de las mismas se cuantificó utilizando el plugin NeuroJ del software ImageJ (W. Rasban, NIH).

5.31 Obtención de *slices* agudos

Se obtuvieron cortes frontales de ratones Balb/C P14-P21 los cuales fueron facilitados por el *Animal Welfare Office at the Animal Care and Use Facility of the Heinrich Heine University* (Alemania). Los ratones fueron anestesiados por CO₂, decapitados y rápidamente se obtuvo el cerebro, este último fue puesto en fluido cerebrospinal artificial modificado (mACSF, sigla en inglés) en frío conteniendo en mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 0,5 CaCl₂, 6 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ y 20 de glucosa, burbujeado con 95% de O₂ y 5 % CO₂, resultando un pH 7,4 y una osmolaridad de 310 ± 5 mOsm/L. El cerebro fue orientado para obtener rebanadas de 250 µm en vibrátomo (HM 650 V, Thermo Fisher, Waltham, MA). Las rebanadas fueron incubadas a 34°C for 20 min en solución salina conteniendo 1 µM de SR101 para marcar astrocitos, seguido de 10 minutos en solución salina libre de SR101. Posteriormente, las rebanadas se mantuvieron a temperatura ambiente en ACSF estándar conteniendo en mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 20 glucosa burbujeado con 95% de O₂ y 5 % CO₂, resultando un pH 7,4. Durante los experimentos realizados a temperatura ambiente, las rebanadas fueron perfundidas con ACSF y fueron analizados por hasta 6 horas luego de su obtención.

5.32 Análisis de niveles de sodio y calcio intracelulares

Para analizar los niveles de Na⁺ intracelular se inyectó la sonda SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl [AM] ester, 200 µM, Teflabs, Austin, TX, USA) en la capa II/III, para el análisis de los niveles de Ca²⁺ se utilizó la sonda Fura-2 (200 µM) que fue inyectada en la misma zona cortical. Imagen en campo abierto de ambas sondas fue llevado

a cabo usando una variable del sistema de escaneo digital (Nikon NIS-Elements v4.3, Nikon GmbH Europe, Duesseldorf, Germany) unido a un microscopio upright (Nikon Eclipse FN-PT, Nikon GmbH Europe, Duesseldorf, Germany). SBF1 fue excitado alternadamente a 340/380 nm y Fura-2 a 357/380 nm. Las imágenes fueron obtenidas a 1 Hz y la emisión fue colectada a > 440 nm para ambas sondas, la fluorescencia fue evaluada en regiones de interés (ROIs) posicionados en los cuerpos celulares de neuronas y astrocitos. La señal fue corregida del background y analizada usando OriginPro Software (OriginLab Corporation v.9.0, Northampton, MA, USA).

5.33 Marcaje con TTC

Se realizó la tinción con 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) al 2% preparado en PBS 1X frío y mantenido en oscuridad durante el procedimiento. Los cerebros fueron obtenidos de ratas P8 inyectadas con las distintas condiciones, se cortaron en secciones coronales de aproximadamente 3 mm de grosor intentando cortar por el medio la zona inyectada. Los trozos fueron teñidos durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente, fueron transferidos a PFA 4% en donde se mantuvieron por 2 días en inmersión.

5.34 Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 6.01. Los datos representan el promedio \pm SEM. Cada experimento fue realizado al menos en duplicado o triplicado, se realizaron dos a tres repeticiones de cada experimento independientes entre sí. La comparación estadística entre dos grupos fue realizada usando test t-student, para análisis de más de dos grupos de datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test Tukey. Desde un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Capítulo 1. Análisis del efecto de AA en la formación de procesos neuríticos en células progenitoras neurales *in vitro* y efecto de DHA en este modelo.

Esta tesis se ha desarrollado utilizando el modelo de neuroesferas (NE) *in vitro*, el cual fue descrito en el año 1992 por Reynolds y Weiss. Estos autores lograron aislar células precursoras neurales desde el estriatum de ratón adulto, luego de cultivarlas en presencia de factores mitogénicos (FGF, EGF), se formó una estructura en forma de esfera que contenía células proliferativas. Dentro de esta estructura existía una importante población positiva al marcador nestina, el cual es un filamento intermedio presente en células precursoras neuroepiteliales del cerebro embrionario. De esta forma, la NE es una estructura que permite la mantención de células indiferenciadas *in vitro*, permitiendo la diferenciación de éstas hacia células con compromiso neuronal y glial.

6.2 Caracterización del cultivo primario de NE crecidas en adhesión

Como se mencionó anteriormente, las NE formadas en suspensión permiten la proliferación de células precursoras *in vitro*, en este trabajo se obtuvieron NE a partir de la corteza cerebral de rata embrionaria de 17 días de gestación (Figura 1 A). las cuales fueron sembradas en presencia de EGF y FGF, luego de 2 días *in vitro* (2 DIV) las NE fueron sembradas en vidrios previamente tratados con poli-L-lisina, para inducir su adhesión y posterior análisis inmunocitoquímico, luego de 24 horas.

Las NEs adheridas presentan células positivas al marcador neuronal tubulina β III, proteína que se encuentra principalmente en los procesos que salen desde la NE (Figura 1 B). La expresión de la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) se detecta principalmente intracelular, en las células que componen la NE (Figura 1 C), lo mismo ocurre con el marcador de nestina (Figura 1 D); esta proteína se localiza tanto en la membrana, como intracelularmente en una importante población celular presente en el interior de la NE. SOX2 corresponde a un factor

de transcripción relacionado con la mantención de la pluripotencia en NSC, el cual también se observa en los núcleos de las células que forman la NE (Figura 1 E). De esta manera, las NEs formadas presentan poblaciones celulares heterogéneas en donde destacan células con un compromiso neuronal.

Posteriormente, analizamos la presencia de los transportadores de vitamina C detectándose una intensa inmunorreacción para SVCT2. Este transportador se localiza tanto en los procesos que salen desde la NE, como en las células que la componen (Figura 1 F), mientras que el transportador GLUT1; se detectó principalmente en la membrana de las células de la NE (Figura 1 G).

Reportes previos de nuestro laboratorio, han determinado que NEs en suspensión co-localizan nestina y SVCT2 (Oyarce et al., 2018), lo que se ha observado durante el desarrollo embrionario del SNC, específicamente en la GR (Figura 2 A). Sin embargo, durante las primeras semanas de desarrollo post-natal, SVCT2 co-localiza con el marcador neuronal tubulina β III. Esta observación, previamente realizada en tejidos, fue ahora reproducida en las NEs adheridas. Luego de 24 horas en adhesión, efectivamente podemos observar una co-distribución de SVCT2 y tubulina (Figura 2 B) en procesos neuríticos (Figura 2 C, D, flecha), como en el soma neuronal (Figura 2 C-D, cabezas de flechas). Proponemos que las NE adheridas representan de una buena manera, las características postnatales del cerebro en desarrollo.

En una segunda etapa, comprobamos la expresión de SVCT2 y GLUT1 mediante PCR convencional y análisis de Western blot. Por medio de PCR identificamos un producto de 423 pb para SVCT2 y 203 pb para GLUT1, en muestras de NE adheridas por 24 h (Figura 3 A, surco 1). En el análisis de Western blot, observamos dos bandas, de 40 y 50 kDa características para GLUT1,

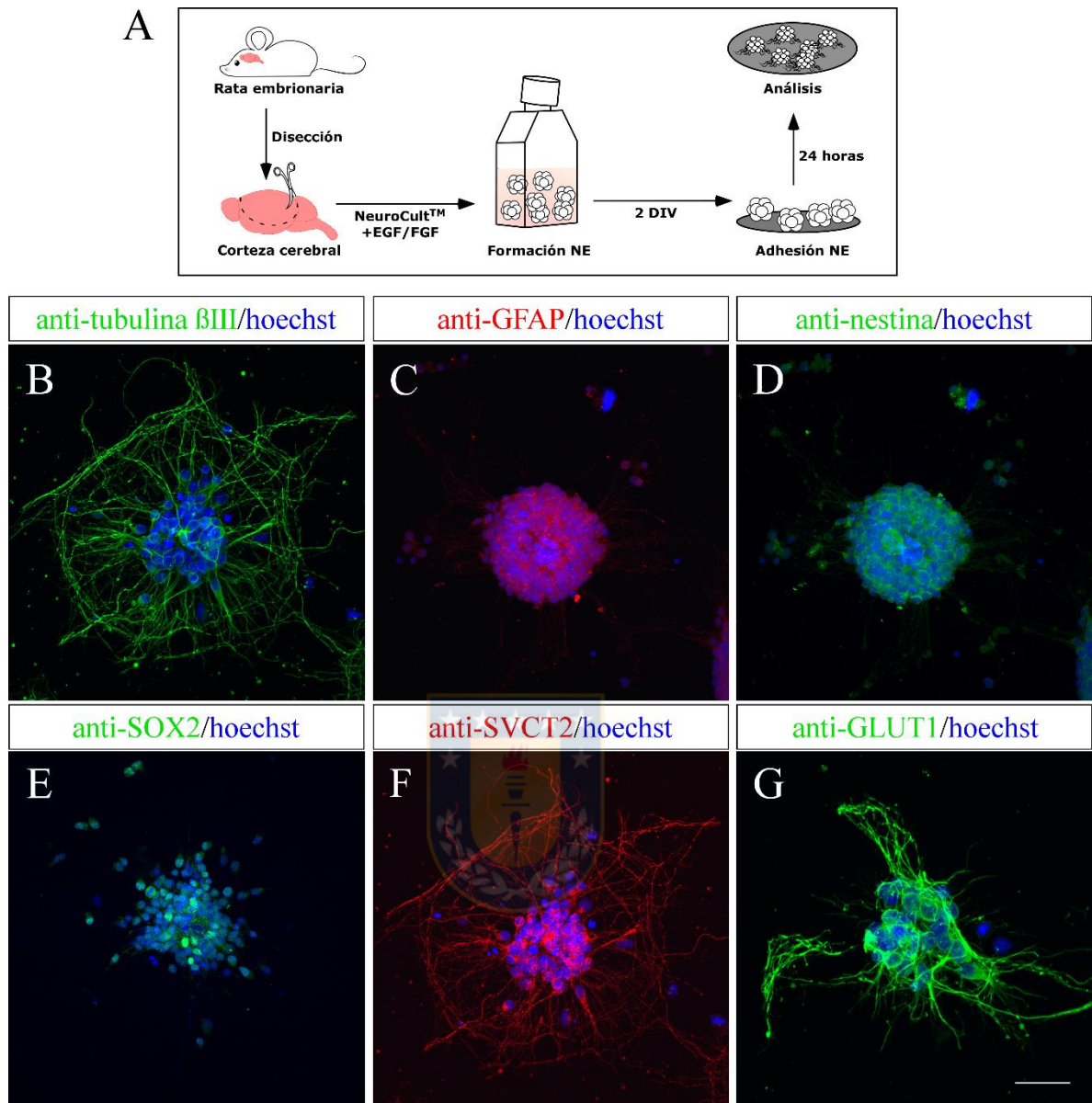


Figura 1. Caracterización inmunocitoquímica de cultivos de NEs crecidas en adhesión.

A. Protocolo de obtención, formación y adhesión de NEs durante 2 DIV en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina para su posterior análisis a las 24 h. **B-F.** Inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-tubulina β III (**B**, marcador neuronal), anti-GFAP (**C**, marcador glial). Anti-nestina (**D**) y anti-SOX2 (**E**) fueron utilizados como marcadores de indiferenciación. **F-G.** Inmunoreacción para el transportador de ácido ascórbico, SVCT2 (**F**) y el transportador de DHA, GLUT1 (**G**). Barra de tamaño, 50 μ m.

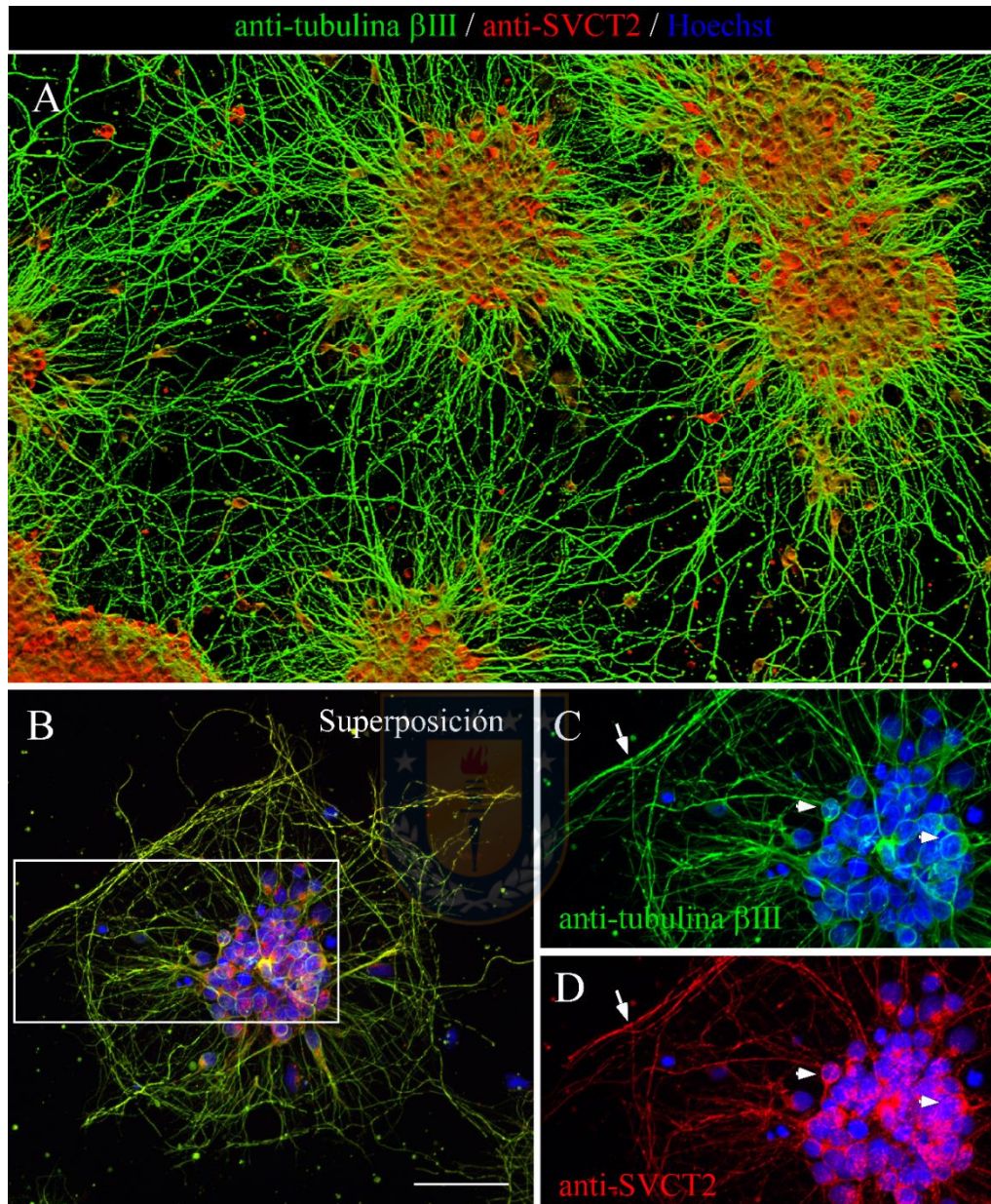


Figura 2. Expresión de SVCT2 en células con compromiso neuronal en NE adheridas.

A. Reconstrucción 3D de NEs analizadas con anti-SVCT2 (rojo) o anti- tubulina β III (verde). *Tile-scan* utilizando microscopía confocal. **B.** Superposición de las señales de SVCT2 (rojo), tubulina β III (verde) y el marcador nuclear (azul), en NE control adherida por 24 h. **C-D.** Zoom digital de la zona indicada en B, donde se observa con mayor detalle las células que componen la NE, las cuales presentan inmureacción para tubulina β III (**C**, cabeza de flecha) y SVCT2 (**D**, cabeza de flecha). Se observa también la presencia de SVCT2 en procesos neuríticos positivos a tubulina β III (flecha en **C** y **D**). Barra de tamaño: 50 μ m.

y una intensa banda de 40 kDa para SVCT2. Adicionalmente, también se observaron dos bandas de ~50 kDa y de ~75 kDa, siendo esta última, la más descrita en la literatura (Figura 3 B).

Para analizar la funcionalidad de ambos transportadores se realizaron estudios de transporte utilizando ^{14}C -AA en NE control mantenidas durante 24 h en adhesión. En 30 minutos de captación, se observó una incorporación efectiva de AA en presencia de sodio ($10,51 \pm 0,43$ nmol/ 10^6 cél), el cual fue levemente inhibido por la ausencia de Na^+ (Figura 3C). Paralelamente, en 10 minutos de captación, se observó una incorporación efectiva de DHA ($21,06 \pm 2,18$ nmol/ 10^6 cél), lo cual fue inhibida por la presencia de citocalasina B, un inhibidor de GLUT1 (Figura 3 D).

Finalmente, utilizamos microscopía de súper-resolución SIM para determinar la localización que tienen los transportadores SVCT2 y GLUT1 dentro de la estructura tridimensional de la NE (Figura 3 E-T). Respecto a SVCT2, se observaron pequeños clusters del transportador, los cuales se distribuyen a lo largo de los procesos tubulina β III positivos (Figura 3 G-H, flecha), sin embargo, se detecta la mayor presencia de este transportador a nivel intracelular y muy poco a nivel de la membrana celular (Figura 3 G-H, cabeza de flecha). Lo anterior, se observa en mayor detalle al reconstruir las imágenes en 3D, donde se observa la amplia distribución de SVCT2 en los procesos neuríticos (Figura 3 I-J), a nivel intracelular y en la membrana plasmática (Figura 3 K-L). Por su parte, GLUT1 presenta una distribución mucho más homogénea (Figura 3 M-N), observándose claramente localizado a nivel de la membrana plasmática (Figura 3 O-P, flecha), así como también se encuentra claramente localizado a nivel de los procesos neuríticos (Figura 3 O-P, cabeza de flecha). Cabe destacar, que la reconstrucción tridimensional permite confirmar la presencia de GLUT1 en la membrana de las células que componen la NE (Figura 3 S-T) y en las neuritas (Figura 3, Q-R).

De esta manera, las NE crecidas *in vitro* en condición de adhesión, poseen transportadores funcionales tanto para la forma reducida (SVCT2) como para la forma oxidada (GLUT1) de vitamina C, siendo además un modelo de células en cultivo que representa de mejor manera el desarrollo postnatal de la corteza cerebral.

6.3 Efecto del tratamiento prolongado con AA en NEs adheridas.

Utilizando las NE adheridas, se estudió el efecto del AA sobre la diferenciación de células precursoras *in vitro*. Se realizó el tratamiento con 100 μ M AA, siguiendo el protocolo señalado en la figura 4A; AA fue aplicado al tiempo 0 (momento en que se adhieren las NEs), luego se repitió el tratamiento a las 12, 24 y 48 h. Al mismo tiempo, se realizó el tratamiento con un control positivo de diferenciación neuronal, ácido retinoico (AR), el cual corresponde a la molécula activa de la vitamina A, la cual ha sido ampliamente utilizada en la literatura para inducir diferenciación neuronal (Siegenthaler et al., 2009). En este caso, se realizó la suplementación con ácido *all-trans*-retinoico 10 μ M o DMSO (solvente de AR), al momento de adherir las NEs. El análisis inmunocitoquímico con anti-tubulina β III muestra que en ambos tratamientos, se induce el crecimiento de neuritas desde las 12 h (Figura 4 B-C), las cuales crecen en largo y número, hasta las 24 (Figura 4 E-F) y 48 h (Figura H-I).

Se realizó un análisis cuantitativo del volumen de procesos positivos a tubulina, que salen desde la estructura central de la NE, utilizando el *software* Imaris, el cual segmenta

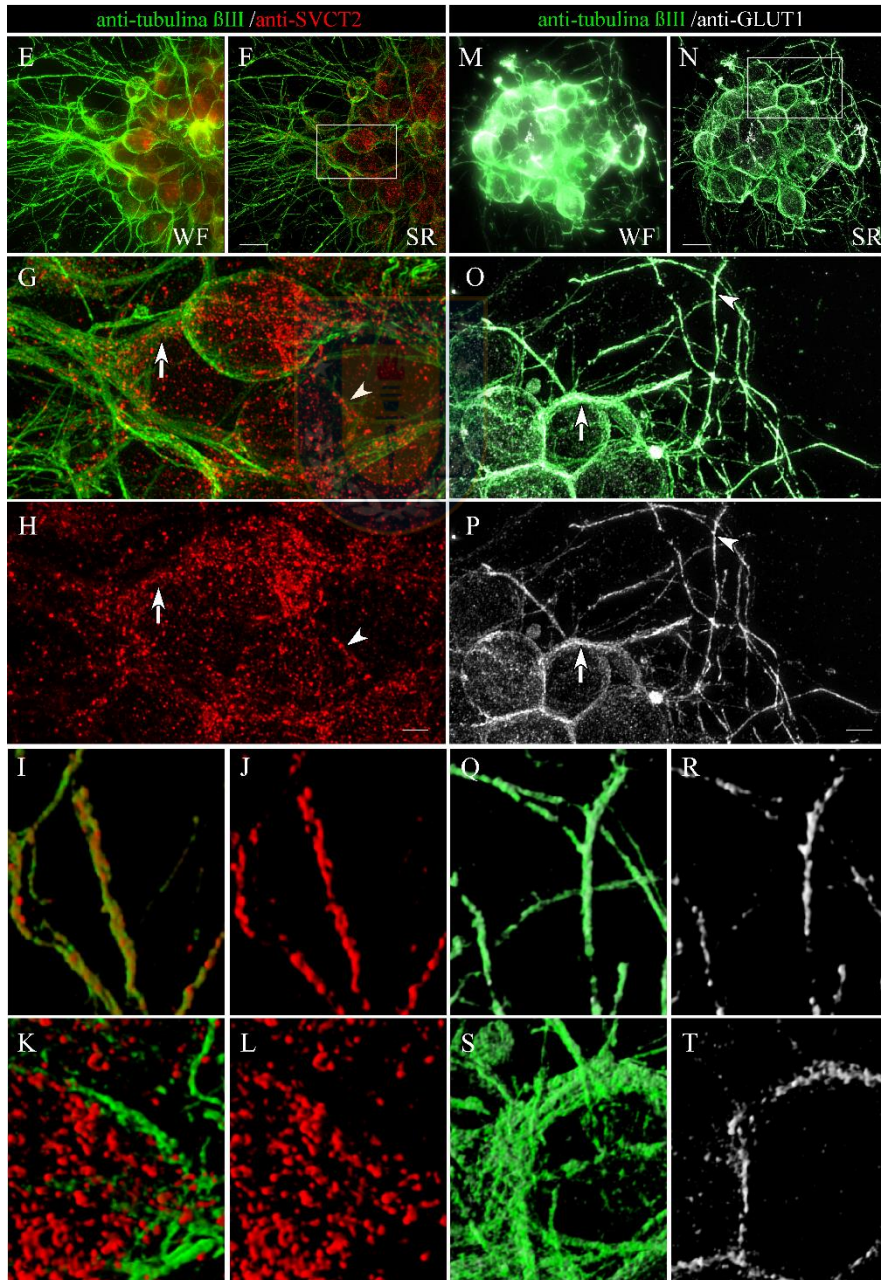
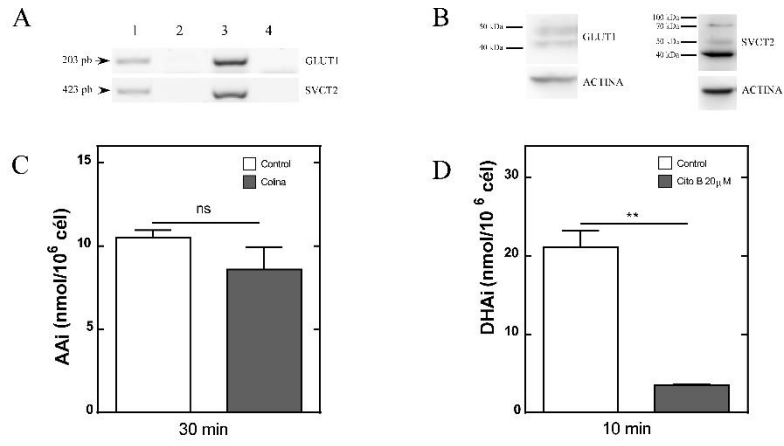


Figura 3. Expresión, función y localización de los transportadores de vitamina C en NE adheridas.

A. Análisis mediante PCR convencional de la expresión del ARNm de SVCT2 y GLUT1. Surco 1: ADNc obtenido a partir de NE control adheridas por 24 h. Surco 2: Reacción en ausencia de transcriptasa reversa. Surco 3: ADNc cerebro de rata PN8 (control positivo). Surco 4: Control negativo (agua). **B.** Western Blot utilizando anti-GLUT1 y anti-SVCT2 en muestras extraídas de NE control de 24 h post-adhesión. **C.** Estudio de la captación de AA en NE control de 24 h, adheridas en presencia o ausencia de sodio. **D.** Análisis de la captación de DHA en NE de 24 h control, en ausencia o presencia del inhibidor de GLUT1, citocalasina B, 20 μ M. Barras representan promedios \pm SEM, dos experimentos independientes en duplicado. Análisis estadístico t-student (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001). **E-T.** Análisis mediante microscopía de súper resolución en NEs control adheridas por 24 h. Distribución subcelular de los transportadores SVCT2 (E-L) y GLUT1 (M-T), mediante inmunocitoquímica. **E-F.** Inmunoreacción para tubulina β III (verde) y SVCT2 (rojo), imagen de fluorescencia (**E**) y súper resolución (**F**). **G-H.** Aumento digital de la zona marcada en F, donde se observa la presencia de SVCT2, tanto en la membrana celular como en los procesos tubulina β III positivos. **I-J.** Reconstrucción tridimensional de procesos positivos a tubulina β III (verde), dónde se observa la distribución de SVCT2 (rojo). **K-L.** Imagen en 3D de la zona indicada en G (cabeza de flecha), para observar la presencia de SVCT2 (rojo), tanto en la membrana como en el citoplasma celular. **M-N.** Imagen de campo abierto (M) y de súper resolución (N) para GLUT1 (blanco) y tubulina β III (verde) en NE control. **O-P.** Aumento digital de la zona marcada en N. **Q-T.** Reconstrucción 3D de las zona indicada en O (flecha), donde se observa la presencia del transportador GLUT1 (blanco) en los procesos positivos a tubulina β III (verde) (**Q-R**) y en la membrana celular (**S-T**). Barra de tamaño, 50 μ m.

de manera tridimensional toda la superficie positiva a tubulina, aislando la estructura central. A las 12 h de tratamiento se observa que AA induce un mayor volumen de procesos, comparado con su control, lo mismo ocurre en el caso de AR (Figura 4 D). Luego de 24 horas el tratamiento con AA, sigue incrementando el volumen de procesos que salen desde la NE, mientras que AR no genera una respuesta significativa (Figura 4 G). Esta situación se mantiene hasta las 48 horas, donde AA duplica el volumen de procesos, comparado con las 12 h (Figura 4 J). Cabe destacar, que entre las 12 y 48 h, el tratamiento con AA muestra un mayor volumen de procesos positivos a tubulina β III, comparado con el tratamiento de AR (12 H AA $1.351 \pm 145,6$, AR $894,6 \pm 72,85$; 24 H AA $2.349 \pm 241,9$, AR $1.162 \pm 86,26$; 48 H AA $3.879 \pm 214,9$, AR $2472 \pm 140,0 \mu\text{m}^3/\text{cuadrante}$) (Figura 4 D, G, J). En contraste a lo observado durante las primeras 48 h de tratamiento, al prolongar el tratamiento con AA durante 72 h, se observa una fuerte disminución en el volumen de procesos neuríticos comparado con su control (PBS) y comprado con el control positivo (AR), el cual presenta un incremento significativo en el volumen de procesos (72H AA $1.364 \pm 203,1$, AR $2.467 \pm 329,0 \mu\text{m}^3/\text{cuadrante}$) (Figura 4 M). Este cambio se condice claramente con la morfología de las NEs analizadas a las 72 horas de tratamiento con AA, donde se detecta una menor presencia de procesos positivos a tubulina, con una alta presencia de debris celular y “restos” de las neuritas crecidas hasta las 48 h. En contraparte, AR mantiene y aumenta el crecimiento de sus neuritas hasta las 72 h (Figura 4 K-L).

Producto de esta drástica disminución en el volumen de neuritas durante el tratamiento con AA entre las 48 y 72 h, decidimos analizar la viabilidad de nuestros cultivos en las diferentes condiciones de tratamientos.

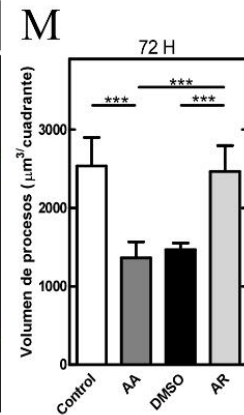
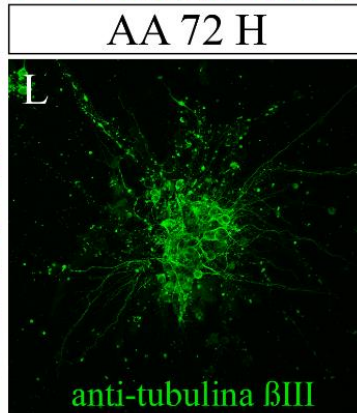
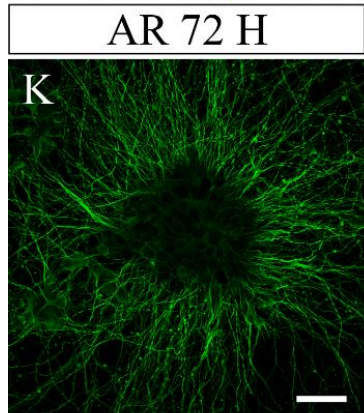
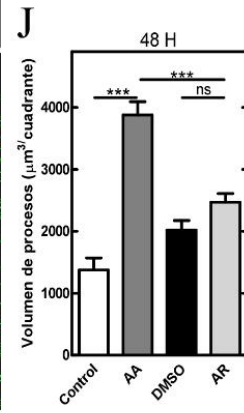
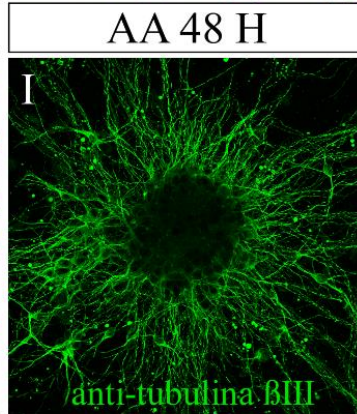
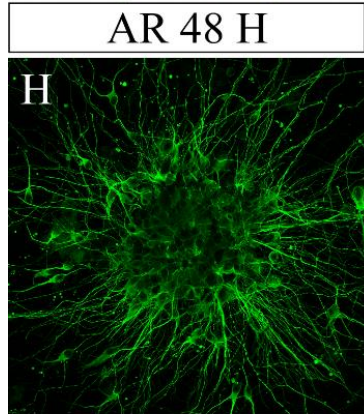
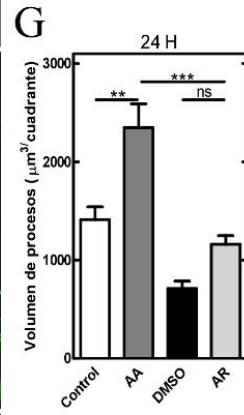
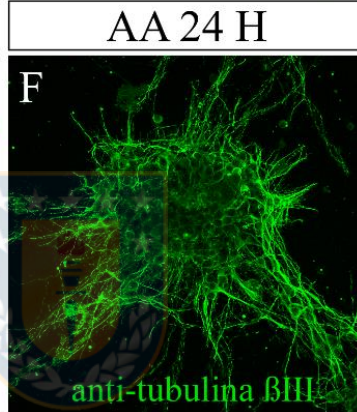
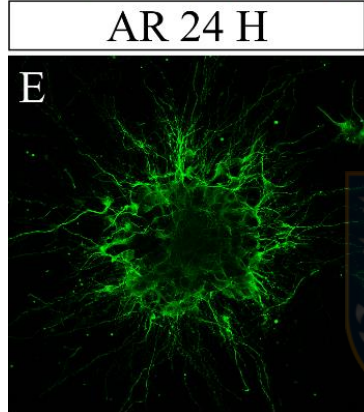
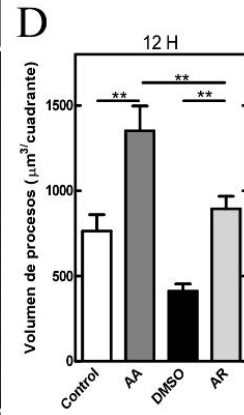
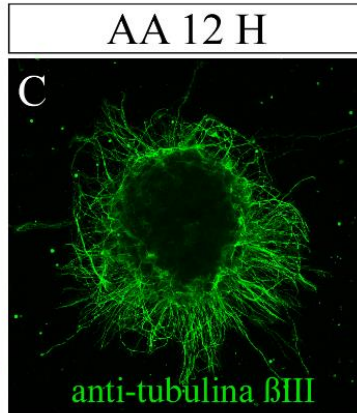
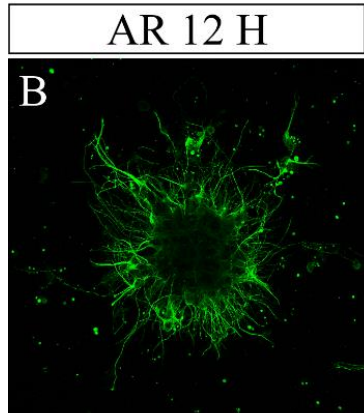
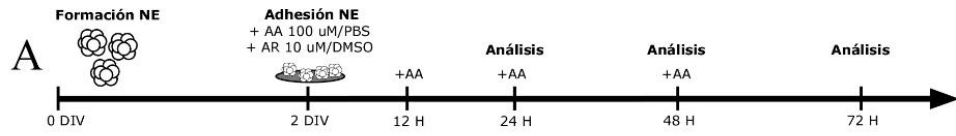




Figura 4. Análisis comparativo del crecimiento de neuritas estimulado por AA y AR.

A. Protocolo de ensayos de diferenciación neuronal utilizando AA y AR. **B-M.** Inmunocitoquímica asociada a tubulina β III (verde) en NE tratadas con AR 10 μ M (**B, E, H, K**) o AA 100 μ M (**C, F, I, L**), durante 12, 24, 48 y 72 h; respectivamente. **D, G, J, M.** Cuantificación del volumen de procesos en NE tratadas con AR o AA, durante 12, 24, 48 o 72 h; respectivamente. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Barras muestran promedios \pm SEM. N=6 NEs cuantificadas por condición. Barra de tamaño, 50 μ m.

Para ello se realizaron ensayos de viabilidad utilizando el método de XTT en los cultivos de NE tratados con AR y AA a las 24, 48 y 72 h. Estos resultados no mostraron una disminución en la viabilidad celular en ninguno de los tratamientos realizados (Figura 5 A-B). Esto fue corroborado utilizando citometría de flujo para analizar la incorporación de Topro-3 y la intensidad de la sonda Mitotracker (sonda que detecta la actividad mitocondrial). A las 72 h, el porcentaje de células negativas a Topro-3 y positivas a Mitotracker (células vivas) se mantuvo cercano al 100% en todos los tratamientos (Figura 5 C). Finalmente, se realizó un análisis de viabilidad en tiempo real, utilizando la tecnología de IncuCyte®, el cual permite analizar en tiempo real, la incorporación de la sonda SytoxGreen a las células mientras se encuentran bajo las distintas condiciones de cultivo. Este análisis se realizó por un total de 75 h, donde se observa que entre las 0 y las 40 h existe un aumento sostenido de las células que incorporan la sonda (células muertas) en todas las condiciones (Figura 5 D), sin embargo, al comparar el número de células muertas a las 72 h, no existen diferencias significativas entre AA y AR con sus respectivos controles (Figura 5 D, gráfico interior). De esta forma, comprobamos que el cambio morfológico observado hasta las 72 h de tratamiento con AA, no se encuentra asociado a una disminución en la viabilidad celular.

Adicionalmente, analizamos si el tratamiento con AA puede regular los niveles de expresión de los transportadores de vitamina C, SVCT2 y GLUT1, lo cual pudiera explicar tanto el crecimiento de las neuritas como la pérdida de las mismas. Utilizando PCR en tiempo real, se detectó que el tratamiento con AA induce un significativo aumento en la expresión de SVCT2 a las 24 h post-tratamiento, lo cual se mantiene hasta las 48 h comparado con su control, esto se revierte a las 72 h, donde tanto la condición control como la tratada con AA, muestran una disminución en la expresión de SVCT2 (24 H Control $3,8 \pm 0,19$, AA $6,5 \pm 0,67$; 48 H Control $4,4 \pm 0,63$, AA $6,5 \pm 0,49$; 72 H Control $2,0 \pm 0,30$, AA $1,6 \pm 0,23$) (Figura 6 A). De la misma forma, los niveles de expresión del transportador GLUT1 fueron aumentados a las

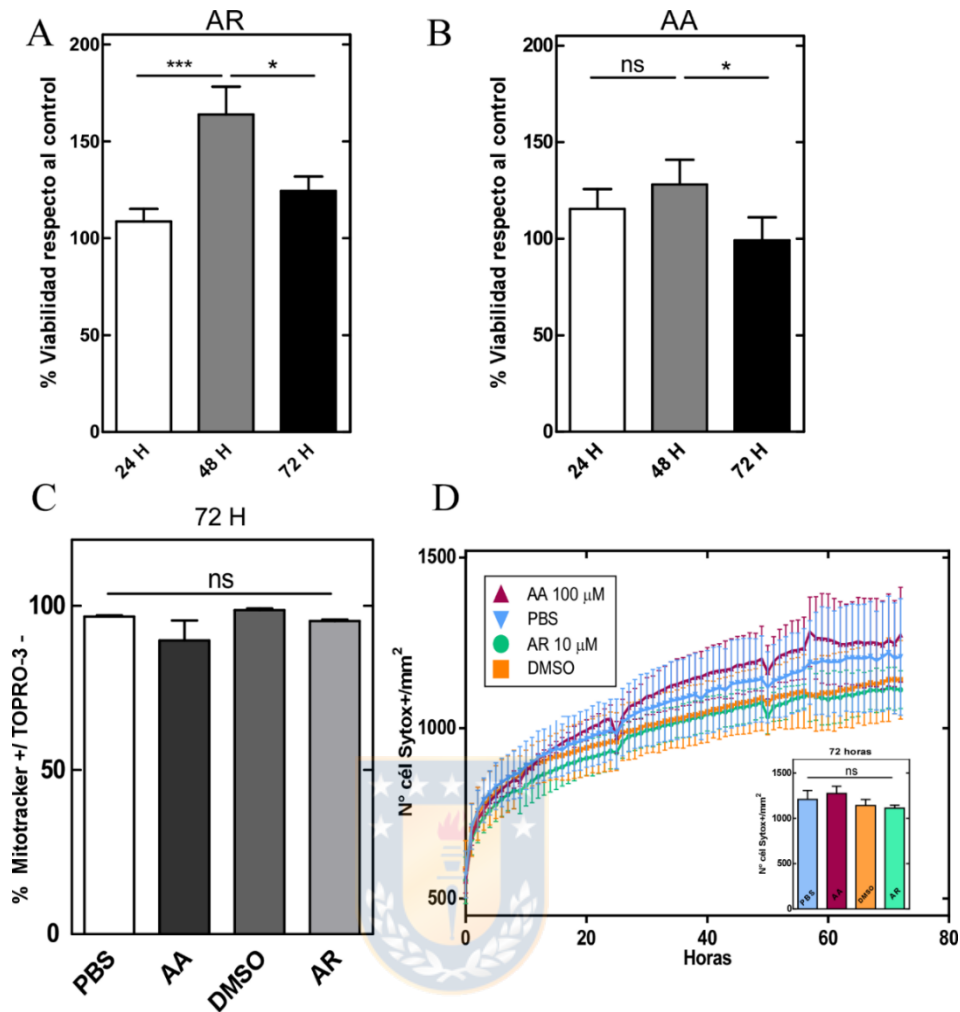


Figura 5. Análisis de viabilidad celular durante el tratamiento con AA y AR.

Análisis de viabilidad celular realizados en NE tratadas con AA 100 µM, PBS (control), AR 10 µM o DMSO (control). **A-B.** Ensayo de viabilidad utilizando el método de XTT, realizado en NE tratadas con AR (**A**) o AA (**B**), durante 24, 48 y 72 h. **C.** Análisis de citometría de flujo, donde se muestra el porcentaje de eventos celulares positivos a Mitotracker y negativos para Topro-3 (células vivas), en las diferentes condiciones estudiadas. **D.** Análisis de viabilidad en tiempo real, utilizando IncuCyte®, donde se muestra la incorporación de Sytox Green en 75 h de incubación, con los diferentes tratamientos y sus respectivos controles. **E.** Representación de los porcentajes de células positivas a SYTOX Green, luego de 72 h de tratamiento. Las barras de los gráficos representan promedio \pm SEM, N=3. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001).

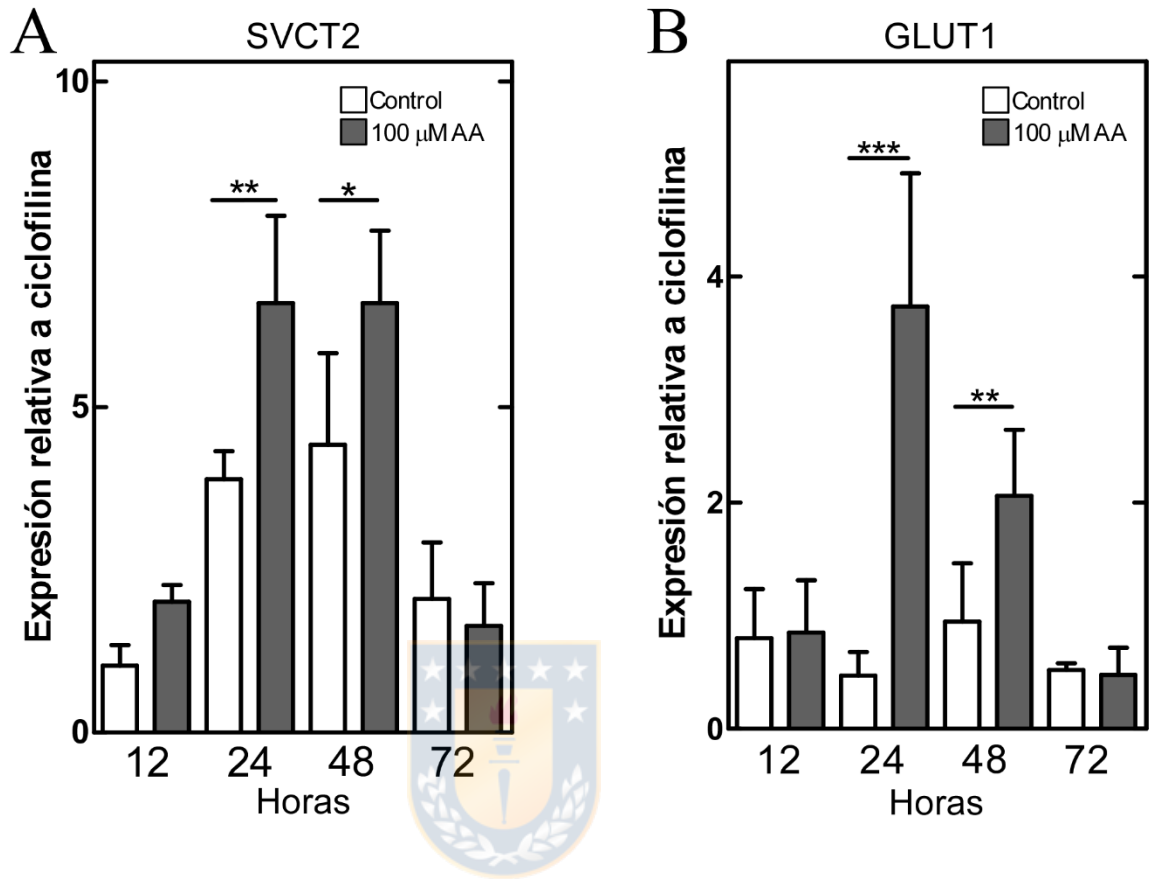


Figura 6. Análisis de los niveles de expresión de SVCT2 y GLUT1, durante el tratamiento con AA.

Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de los transportadores SVCT2 (A) y GLUT1 (B) en NE control o tratadas con AA 100 μ M durante 12, 24, 48 y 72 h. Se observa un aumento en la expresión de ambos transportadores a las 24 h, que se mantiene hasta las 48 horas de tratamiento. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráfico muestra promedios \pm SEM, N=3.

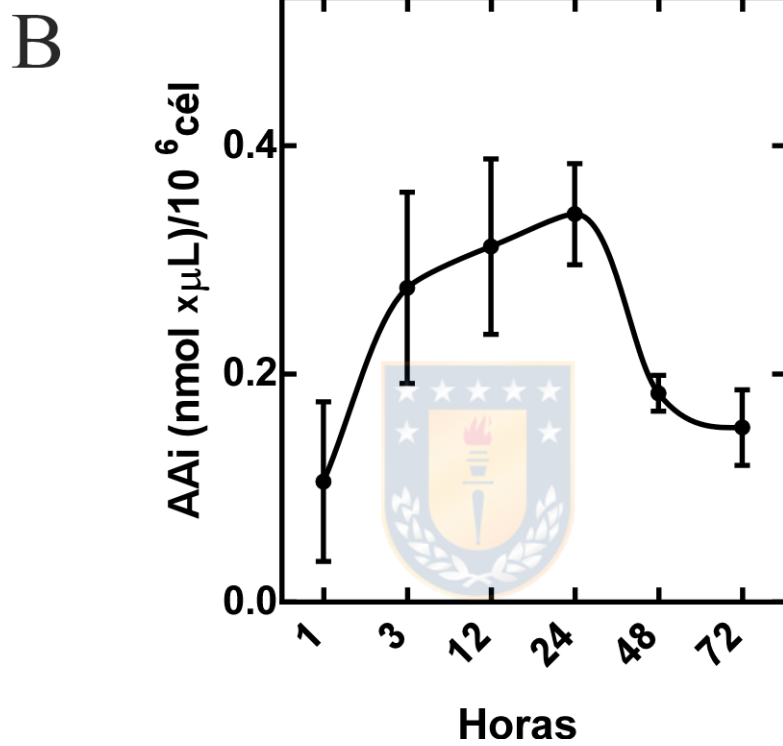
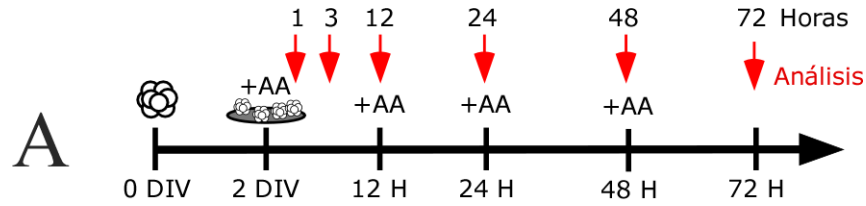


Figura 7. Cambios en los niveles intracelulares de vitamina C durante el tratamiento con AA en NE adheridas.

A. Protocolo utilizado para determinar la concentración intracelular de AA en NE adheridas y suplementadas con AA 100 μ M al tiempo 0, 12, 24 y 48 h. **B.** Detección de AA intracelular en NEs mantenidas en cultivo luego de 1, 3, 12, 24, 48 y 72 h de tratamiento, mediante el ensayo colorimétrico EnzyChrom™ Ascorbic Acid Assay. Gráfico muestra promedios \pm SEM, N=3.

24 h, por el tratamiento con AA manteniéndose altos hasta las 48 h, y disminuyendo luego de 72 h de tratamiento (24 H Control $0,47 \pm 0,1$, AA $3,7 \pm 0,5$; 48 H Control $0,94 \pm 0,19$, AA $2,0 \pm 0,22$; 72 H Control $0,51 \pm 0,06$, AA $0,47 \pm 0,07$) (Figura 6 B).

Éstos resultados nos sugieren que el tratamiento con AA induce un incremento significativo en la expresión de los transportadores de AA y DHA, pudiendo entonces aumentar la capacidad que tienen las NE de movilizar éstas moléculas hacia el medio intra/extracelular durante el tratamiento.

6.4 Efecto de DHA en el crecimiento de neuritas e impacto en balance redox de NE *in vitro*

Considerando que AA es una molécula que intracelularmente puede ser oxidada hacia DHA (principalmente en neuronas en donde se ha reportado una baja capacidad para mantener reducido el AA), nos preguntamos si el tratamiento prolongado con AA podría generar una gradual oxidación y posterior acumulación de DHA en las Nes, lo que podría inducir el cambio morfológico observado a las 72 horas.

En un primer paso, utilizamos el ensayo colorimétrico *EnzyChrom™ Ascorbic Acid Assay* para medir las concentraciones intracelulares de AA en NE adheridas expuestas al tratamiento con AA, previamente descrito luego de 1, 3, 12, 24 48 y 72 h (Figura 7 A). De esta manera, detectamos que existe un importante aumento en la concentración intracelular de AA luego de las 3 primeras horas de tratamiento, para alcanzar el máximo a las 24 h con una concentración aproximada de $0.35 \text{ nmol} \cdot \mu\text{L}/10^6$ células. A las 48 h de tratamiento existe una significativa disminución en la concentración de AA, niveles que se mantienen bajos hasta las 72 h (Figura 7 B). Éstos resultados demuestran que las NE captan el AA, que se agrega al medio durante el tratamiento, y lo mantienen reducido intracelularmente hasta las 48 horas, momento en el que un gran porcentaje se oxida hacia DHA.

Es por ello que quisimos comprobar cuál era el efecto que tendría DHA al ser agregado directamente en las NEs, luego de inducida la diferenciación neuronal. Una vez formadas las NEs y adheridas en los cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, se realizó la suplementación con AA 100 μ M al tiempo 0 y 12 h, para estimular el crecimiento de neuritas, luego, a las 24 y 48 h, se realizó la suplementación con 100 μ M DHA y se realizó el análisis inmunocitoquímico a las diferentes horas de tratamiento (Figura 8 A). Como se observa en la figura 8 B, durante las primeras 24 h de tratamiento con AA, se observan NE que poseen procesos neuríticos positivos a tubulina β III (Figura 8 B) los cuales comienzan a disminuir desde las 48 h, luego de una suplementación con DHA (Figura 8 C). A las 72 h de tratamiento, con dos pulsos de DHA, se detecta la misma morfología observada en el tratamiento prolongado, sólo con AA (Figura 8 D). Para obtener una cuantificación global NE con neuritas en las muestras, utilizamos un método similar al método de Sholl, donde una NE con neuritas, se considera a toda estructura esférica formada por 3 o más células en diámetro, desde donde salen procesos de largo igual o mayor a 10 μ m. Nuestros resultados muestran que posterior a las 24 h de tratamiento, sólo con AA, un $92,8 \pm 1,5$ % de las NE analizadas presentan neuritas, esto disminuye a un $17,7 \pm 7,3$ %, a las 48 h luego de un pulso con DHA, mientras que hasta las 72 h solo un $11,8 \pm 4,3$ % de NE, mantienen procesos neuríticos (Figura 8 E).

En conjunto, éstas observaciones apoyan la hipótesis de que DHA es la molécula que podría inducir la pérdida de neuritas observada a las 72 h de tratamiento con AA, debido a su oxidación intracelular y posterior acumulación.

Previamente, nuestro laboratorio ha reportado que DHA puede afectar el metabolismo neuronal generando estrés oxidativo, el cual obliga a la neurona a buscar mecanismos de compensación antioxidativa (Cisternas et al., 2014). Adicionalmente, García-Krauss y cols. reportaron en el año 2015, que neuronas sometidas a un ambiente oxidativo y expuestas a DHA desencadenan procesos de muerte neuronal (García-Krauss et al., 2015).

Es por ello que evaluamos el estado redox de los cultivos celulares, midiendo en primer lugar, los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el tratamiento prolongado de 72 hs con AA 100 μ M. Para éste análisis utilizamos la sonda CellROX®, la cual ingresa a la célula y emite fluorescencia al detectar intracelularmente la presencia de cualquier molécula ROS, esto fue comprobado mediante microscopía confocal en célula viva, donde se puede detectar la señal intracelular que emite la sonda en una NE control (Figura 9 A) y una NE tratada con AA durante 48 h (Figura 9 B). Utilizando citometría de flujo se comparó la intensidad de fluorescencia que emite CellROX® a las 12, 24, 36, 48 y 72 h post-tratamiento en las muestras tratadas con PBS (control) y las tratadas con AA. Entre las 12 y 24 h (Figura 9 C-D) no se observaron diferencias significativas entre las muestras control y el tratamiento con AA, sin embargo, desde las 36 horas se comienza a observar un incremento en la intensidad de fluorescencia de las muestras tratadas con AA (Figura 9 E). Este aumento de ROS, se observa claramente, entre las 48 y hasta las 72 h, donde se detecta una población que se desplaza hacia la derecha en el histograma de las muestras tratadas con AA, sugiriendo que éstas células poseen una mayor cantidad de ROS comparado con la condición control (Figura 9 F-G).

Una vez que determinamos que las NE tratadas con AA incrementan paulatinamente la concentración de ROS intracelular, estudiamos los niveles de glutatión reducido (GSH) en nuestros cultivos.

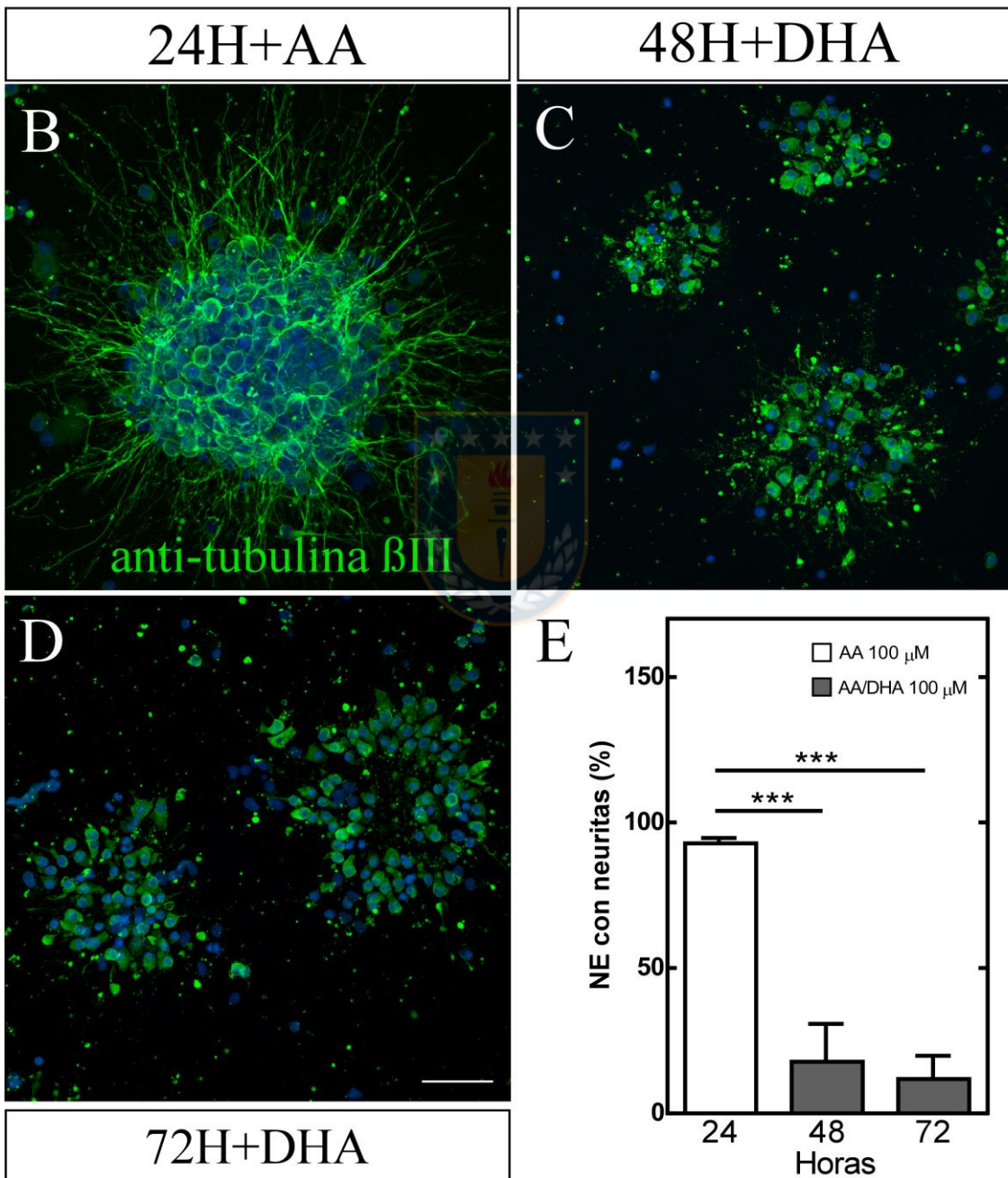
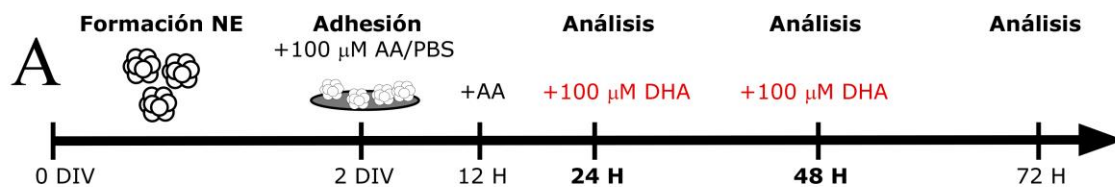




Figura 8. El tratamiento con DHA en NE diferenciadas *in vitro*, disminuye el crecimiento neurítico.

A. Protocolo de tratamiento con AA/DHA 100 μ M en NE formadas en suspensión y tratadas en adherencia. **B-D.** Análisis mediante inmunocitoquímica usando anti-tubulina β III (verde) en NE tratadas con AA 100 μ M durante 24 h (**B**), tratadas con AA durante las primeras 24 h y luego con DHA 100 μ M hasta las 48 h (**C**) o hasta las 72 h (**D**). **E.** Cuantificación del porcentaje de NE que poseen neuritas, en cada tiempo de tratamiento. “Neurita” fue considerada como cualquier proceso positivo a tubulina β III, que saliera de la NE, más largo que el diámetro de la célula que conforma la misma. Barra de tamaño, 50 μ m. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráfico muestra en promedio \pm SEM, 45-50 NEs por condición, N=3.

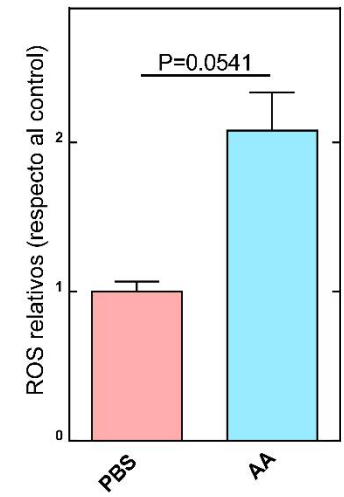
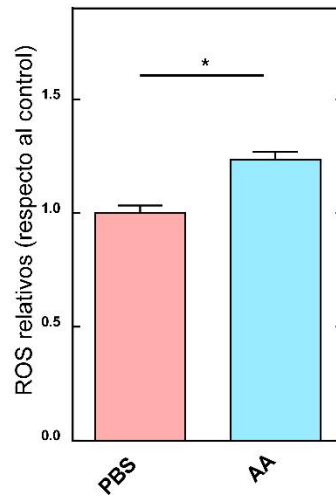
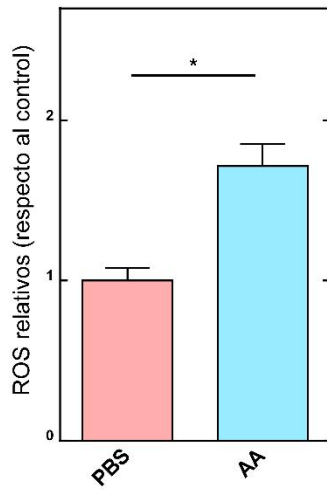
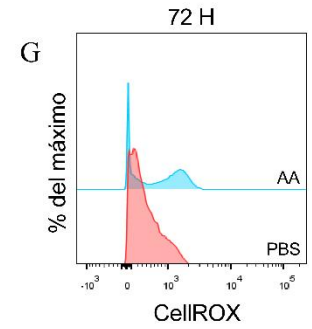
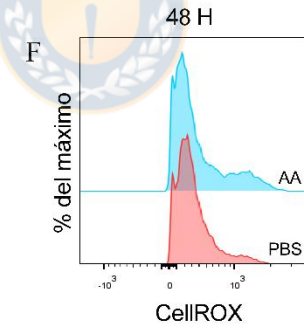
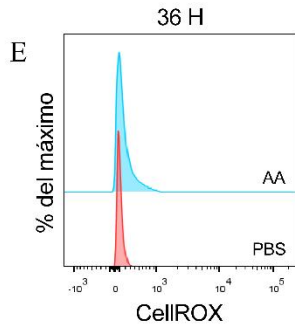
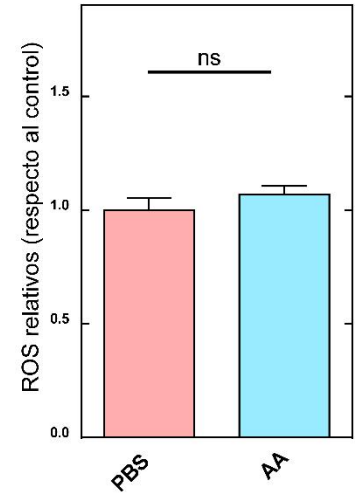
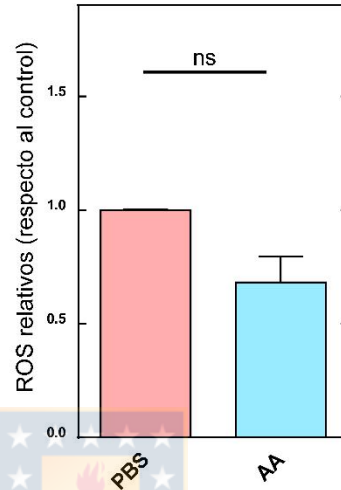
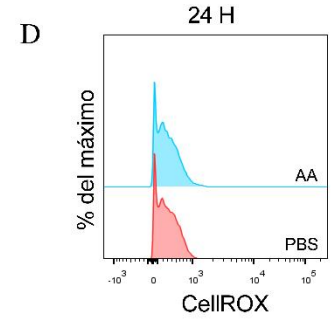
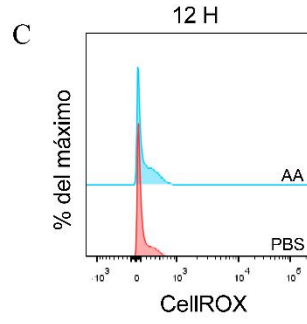
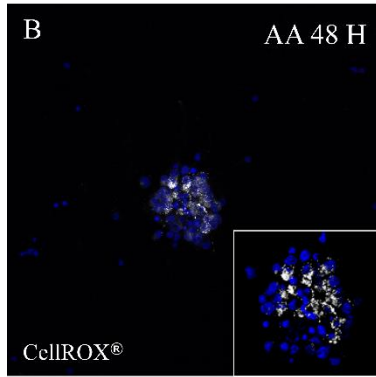
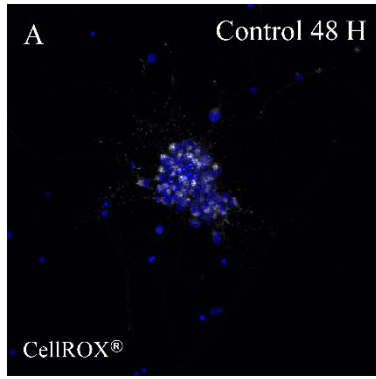




Figura 9. Tratamiento prolongado con AA induce un incremento en los niveles intracelulares de ROS.

A-B. Análisis realizado con microscopía confocal de célula viva en NE control (A) o tratada con AA durante 48 horas (B), que fueron incubadas con la sonda CellROX® (blanco), la cual permite la detección intracelular de ROS (recuadro en B, reconstrucción 3D de NE tratada con AA). **C-G.** Histograma representativo de la detección de CellROX® (canal APC) en la muestra control (PBS, rosado) y en NEs tratadas con AA 100 μ M (celeste), durante 12, 24, 36, 48 y 72 h, respectivamente. En la parte inferior se muestra la cuantificación de intensidad de fluorescencia promedio para CellROX, en la condición control (PBS) y tratada (AA). Análisis estadístico t-student (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001). Gráficos representativos muestran promedios \pm SEM, N=3.

La sonda *Intracellular GSH* fue utilizada para detectar los niveles intracelulares de GSH, esta sonda emite fluorescencia al reaccionar con los grupos tioles presentes en la molécula de GSH. Las imágenes obtenidas en célula viva mediante microscopía confocal muestran una intensa marca para esta sonda, mucho más intensa que la marca de CellROX®. Se observa claramente una localización intracelular de ThioBrigh Green™, la cual no sólo se detecta a nivel citoplasmático, sino que además se distribuye en las neuritas tanto en una NE control (Figura 10 A) como en una NE tratada con AA durante 48 h (Figura 10 B). Los resultados de citometría de flujo no arrojan diferencias significativas en los niveles de GSH entre las muestras control y tratadas con AA 100 µM a las 12, 24 y 36 h post-tratamiento (Figura 10 C-E). Mientras que, a las 48 h se detecta una tendencia de disminución no significativa en la concentración relativa de GSH post-tratamiento con AA (Figura 10 E). Interesantemente, en las muestras tratadas con AA durante 72 h, existe una clara población que se desplaza a la derecha en el histograma (Figura 10 F), evidenciando un incremento significativo en la intensidad de la sonda comparado con la condición control.

Recientemente se ha asociado la acumulación de DHA intracelular con la inducción de productos de glicación terminal, como Carboximetil-lisina (CML); de esta forma, analizamos si nuestra condición experimental induce modificaciones proteicas de esta naturaleza. Para ello, se obtuvieron extractos de proteínas desde NE tratadas con AA 100 µM durante 72 h y muestras control tratadas con PBS, donde se realizó la detección del producto de glicación terminal (AGE) CML y se realizaron análisis de carbonilación de proteínas mediante la técnica de OxyBlot (Figura 11). Para realizar los análisis se utilizó la misma cantidad de proteínas de los extractos provenientes del control o tratados con AA, lo cual se observa en el gel SDS-PAGE (Figura 11 A). En el *immunoblot* para identificar CML, las muestras tratadas con AA presentan un bandeo de mayor intensidad que el control (Figura 11 B), interesantemente, en los análisis de carbonilación, también se observa un incremento principalmente en proteínas de alto peso molecular en las muestras tratadas con AA (Figura 11 C). La cuantificación

mediante densitometría, señala que existe un 17% de incremento en los niveles de CML y un 16% más de proteínas carboniladas en los extractos proteicos tratados con AA, durante 72 h, en comparación a los controles (Figura 11 D).

En resumen, éstos resultados sugieren que durante el tratamiento con AA 100 μ M en NE adheridas *in vitro*, se induce un incremento en la concentración de ROS intracelulares entre las 36 y 48 horas, lo cual se acompaña de una respuesta compensatoria que incrementa los niveles de GSH a las 72 h post-tratamiento. Esta acumulación gradual de DHA en las neuronas en diferenciación, afectaría el balance redox intracelular, volviéndose mayormente oxidativo, induciendo modificaciones proteicas como la generación de AGEs o carbonilación, que alteraría la estructura y función proteica.



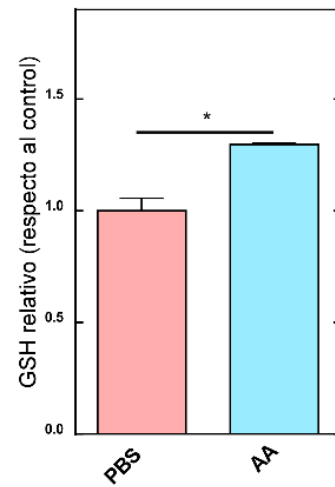
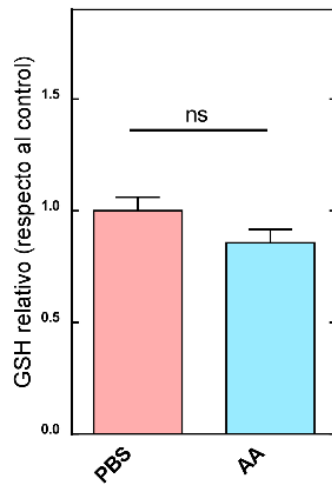
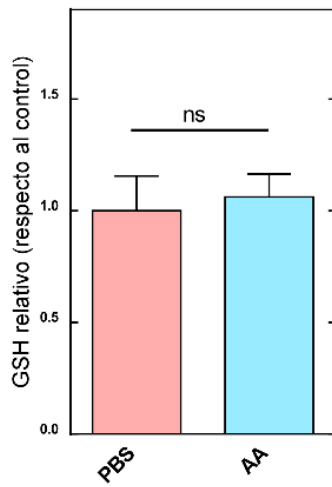
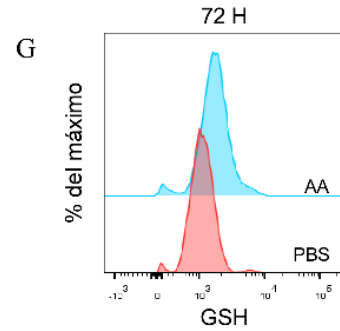
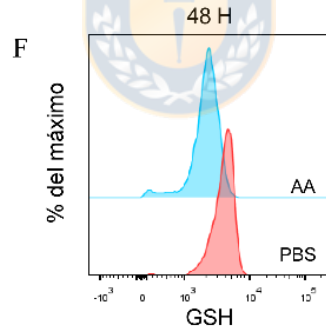
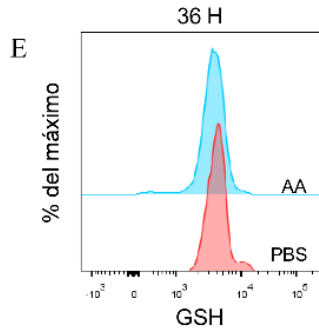
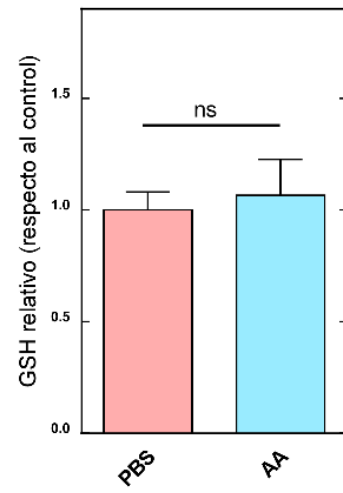
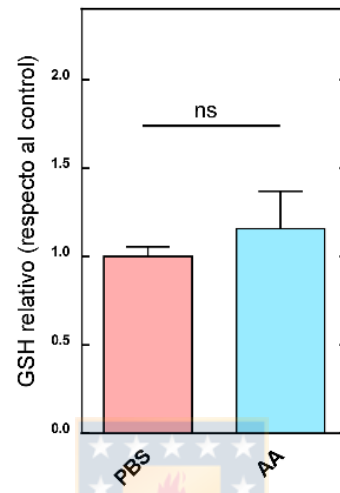
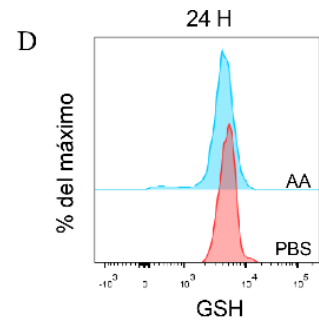
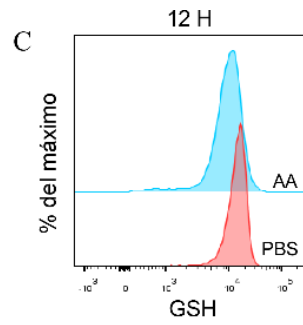
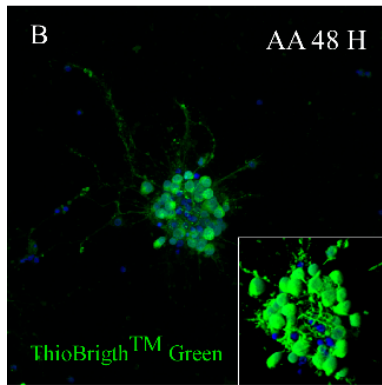
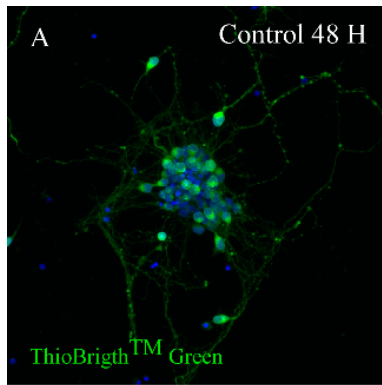




Figura 10. Análisis de los niveles de GSH durante el tratamiento con AA.

A-B. Z-stack de NE control (**A**) o tratada con AA durante 48 h (**B**) obtenido a través de microscopía confocal en célula viva para la detección de la fluorescencia emitida por la sonda ThioBright™Green, para la medición de glutatión reducido. Análisis mediante citometría de flujo, realizado en NEs control (rosado) o tratadas con AA (celeste), durante 12 (**C**), 24 (**D**), 36 (**E**), 48 (**F**) y 72 horas (**G**). En la parte superior se muestra el histograma representativo para la detección de la sonda, a través del canal FITC (GSH). En la parte inferior se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio, para la muestra control (PBS), comparada con la muestra tratada (AA) a los diferentes tiempos analizados. Análisis estadístico t-student (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001). Gráficos representativos muestran promedios \pm SEM, N=3.

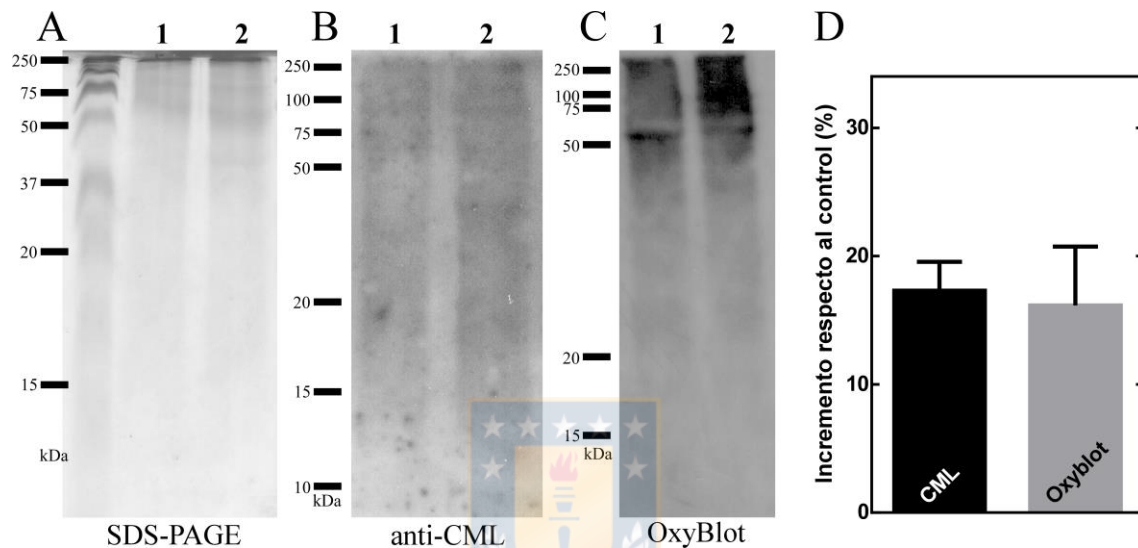


Figura 11. Ambiente oxidativo inducido por la acumulación de DHA induce modificación de proteínas.

A. Control de carga mediante análisis de SDS-PAGE. **B.** Análisis de los niveles de carboximetil-lisina (CML) mediante Western Blot en extractos de proteínas obtenidos desde NE control (1) o tratadas con AA 100 μ M durante 72 h (2). **C.** Detección de carbonilación de proteínas utilizando la técnica de OxyBlot en extractos proteicos de NE control (1) y tratadas con AA durante 72 h (2). **D.** Cuantificación de la cantidad de CML y proteínas carboniladas mediante densitometría, representado como porcentaje de aumento frente a las muestras control. Gráfico representa promedio \pm SEM, N=3.

6.5 Capítulo 2. Determinación del efecto del reciclamiento de vitamina C en la mantención de procesos neuríticos *in vitro*

Una vez confirmada la participación de DHA en el proceso de pérdida de neuritas en NE adheridas sometidas a un tratamiento prolongado con AA, el siguiente paso fue analizar, si el reciclamiento de vitamina C *in vitro* podría regular esta respuesta biológica.

6.6 Caracterización de células recicladoras de DHA.

Para establecer un modelo de reciclamiento de DHA *in vitro* fue necesario seleccionar células que expresaran transportadores de DHA y que pudieran captar esta molécula desde el medio extracelular, durante el tratamiento con AA. En este caso, se utilizó la línea celular HL60 (línea neutrofílica humana) la cual ha sido utilizada previamente en la literatura por alta capacidad para transportar eficientemente DHA (F. J. Nualart et al., 2003). Adicionalmente, se utilizaron las células U87 (glioblastoma humano), que poseen características astrocíticas, de esta forma se acercan más a la biología del mecanismo de reciclamiento. Finalmente, utilizamos cultivo primario de astrocitos corticales jóvenes (7 DIV), los cuales participan directamente en este mecanismo de reciclamiento. En una primera etapa se procedió a caracterizar la expresión y función del transportador GLUT1 en éstos tipos celulares. Como se observa en la figura 12, mediante PCR convencional, se amplificó una banda de 200 pb, tanto en extractos de células HL60, U87 y astrocitos corticales (Figura 12 A, F, K, surco 1), comprobando que existe expresión del ARNm para GLUT1. Posteriormente, utilizando Western Blot, se observó una banda entre 50-55 kDa para todas las células (Figura 12 B) (Figura 12 G, L). Finalmente el análisis inmunocitoquímico definió en células HL60 y U87 ae GLUT1 en la membrana plasmática (Figura 12 C, H). En astrocitos corticales, GLUT1 se observó en la membrana celular como intracelular (Figura 12 M). Faloidina y GFAP fueron utilizados como marcadores del citoesqueleto de las células HL60 y U87 o astrocitos, respectivamente (Figura 12 D, I, N). Finalmente, confirmamos que la expresión de GLUT1 estuviera relacionada con el transporte

efectivo de DHA, para ello realizamos análisis de transporte utilizando ^{14}C -DHA, observando una concentración intracelular cercana a $1,7 \pm 0,04$ nM en células HL60 y $1,7 \pm 0,13$ nM U87 en 10 minutos de análisis (Figura 12 E, J; respectivamente). Por su parte, en astrocitos corticales, aún cuando en el análisis inmunocitoquímico mostraba la menor proporción de GLUT1 localizado en la membrana celular, estas células presentaron una alta captación de DHA de $2,8 \pm 0,17$ nM en 10 minutos de transporte (Figura 2 O). Cabe destacar, que el transporte de DHA fue significativamente inhibido por la presencia de citocalasina B, al igual que con la molécula WZB117, la cual es un inhibidor específico para GLUT1, recientemente caracterizado (Ojelabi, Lloyd, Simon, De Zutter, & Carruthers, 2016).

Todas estas observaciones nos permiten concluir que tanto las líneas celulares HL60 y U87 como el cultivo primario de astrocitos corticales de 7 DIV, son células que expresan GLUT1 de manera funcional, mostrando una alta captación de DHA, siendo en adelante las células de elección para realizar el reciclamiento de DHA en NE adheridas en cultivo.

6.7 Reciclamiento de DHA *in vitro* permite la mantención de neuritas.

El primer modelo de reciclamiento de DHA *in vitro* que utilizamos fue la línea celular HL60, éstas células crecen en suspensión, lo cual representan una ventaja para llevar a cabo los experimentos en NE adheridas. Siguiendo el protocolo presentado en la figura 13 A, las NE fueron formadas, adheridas y tratadas con AA o AA/DHA $100 \mu\text{M}$ durante 72 h. A las 24 h de tratamiento, fueron añadidas al medio de cultivo las células HL60, la decisión de agregar las células recicladoras en este momento del tratamiento deriva de los niveles intracelulares de AA, que se mantienen hasta las 24 h, previo a su oxidación a DHA (Figura 7). De esta forma, el análisis inmunocitoquímico utilizando anti-tubulina βIII revela que hasta las 72 horas de tratamiento con AA, existe una baja presencia de NE con neuritas (Figura 13 B-C), lo cual cambia significativamente al observar los cultivos en presencia de HL60 y tratados con AA (Figura 13 D-E) o tratados con DHA (Figura 13 F-G). En éstos últimos casos es posible

encontrar una respuesta mixta con NEs que presentan largos procesos positivos a tubulina que salen desde la NE y que se observan en mayor detalle en las imágenes tomadas con mayor aumento (Figura 13, E, G), pero también, NE que han perdido sus procesos, siendo una respuesta heterogénea. Sin embargo, al realizar la cuantificación del total de NE que mantienen neuritas, encontramos que los cultivos tratados con AA durante 72 h, sólo presentan un $3,7 \pm 1,9\%$ de NE con procesos positivos a tubulina β III, mientras que, luego del mismo tratamiento, pero en presencia de HL60 se obtiene más de un $53,9 \pm 6,2\%$ de NE con neuritas. En el caso del tratamiento con AA y dos pulsos de DHA, en presencia de HL60 hasta las 72 h, se mantiene un $47,3 \pm 6,5\%$ de NEs con procesos neuríticos (Figura 13 H). De esta forma, el co-cultivo de NEs adheridas tratadas con AA o AA/DHA durante 72 h, en presencia de la línea celular HL60, permite la recuperación de aproximadamente un 50% de las NE que mantienen sus neuritas. Con el fin de comprobar que la recuperación de NE con neuritas, en presencia de HL60, es debido principalmente al reciclamiento de DHA y no a la secreción al medio de cultivo de algún factor trófico, se realizó un experimento control con medio condicionado de células HL60. Para ello, se mantuvieron células HL60 en medio NeuroCult™ durante 48 h, luego se separaron las células y se obtuvo el medio condicionado, el cual fue agregado a las NE adheridas y tratadas a las 24 h (Figura 14 A). A las 72 h post-tratamiento se observó mediante inmunocitoquímica que no existe ningún efecto que incremente la presencia de procesos positivos a tubulina β III en las NEs tratadas con AA en presencia del medio condicionado (Figura 14 B-C), así como tampoco existe un efecto negativo sobre los procesos de las NE control, tratadas con PBS, durante 72 h en presencia del medio condicionado (Figura 14 D-E).

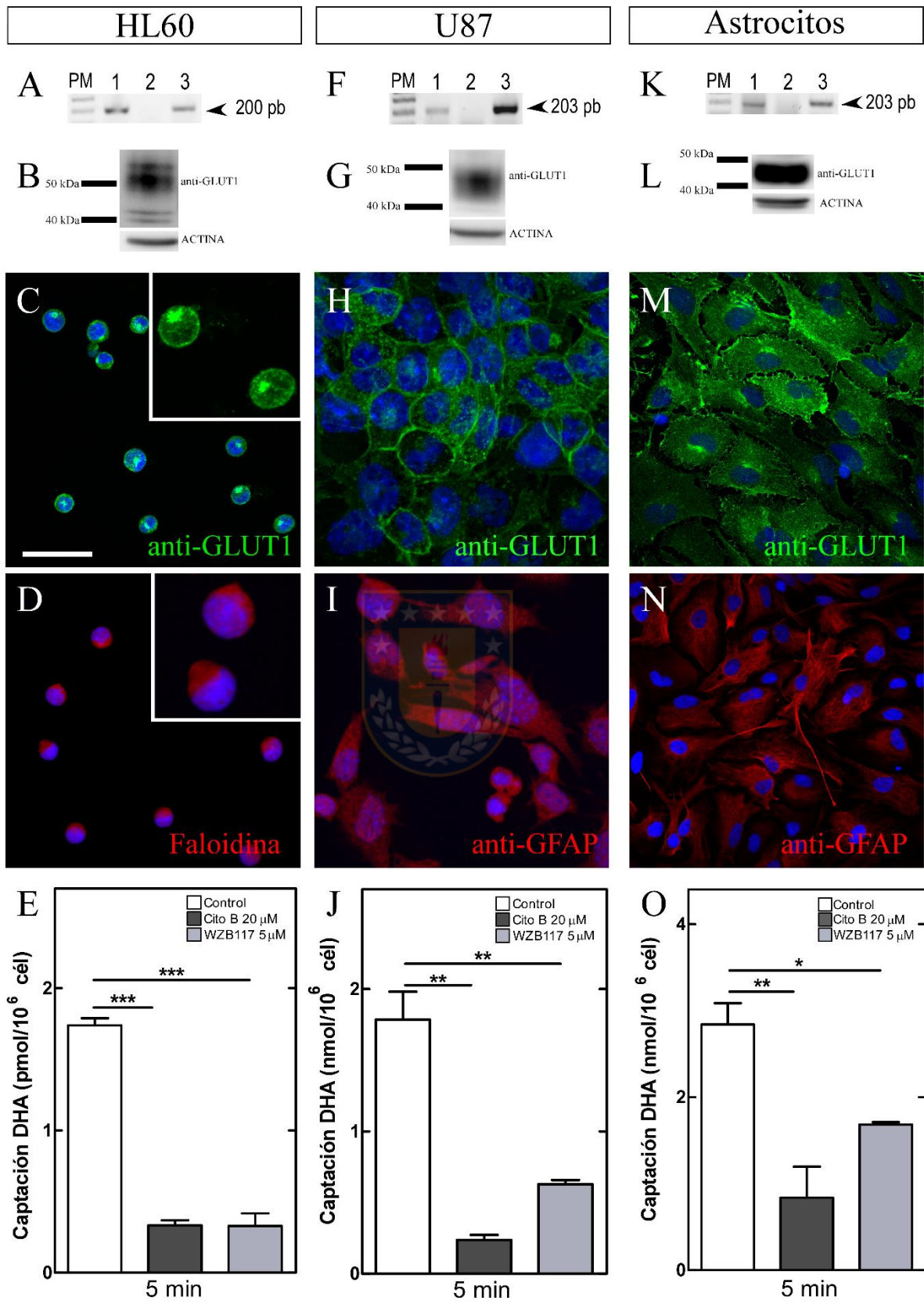




Figura 12. Expresión y función del transportador GLUT1 en líneas celulares utilizadas para la captación de DHA.

A, F, K. Análisis de RT-PCR en extractos de RNA obtenidos desde células HL60, U87 y astrocitos corticales (línea 1, respectivamente), control negativo de RT-PCR (línea 2), control positivo utilizando extractos de línea celular humana U87 (**A**) o cerebro de rata (**F-K**) (línea 3). **B, G, L.** Western Blot para la detección de GLUT1 en extractos proteicos de células HL60, U87 y astrocitos corticales. Inmunocitoquímica contra el transportador de DHA, GLUT1 (**C, H, M**, verde), marcaje con faloidina fue utilizado para observar citoesqueleto de actina (**D**, rojo). Anti-GFAP fue utilizado para marcar citoesqueleto glial (**I-N** rojo). Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). Barra de tamaño, 50 μm . **E, J, Ñ.** Captación de DHA 100 μM durante 5 min en presencia de Na^+ , citocalasina B 20 μM y WZB117 5 μM (inhibidor específico de GLUT1) en células HL60, U87 y astrocitos; respectivamente. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráficos muestran promedio \pm SEM de dos experimentos independientes realizados en duplicado.

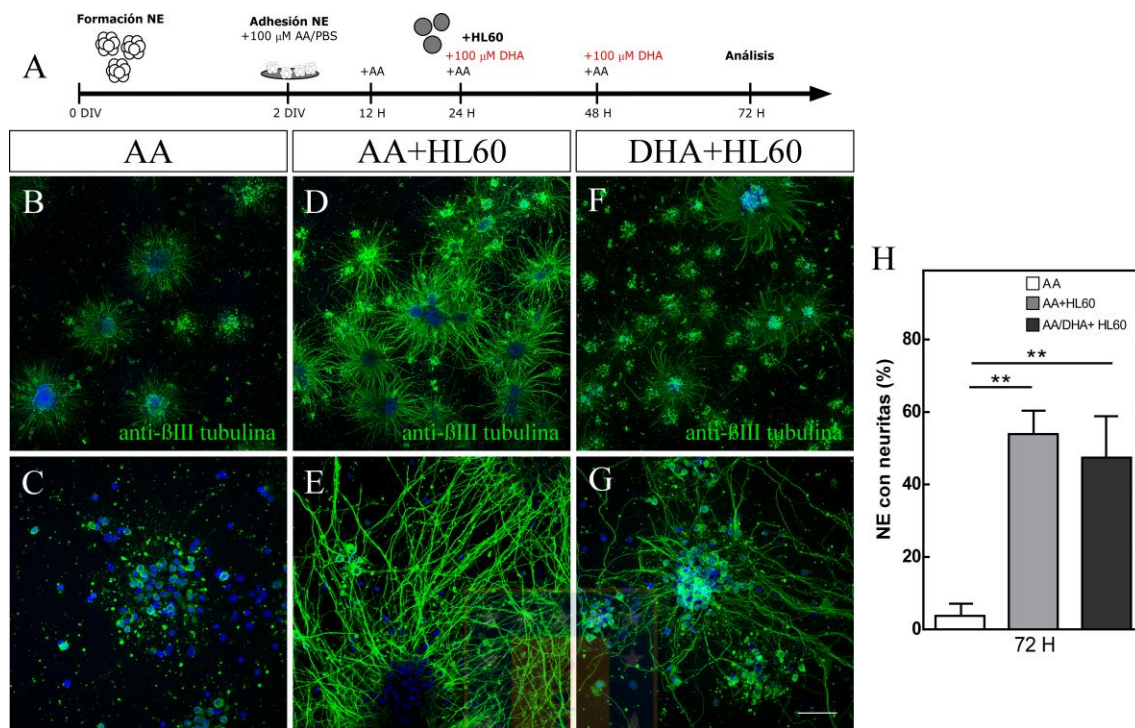


Figura 13. Reciclamiento de DHA mediante células HL60 permite la mantención de neuritas durante el tratamiento con AA y DHA.

A. Protocolo de co-cultivo de NE formadas a partir del cultivo primario en presencia de células HL60 desde las 24 h de tratamiento con AA o con AA/DHA 100 μ M y analizadas a las 72 h post-tratamiento. Inmunocitoquímica anti-tubulina β III (verde) en NE tratadas con AA 100 μ M durante 72 h en ausencia (**B-C**) o presencia (**D-E**) de células HL60. **F-G.** NEs tratadas con AA durante las primeras 24 h y luego suplementadas con DHA 100 μ M en presencia de células HL60. **B, D, F.** Imágenes tomadas usando la función de *Tile-scan* del microscopio confocal espectral. **C, E, G.** Imágenes tomadas utilizando un aumento mayor en las imágenes mostradas en B, D y F. **H.** Cuantificación del total de NEs que mantienen procesos tubulina β III positivos respecto al control. Barra de tamaño, 50 μ m. Análisis estadístico t-student (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Gráfico muestra el promedio \pm SEM, 45-50 NEs por condición, N=3.

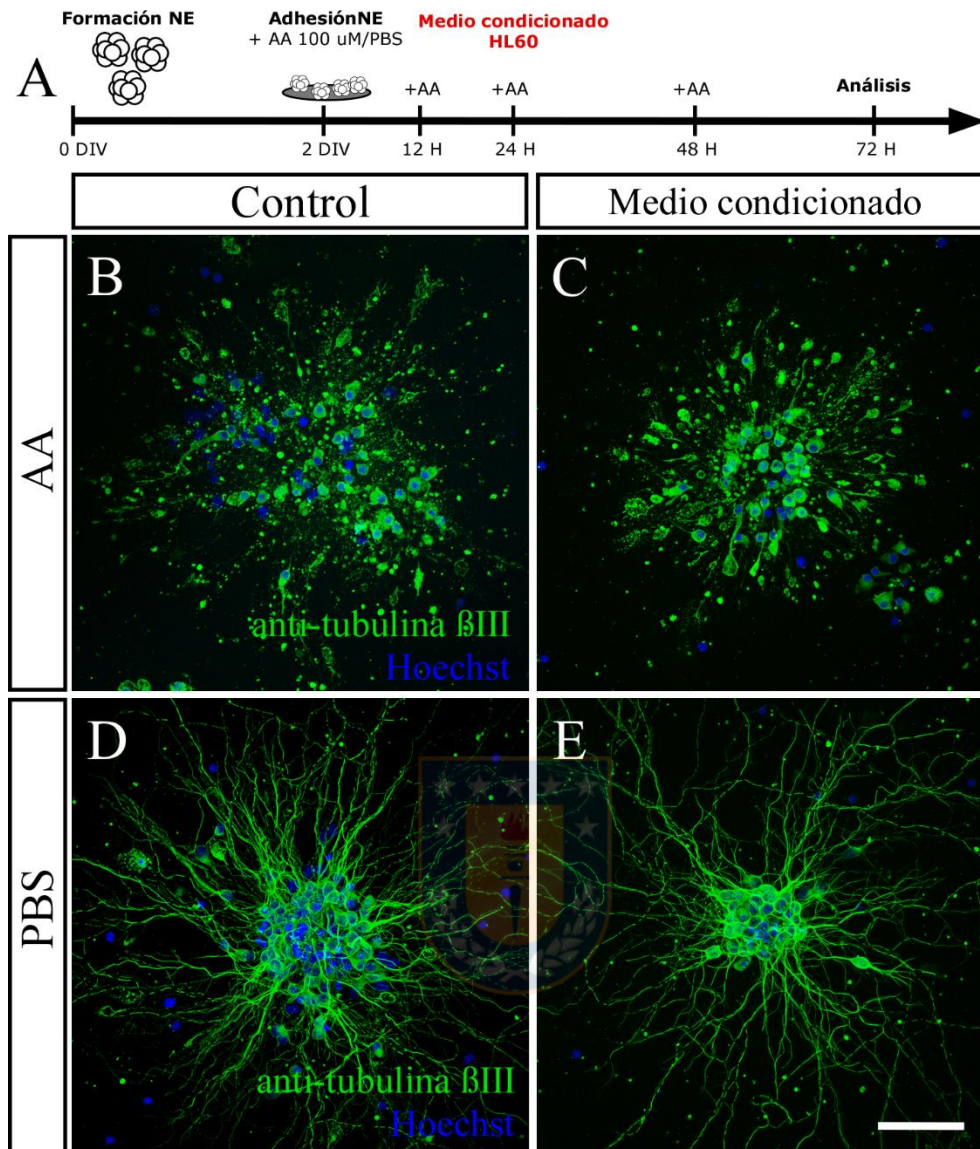


Figura 14. Células HL60 no secretan factores que afectan el crecimiento de neuritas.

A. Protocolo utilizado para realizar el experimento; el “medio condicionado” fue previamente incubado en presencia de células HL60 durante 48 h, posteriormente, fue agregado a las NE a las 24 h post-tratamiento y se mantuvo hasta las 72 horas. **B-C.** Inmunocitoquímica contra tubulina β III (verde), realizada en NEs luego de 72 h de tratamiento con AA en ausencia (**B**) o presencia (**C**), del medio condicionado con células HL60. **D-E.** NEs tratadas con PBS durante 72 h en condición control (**D**) o cultivadas en presencia del medio condicionado (**E**), que fueron marcadas con anti-tubulina β III. Hoechst fue utilizado como marcador nuclear. Barra de tamaño, 50 μ m.

En una segunda fase, trabajamos con las células U87. Este tipo celular crece en monocapa, adherida a la superficie de la placa de cultivo, por lo tanto, fue necesario realizar una adaptación al modelo de co-cultivo previamente utilizado con las células HL60. De esta forma, se sembraron las células U87 sobre vidrios tratados con poli-L-lisina y luego de 2 DIV en suspensión, las NEs se adherieron directamente sobre las células U87 (Figura 15 A). Al mismo tiempo se comenzó el tratamiento con AA 100 μ M, el cual se mantuvo hasta las 72 h, momento en el cual se realizó el análisis inmunocitoquímico para tubulina β III. En la figura 15 B se puede observar, como las células U87 (GFAP positivas, rojo) interaccionan directamente con la NE positivas a tubulina β III (verde), formando un co-cultivo mixto. Las NE logran diferenciarse de la misma manera como fue previamente observada en el capítulo 1. En la condición control fueron tratadas con AA durante 72 h, en ausencia del cultivo mixto, se observa pérdida de neuritas (Figura 15 C), mientras que, aquellas NE diferenciadas en presencia de células U87, mantienen sus neuritas positivas a tubulina β III hasta las 72 h de tratamiento con AA (Figura 15 D). La cuantificación nos muestra que al ser co-cultivos con células U87, un $91,92 \pm 2,4\%$ de las NE mantienen sus neuritas, sin embargo, solo el $14,29 \pm 12,71\%$ de las NEs crecidas en ausencia de una célula recicladora de DHA, muestran neuritas (Figura 15 E).

Finalmente, se realizaron los cultivos mixtos utilizando astrocitos corticales de 7 DIV, para comprobar que la presencia de células que forman parte del mecanismo de reciclamiento de vitamina C, podría reproducir el mismo efecto, que el observado con la línea celular U87. Para realizar éstos experimentos se siguió el mismo protocolo previamente descrito, en la figura 16 A podemos ver un análisis en *Tile-Scan* de un cultivo mixto de NE-astrocitos, donde se observa en rojo los astrocitos corticales, que contactan estrechamente y rodean a las NE, las cuales extienden largos procesos neuríticos positivos a tubulina β III (verde). Sorprendentemente, el cultivo mixto con astrocitos corticales permite que el $99,02 \pm 0,9\%$ de las NE analizadas

mantenga largas neuritas, luego del tratamiento con AA por 72 h (Figura 16 C), comparado con los controles tratados con AA en ausencia de astrocitos (Figura 16 B), donde sólo un $1,96 \pm 1,9\%$ de las NEs presentaron procesos neuríticos (Figura 16 D).

Los resultados obtenidos con el reciclamiento de vitamina C *in vitro*, tanto con la línea celular HL60, como las células U87 y el cultivo primario de astrocitos corticales, demuestran que la presencia de células capaces de captar eficientemente el DHA desde el medio de cultivo, permite que las NEs mantengan sus neuritas en crecimiento, hasta las 72 h.

6.8 Inhibición del reciclamiento de DHA *in vitro*.

Para comprobar que la mantención de neuritas en las NEs co-cultivadas con las distintas células recicladoras de DHA, se debe efectivamente a la captación de esta molécula a través de GLUT1, fue necesario utilizar un mecanismo de inhibición para este transportador. Al respecto, el inhibidor más utilizado en la literatura corresponde a citocalasina B; sin embargo, debido a que esta molécula también se une al extremo “+” del filamento de actina, no es posible realizar experimentos de larga duración sin tener que removerla del medio, ni realizar experimentos *in vivo*. Es por ello que optamos por otro tipo de molécula que permitiera la inhibición de GLUT1 solamente. En este contexto, en el 2010 y como respuesta al descubrimiento del “Efecto *Warburg*” en célula cancerosas, se sintetizaron diversas moléculas pequeñas, que inhiben el transporte de glucosa a través de GLUT1, una de ellas fue WZB117, la cual ,hasta la fecha es una de las pocas moléculas que ha sido utilizada en modelos *in vivo*.

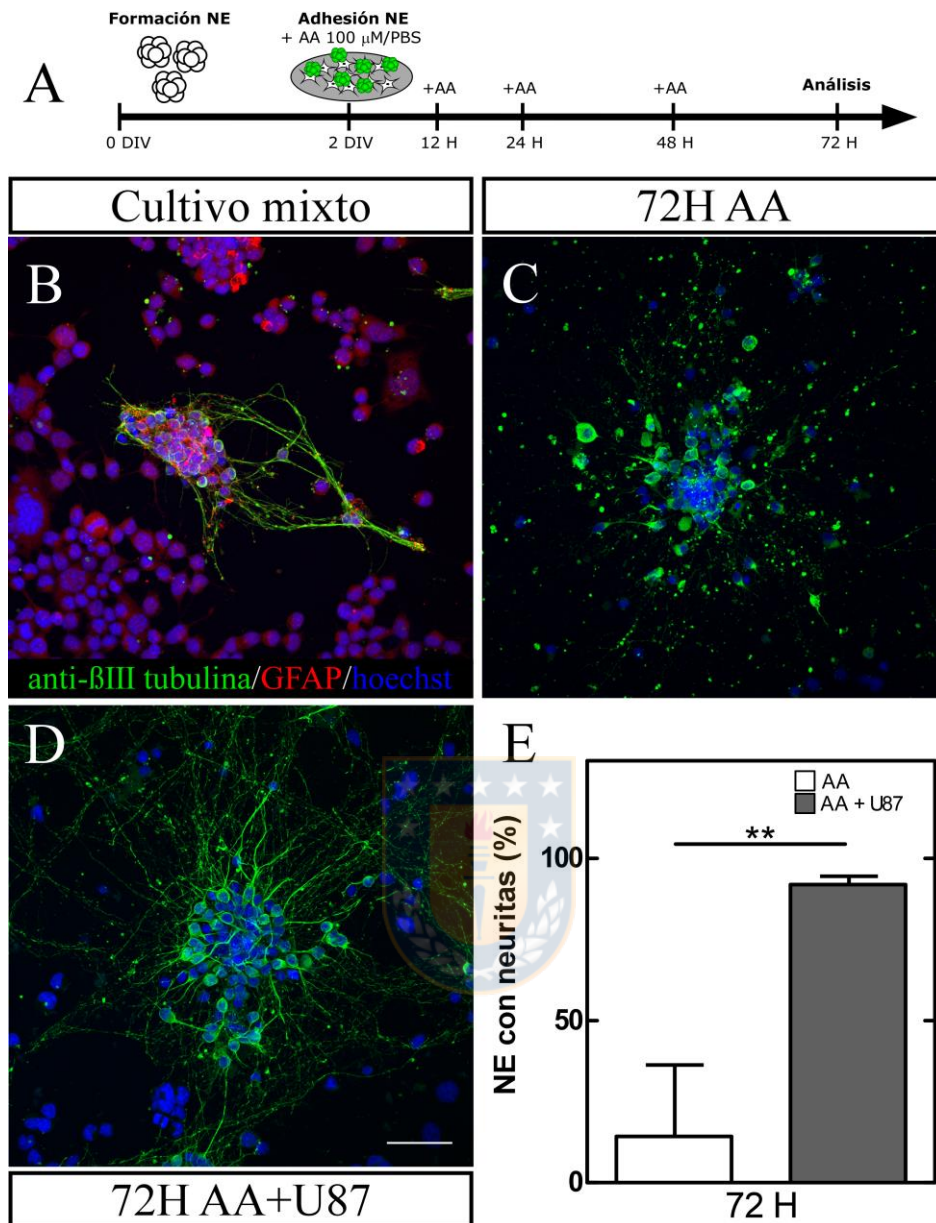


Figura 15. Cultivo mixto con células U87 permite la mantención de neuritas.

A. Protocolo de cultivo mixto con células U87 y tratamiento con AA. **B.** Inmunocitoquímica utilizando anti-tubulina β III (verde) y anti-GFAP (rojo), en cultivo mixto de células U87/NE, luego de 72 h en cultivo. **C-D.** Análisis inmunocitoquímico para tubulina β III (verde) en NE tratadas con AA durante 72 h en ausencia (**C**) y presencia de células U87 (**D**). **E.** Cuantificación del porcentaje de NE que mantienen neuritas hasta las 72 h de tratamiento. Análisis estadístico t-student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráfico muestra el promedio \pm SEM, 45-50 NEs por condición, $N=3$.

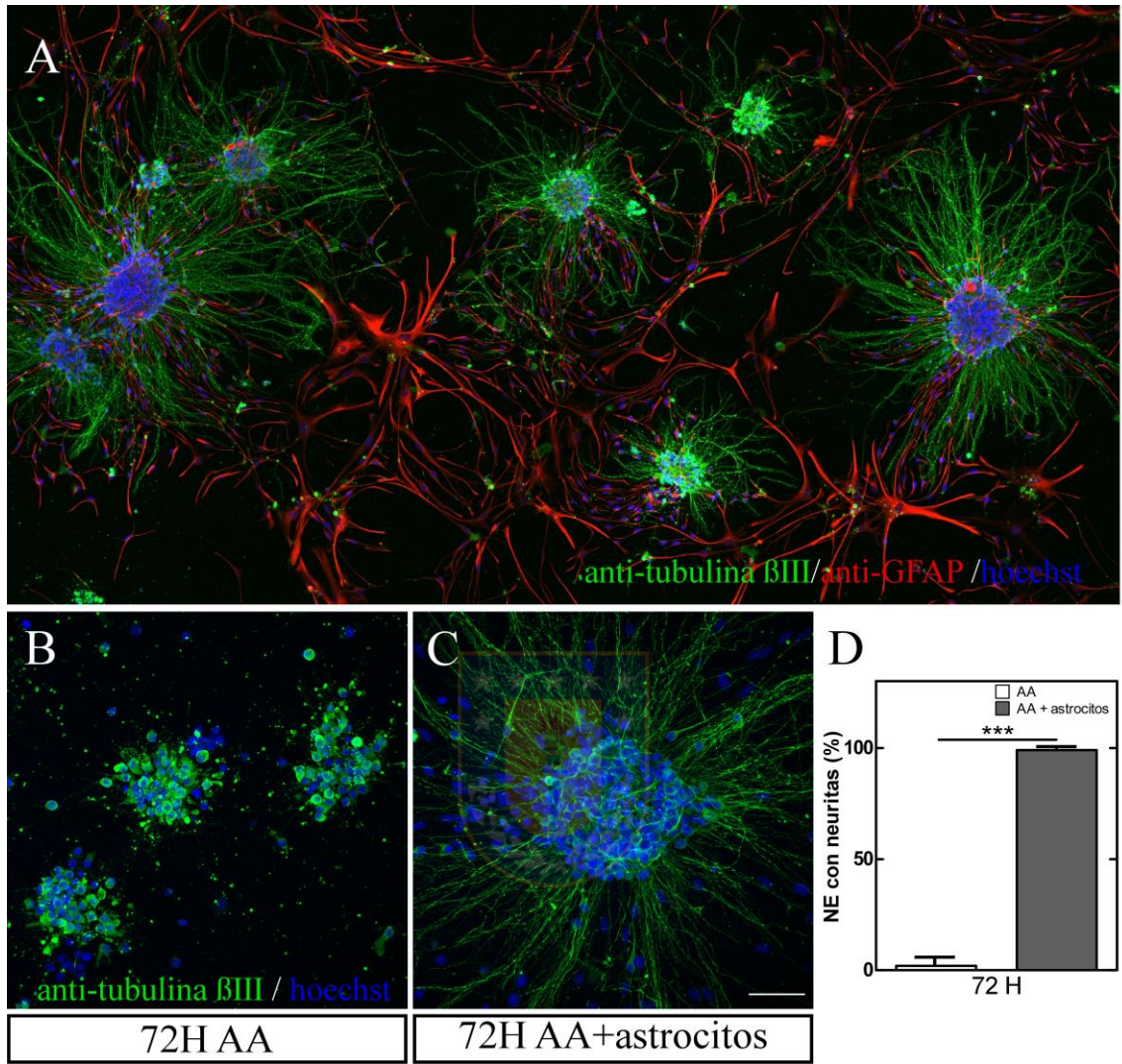


Figura 16. Reciclamiento de DHA utilizando astrocitos corticales permite la mantención de neuritas *in vitro*.

Tile-scan de inmunocitoquímica contra tubulina β III (verde) y GFAP (rojo) en NE co-cultivadas con astrocitos corticales y tratadas durante 72 h con AA 100 μ M (**A**). **B**. NE control tratadas con AA durante 72 h en ausencia de astrocitos. **C**. Imagen en mayor aumento de NE perteneciente al cultivo en A. **D**. Cuantificación del total de NE con presencia de neuritas, en cultivo control y en co-cultivo mixto con astrocitos corticales. Hoechst fue utilizado como marcador nuclear. Barra de tamaño: 50 μ m. Análisis estadístico t-student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráfico muestra el promedio \pm SEM, 45-50 NEs por condición, N=3.

En una primera fase realizamos estudios de viabilidad celular al tratar con el inhibidor. Determinamos que en células HL60 existe una disminución significativa de la viabilidad celular (XTT) al incubarlas con WZB117 10 ($69,9 \pm 4,5\%$) o 15 μM ($42,14 \pm 2,3\%$) (Figura 17 A). Un análisis más fino, en tiempo real, reveló que sólo existe un incremento en las células muertas a los 15 μM (Figura 17 B). En el caso de las células U87, determinamos mediante XTT que desde los 5 μM se observa una disminución de la viabilidad ($77,56 \pm 3,8\%$) (Figura 17 E), en contraste, el estudio en tiempo real no presenta un aumento en la población muerta, a ninguna de las concentraciones analizadas (Figura 17 F). Debido a que WZB117 debe ser resuspendido en DMSO, se corroboró la viabilidad con este vehículo a las dos concentraciones críticas determinadas en las curvas de concentración, de esta manera, en ambas líneas celulares se determinó que a 5 μM no existe diferencias entre WZB117 y DMSO, sin embargo, a 10 μM WZB117 disminuye en un $42,4 \pm 5,9\%$ la viabilidad en HL60 y en un $28,57 \pm 5,4\%$ en U87 (Figura 17 C, G; respectivamente). Por el contrario, al realizar el mismo estudio utilizando IncuCyte®, no se detectó ninguna diferencia en la viabilidad inducida por WZB y su vehículo en las dos concentraciones analizadas (Figura 17 D, H). En el caso de los astrocitos corticales sólo se realizaron análisis mediante XTT, donde se observó una disminución significativa de la viabilidad desde los 10 μM (Figura 17 I), esta disminución es cercana al 30% y no se observa una disminución inducida por DMSO (Figura 17 J).

En la literatura, WZB117 sólo ha sido caracterizado como un inhibidor del transporte de glucosa a través de GLUT1, es por ello que comprobamos mediante estudios de transporte utilizando ^{14}C -DHA, que esta molécula efectivamente inhibe el transporte de DHA en células HL60, U87 y astrocitos corticales, al incubar con 5 μM WZB117 (Figura 12). En el caso de las células HL60 y U87, esta inhibición es incluso comparable con el efecto de citocalasina B (Figura 12 E, J), validando entonces su utilización en la inhibición del transporte de DHA en nuestros modelos de reciclamiento *in vitro*.

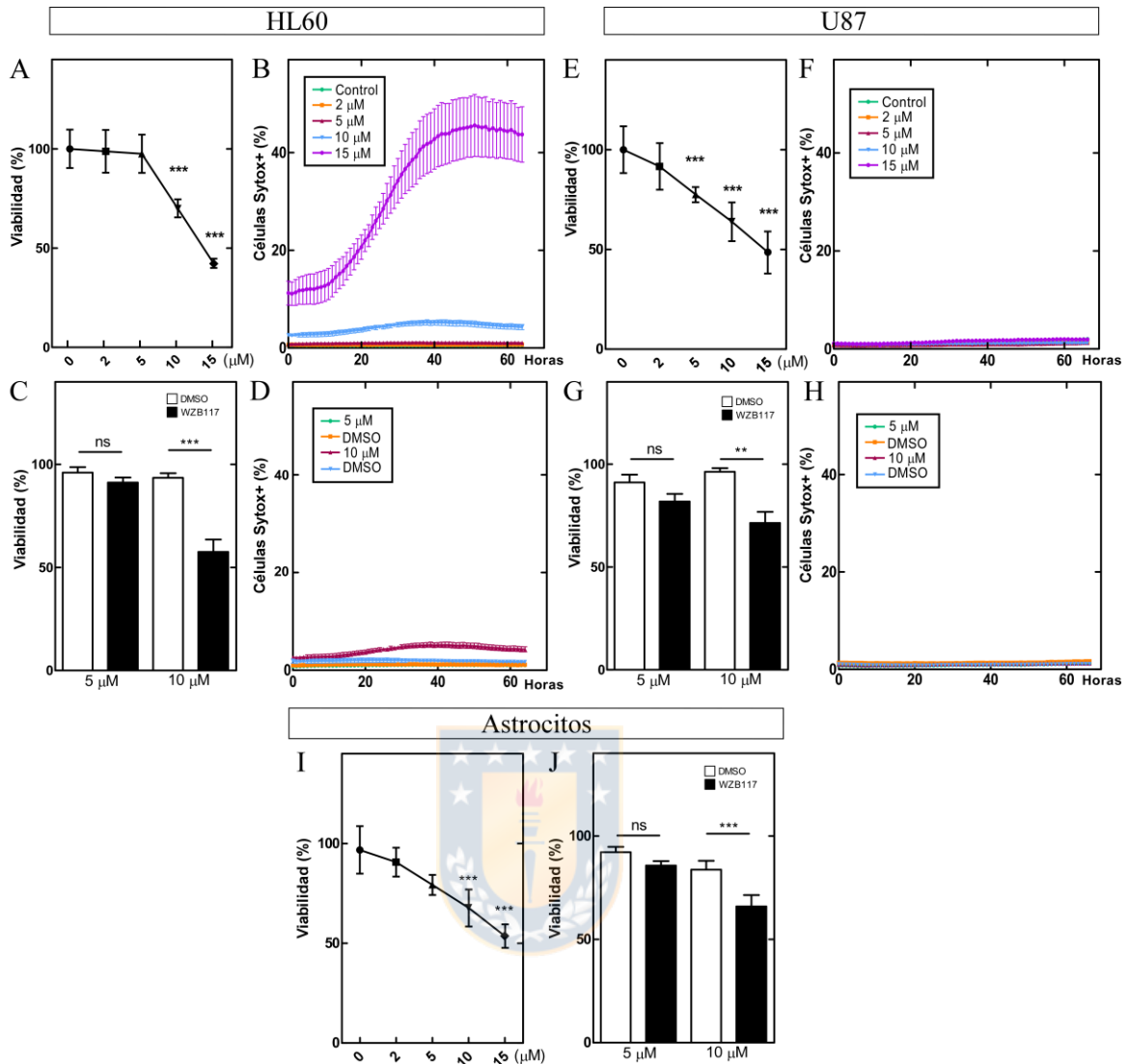


Figura 17. Análisis de viabilidad en células utilizadas para el reciclamiento de DHA expuestas a WZB117.

Análisis de viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor WZB-117 (2, 5, 10 y 15 μM), en células HL60, U87 o astrocitos corticales; respectivamente, utilizando el método de XTT (**A**, **E**, **I**) o mediante el análisis de incorporación de Sytox Green, utilizando IncuCyte (**B**, **F**). Estudio de viabilidad mediante XTT (**C**, **G**, **J**) o IncuCyte (**D**, **H**), en células expuestas a 5 y 10 μM ón de WZB117, en comparación a su vehículo, DMSO. Los estudio realizados con XTT se realizaron luego de 24 h de exposición al inhibidor, ensayos utilizando IncuCyte® se realizaron por un total de 60 h. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráfico muestra el promedio \pm SEM, N=3.

Para realizar los experimentos de inhibición del reciclamiento, en los co-cultivos de NEs con HL60, éstas células fueron agregadas al cultivo a las 24 h, tal como lo muestra el protocolo presentado en la figura 18A. Sin embargo, en esta ocasión se utilizaron células HL60 bajo 3 tratamientos diferentes. La primera, fue la condición control sin ningún tratamiento, observando largos procesos neuríticos generados en la NE (Figura 18 C), esta respuesta se compara con el control en ausencia de co-cultivo (Figura 18 B). En la cuantificación se obtiene un $62,14 \pm 9,3\%$ de NEs que mantienen sus neuritas, luego del tratamiento con AA hasta las 72 h (Figura 18 E, células grises). En la segunda y tercera condición, las células HL60 fueron tratadas con el inhibidor WZB117 de diferentes maneras; algunas fueron pre-tratadas durante 24 h, luego fueron lavadas y agregadas al cultivo de NEs (Figura 18 A, barra roja). En este caso, se observa sólo un $17,24 \pm 12,24\%$ de NE con neuritas, siendo una disminución significativa comparado con el co-cultivo de HL60 sin tratamiento (Figura 18 E). Finalmente, células HL60 fueron agregadas a las NE sin ningún tratamiento y posteriormente se suplementó con $5 \mu\text{M}$ WZB117, al momento de sembrar las células. El inhibidor fue re-aplicado a las 48 h (Figura 18 B, barra rosada); en este caso se observa un $32,39 \pm 9,3\%$ de NEs con neuritas, resultado sin significancia estadística (Figura 18 E). De esta manera, comprobamos que es factible inhibir GLUT1 con WZB117 en experimentos prolongados de reciclamiento y afectar el crecimiento de neuritas.

Se realizaron además ensayos con WZB117 utilizando células U87; en este caso el inhibidor fue agregado directamente a los cultivos mixtos en una concentración de $5 \mu\text{M}$, a las 24 y 48 h de tratamiento con AA. La inmunoreacción contra tubulina mostró una menor cantidad de NEs con neuritas (Figura 19 D), en comparación con el control (Figura 19 A). Con mayor aumento, se puede ver con detalle, las largas neuritas de cultivos controles (Figura 19 B-C, cabeza de flechas), no encontradas en la otra condición (presencia de WZB117) (Figura 19 E-F). La cuantificación del total de NE que poseen neuritas arroja una disminución significativa en presencia del inhibidor de GLUT1 ($52,36 \pm 0,36\%$), en comparación al control ($93,94 +$

2,6%) o a la suplementación con su vehículo, DMSO (100%) (Figura 19, G). Finalmente, se controló la viabilidad de los cultivos de NE durante el tratamiento con AA o WZB117, mediante la incorporación de SytoxGreen e IncuCyte®. No se detectaron diferencias significativas en la viabilidad de cultivos controles o los tratados, descartándose que la menor presencia de neuritas en presencia de WZB, pueda ser atribuída a una disminución en la viabilidad de las NE (Figura 19 H).

Todos los resultados presentados en este capítulo sugieren fuertemente que la presencia de una célula que pueda captar eficientemente el DHA, desde el medio de cultivo de NE diferenciadas en adhesión, es necesaria para la mantención del crecimiento neurítico, siendo estos resultados, las primeras evidencias que permiten postular que el reciclamiento de vitamina C es importante en el crecimiento neurítico.



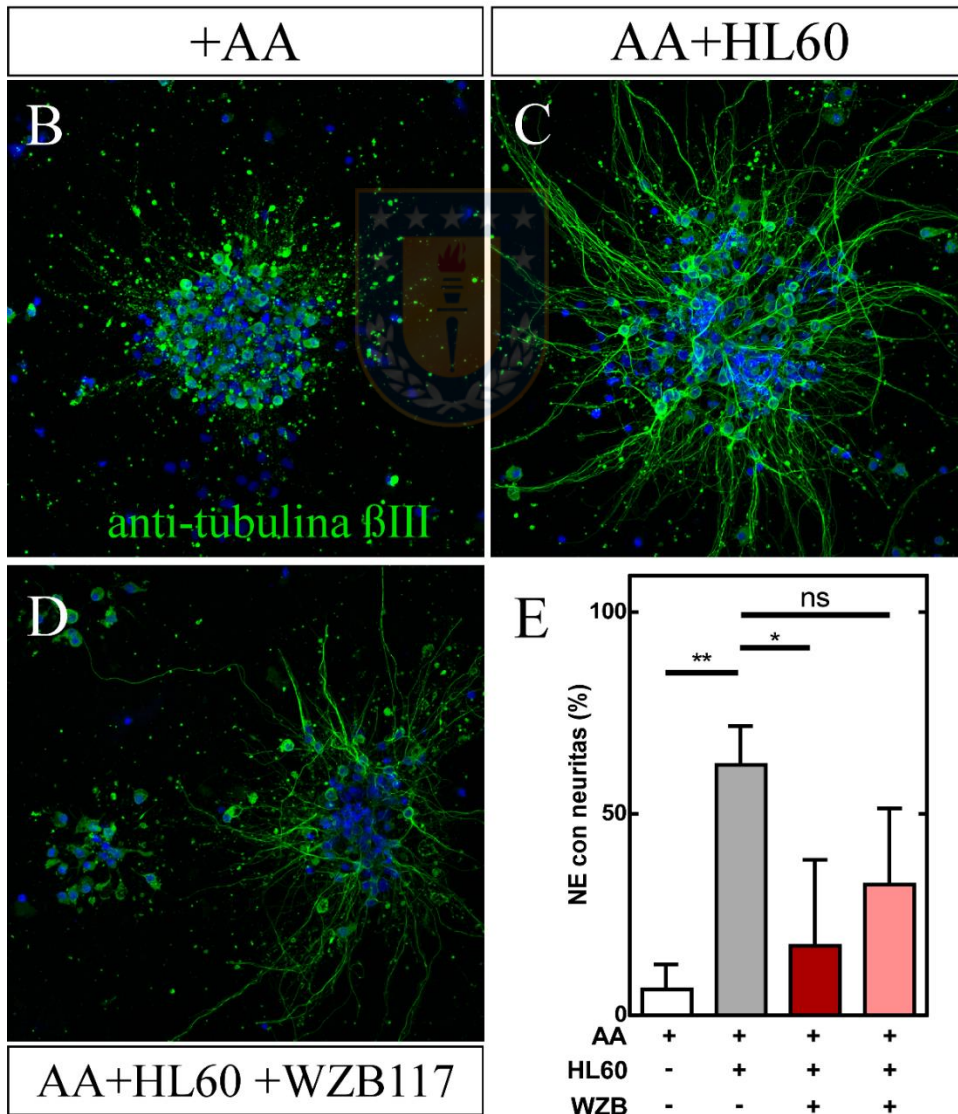
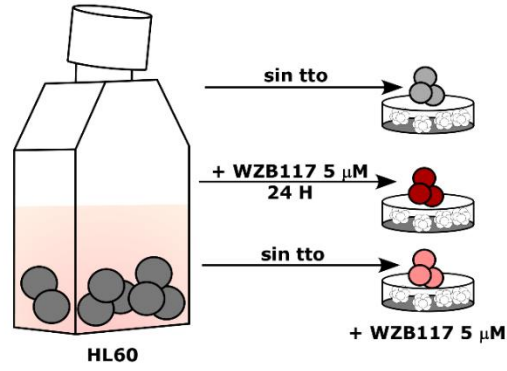
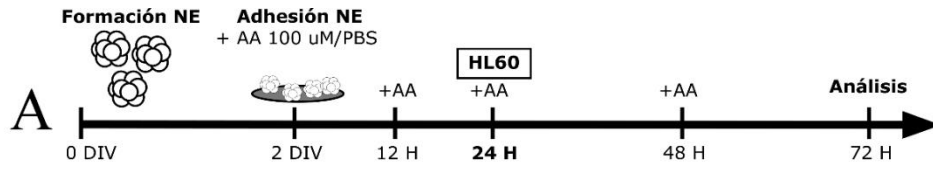




Figura 18. Inhibición de GLUT1 en co-cultivos con células HL60 disminuye el crecimiento de neuritas.

A. Protocolo utilizado para realizar el co-cultivo utilizando células HL60, sin tratamiento previo (células grises), tratando previamente las células con WZB117 durante 24 h (barras rojas) o agregando directamente el inhibidor de GLUT1 al co-cultivo (barras rosadas). **B-D.** Inmunocitoquímica representativa de NE tratadas con AA 100 μM durante 72 h (**B**), co-cultivada con células HL60 desde las 24 h de tratamiento (**C**) o en presencia de células HL60 y tratadas con WZB117 5 μM (**D**). **E.** Cuantificación del porcentaje de NEs con presencia de neuritas hasta las 72 h de tratamiento con AA, en presencia de las diferentes condiciones de co-cultivo. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráfico representa promedio \pm SEM, 45-50 NEs por condición, $N=3$.

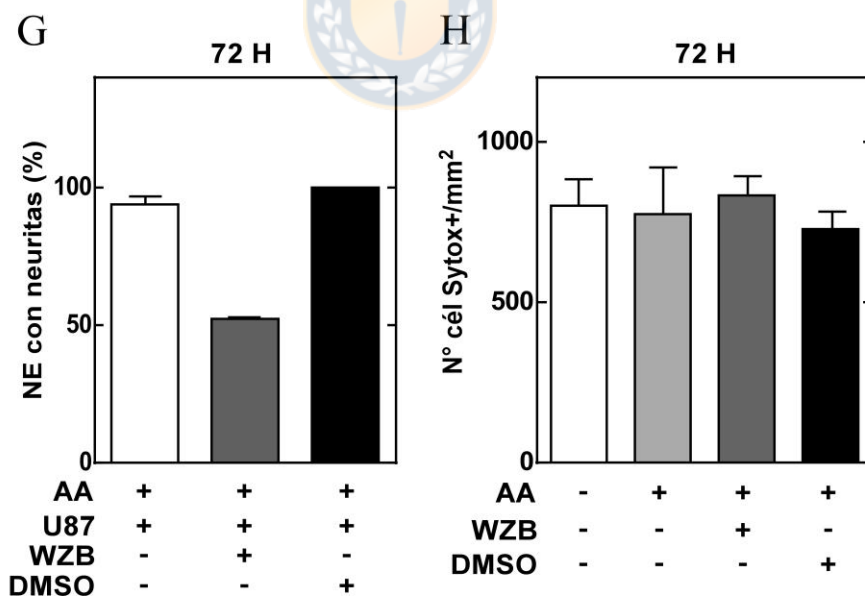
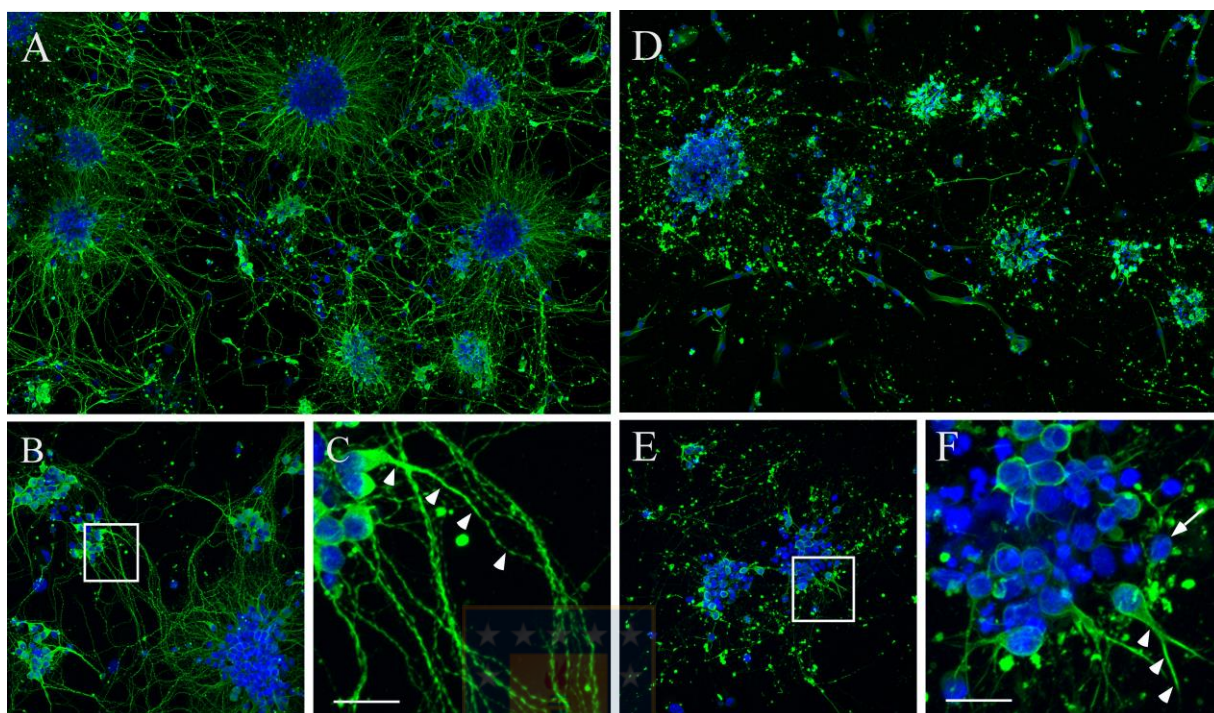




Figura 19. Inhibición del reciclamiento de DHA en cultivo mixto con células U87.

A-F. Análisis inmunocitoquímico contra tubulina β III (verde) en NE tratadas con AA 100 μ M durante 72 h. **A.** Cultivo mixto de células U87-NE analizado mediante *Tile scan*. **B.** Aumento mayor, donde se destacan la presencia de largos procesos neuríticos (recuadro) amplificados en **C**, la cabeza de flecha muestra la extensión de la neurita. **D.** *Tile scan* de un cultivo mixto U87-NE tratado con el inhibidor WZB117 5 μ M a las 24 y 48 h. **E.** Análisis en aumento mayor. **F.** Aumento digital de zona marcada en E, se observan células que no poseen neuritas (flecha) y otras que presentan neuritas de menor longitud (cabeza de flecha). **G.** Cuantificación del porcentaje de NE que forman el cultivo mixto y que presentan neuritas, luego de la inhibición con WZB o en presencia de su vehículo, DMSO. **H.** Análisis de la incorporación de SytoxGreen mediante IncuCyte®, para determinar viabilidad de NE en presencia de AA por 72 h y suplementadas con WZB117 o DMSO, desde las 24 h. N=3. Hoechst fue utilizado como marcador nuclear. Barra de tamaño; 20 μ m. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001). Gráficos muestran promedios \pm SEM N=45-50 NEs cuantificadas por condición consideradas cada una como unidad biológica de respuesta.

6.9 Capítulo 3. Estudio del reciclamiento de vitamina C *in vivo* y su posible función en la morfología neuronal durante el desarrollo postnatal temprano de la corteza cerebral.

Este último objetivo está enfocado en trasladar nuestras observaciones *in vitro* a un modelo *in vivo*, en donde hemos seleccionado los primeros días de desarrollo postnatal, para comprobar si el reciclamiento de vitamina C entre neuronas y astrocitos jóvenes, regularía la morfología neuronal en condiciones fisiológicas.

6.10 Caracterización histológica de la corteza cerebral postnatal y transporte de AA en neuronas corticales postnatales.

Debido a que esta tesis se ha centrado en el contexto del desarrollo postnatal temprano de la corteza cerebral, es que caracterizamos la citoarquitectura de la corteza de rata postnatal de 1 y 5 días (Figura 20 A,H; respectivamente). Al analizar la corteza lateral externa, utilizando anticuerpo anti-GFAP para observar la población glial, detectamos en P1 y P5 (Figura 20 B) (Figura 20 I) la glia limitante o glia marginal. Respecto a la población neuronal, la marca contra tubulina β III se observa en todo el parénquima cerebral, con una señal uniforme que delimita los bordes y procesos neuronales (Figura 20 C, J). Interesantemente, al observar con mayor aumento se detectan largas prolongaciones celulares, que salen desde las células de la glia marginal y que se extienden hacia el interior de la corteza cerebral, tanto en P1 como en P5 (Figura 20 E, L; cabezas de flechas). Éstas extensiones contactan directa y estrechamente con las neuronas de las primeras capas neuronales positivas a tubulina β III (Figura 20 F, M), siendo entonces la zona de la corteza cerebral externa, un lugar donde podría ocurrir el reciclamiento de vitamina C entre neuronas inmaduras y astrocitos marginales.

Para que este mecanismo ocurra, es necesario que las neuronas corticales sean capaces de captar AA, al respecto, sólo existen evidencias *in vitro* que demuestran que éstas células captan eficientemente AA, sin embargo, no existen evidencias *in vivo* o *ex vivo*. Si consideramos que el transporte de AA ocurre a través del transportador SVCT2, el cual es un co-transportador de AA/Na⁺, y tomando en consideración que por cada molécula de AA que ingresa al interior de la células, ingresarían 2 de Na⁺ (Godoy et al., 2007), entonces, medir lo niveles de sodio intracelulares podría ser utilizado como un método indirecto para comprobar el transporte de AA.

Para intentar responder esta pregunta, utilizamos rebanadas agudas de cerebro de ratón joven (P14-P21), las cuales fueron incubadas con SR101 para marcar los astrocitos y se les inyectó la sonda SBFI [AM], entre las capas II/III de la corteza cerebral, para detectar los niveles intracelulares de sodio. Posteriormente, las rebanadas fueron expuestas a AA 200 µM durante 30 minutos, mientras se registraban las longitudes de onda a 340/380 nm (Figura 21 A). El registro representativo de los niveles de sodio a lo largo del tiempo analizado, muestra que en una rebanada expuesta a AA existen diversas respuestas, sin embargo, se detecta un incremento sostenido tanto en neuronas como en astrocitos (Figura 21 B, E). Se comparó la concentración de sodio intracelular al tiempo 0 y luego de los 30 minutos de exposición a AA, lo cual fue graficado como ΔNa^+_i , tanto en neuronas, como en astrocitos se observa que las células tratadas con AA muestran una tendencia al incremento en los niveles de sodio en comparación al control, pero también existen células que muestran una disminución (Figura 21 C, F). Al separar ambos tipos de respuestas, se detecta un incremento significativo de 2 mM en la concentración intracelular de sodio neuronal y astrocítico; mientras que no se observaron diferencias significativas en aquellas células que mostraron una disminución (Figura 21 D, G). Posteriormente, quisimos averiguar si este incremento en los niveles de sodio intracelular, inducidos por la presencia de AA, podría gatillar cambios en otros canales iónicos, como NCX. NCX responder a altos niveles intracelulares de sodio, trabajando de manera

reversa, ingresando calcio y sacando sodio al medio extracelular (Gerkau, Rakers, Durry, Petzold, & Rose, 2018). Se utilizaron nuevamente rebanadas agudas de cerebro de ratón, las cuales fueron expuestas a 200 μ M AA durante 30 minutos (Figura 21 A), previamente, se inyectó la sonda Fura-2 en las capas II/III de la corteza, para la detección de los niveles intracelulares de calcio (Figura 22 B). Los registros representativos de neuronas y astrocitos expuestos a AA versus los controles, no muestran un aumento en el número o intensidad de las ondas de calcio (Figura 22 C-D). Contrario a lo esperado, al realizar la cuantificación, se detectó una menor frecuencia e intensidad en las ondas de calcio neuronales, sin diferencias significativas respecto al tiempo de duración (Figura 22 E, F, G). Sin embargo, un mayor número de células presentaron ondas de calcio en presencia de AA (Figura 22 H). En el caso de los astrocitos, no existen diferencias en la frecuencia (Figura 22 I), al igual que en las neuronas, se detectó una menor amplitud (Figura 22 J), acompañado de mayor tiempo de duración, sin diferencias significativas en el número de células que responden frente a AA (Figura 22 K-L).

Estas observaciones nos llevaron a elegir la corteza lateral externa como la zona de estudio para este objetivo, donde existe un contacto directo entre las neuronas de las capas superficiales de la corteza cerebral y los astrocitos de las capas marginales. Adicionalmente, comprobamos de manera indirecta que las neuronas corticales captan AA en concentraciones fisiológicas, por lo tanto, el mecanismo de reciclamiento de vitamina C podría ser posible.

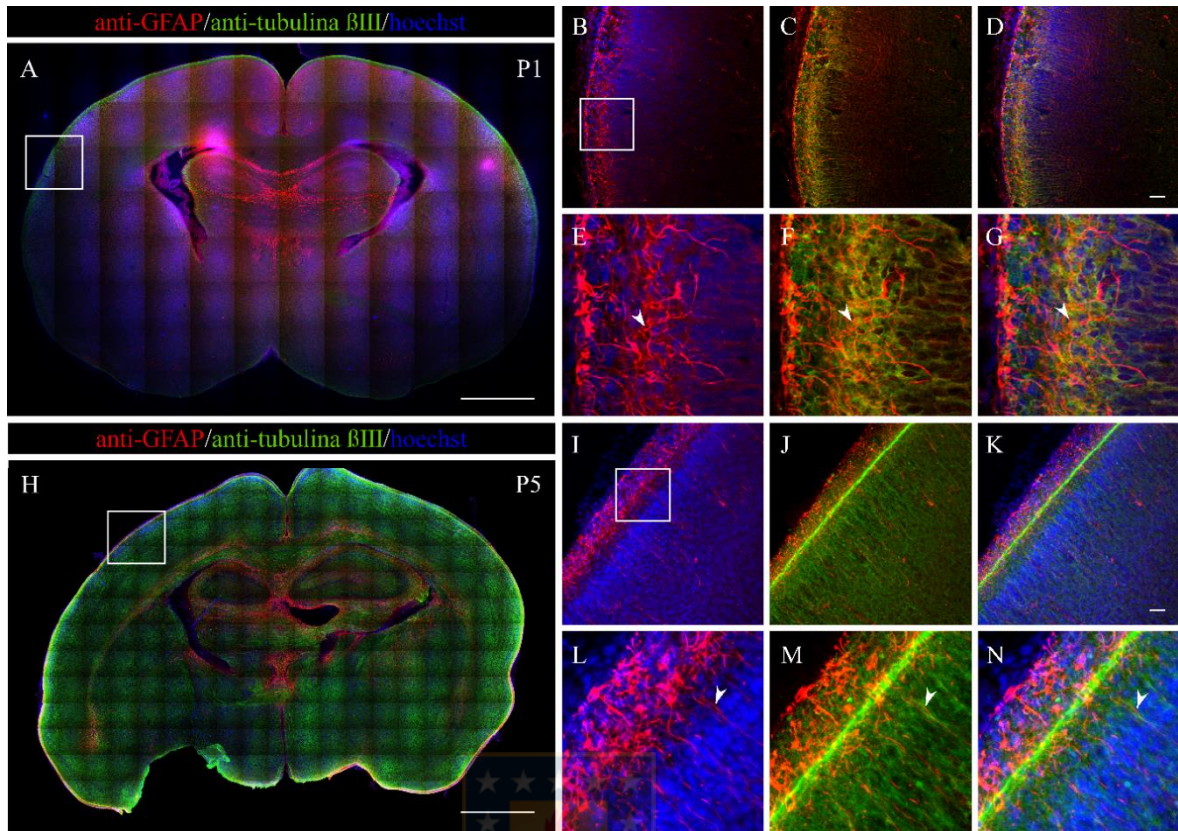


Figura 20. Análisis inmunocitoquímico de la población neuronal y astrocítica en corteza cerebral postnatal.

Inmunocitoquímica anti-tubulina β III (verde) y anti-GFAP (rojo) en corte grueso de cerebro de rata de 1 día (A-G) y 5 días postnatal (H-N). Hoechst fue utilizado como marcador nuclear (azul). (A,H) Imagen obtenida con *Tile-scan* para observar toda la extensión de la muestra. B-D, I-K. Imagen obtenida en aumento mayor del recuadro señalado en A y H, respectivamente, donde se observa la población astrocítica (rojo) y neuronal (verde). E-G, L-N. Aumento digital del recuadro en B e I, se observa en detalle la morfología astrocítica, contactando a las neuronas de la capa más superficial (cabeza de flecha). Barras de tamaño: 1 mm (A,H), 50 μ m (D,K).

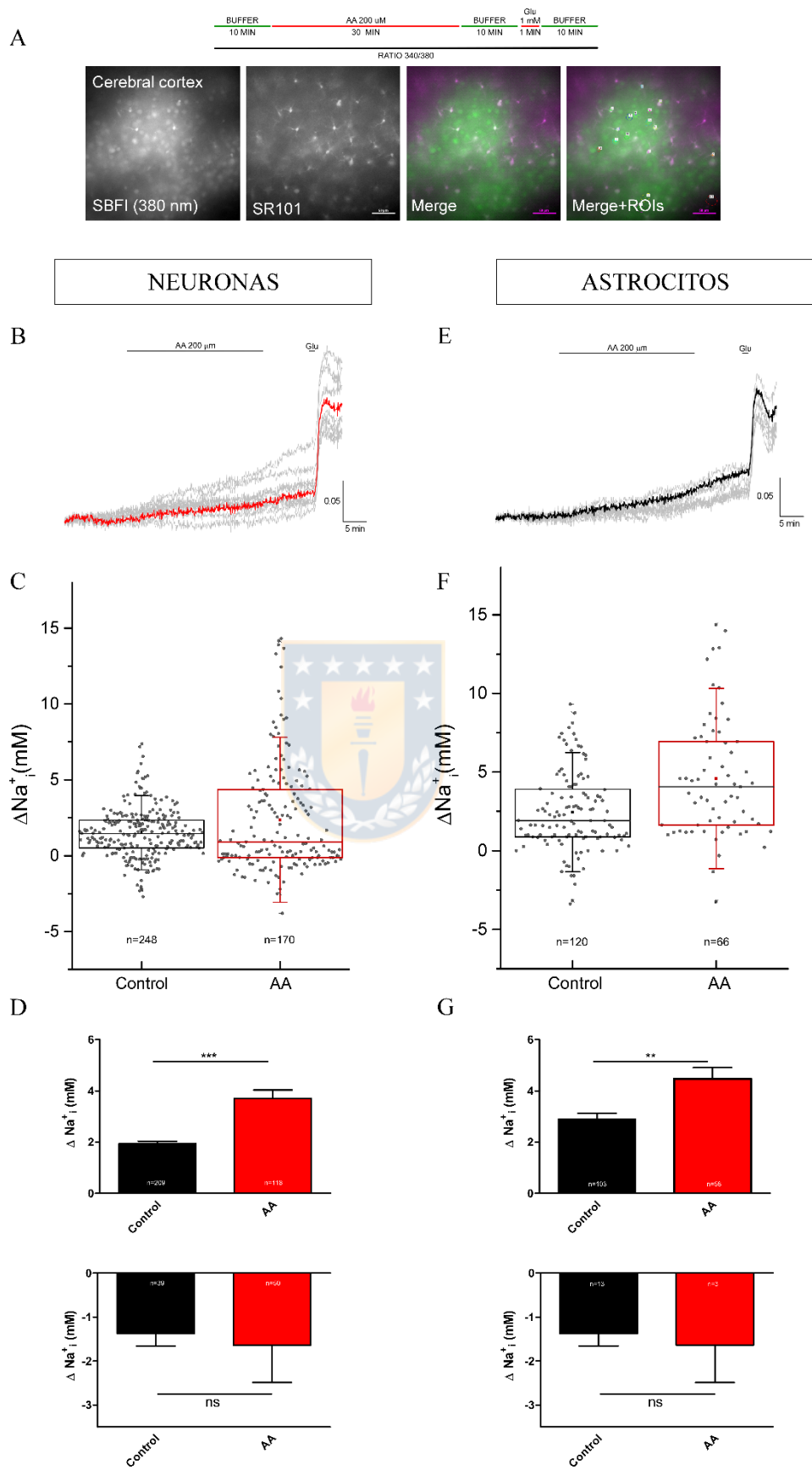




Figura 21. Ácido ascórbico incrementa los niveles de sodio intracelular en neuronas y astrocitos corticales.

Se obtuvieron *slices* agudos de ratón P14-P21, los cuales fueron cargados con la sonda SBFI para medir los niveles intracelulares de sodio, durante la exposición a 200 μ M AA por 30 minutos. Una concentración de 1 mM glutamato fue utilizado durante 10 segundos, como control positivo (**A**). SR101 fue utilizado para teñir los astrocitos. Diagramas representativos de los niveles de sodio a nivel neuronal (**B**) y astrocítico (**E**), durante el tiempo de análisis. Las señales en rojo y negro, representan el promedio de las respuestas, respectivamente. Diferencias en concentración de sodio intracelular entre t0 y t30 min, durante el tratamiento con AA o condición control en neuronas (**C**) y astrocitos (**F**). Se observan dos tipos de respuesta, células que presentan un aumento en la concentración y células que muestran una disminución en la concentración de sodio intracelular. **D**. Representación del grupo neuronal que incrementa (superior) o disminuye (inferior) la concentración de sodio, luego del tratamiento con AA. **G**. Comparación de la respuesta de incremento (superior) o disminución (inferior), de la concentración de sodio en astrocitos corticales. Análisis estadístico t-student (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001). Barras muestran promedio \pm SEM, N=6.

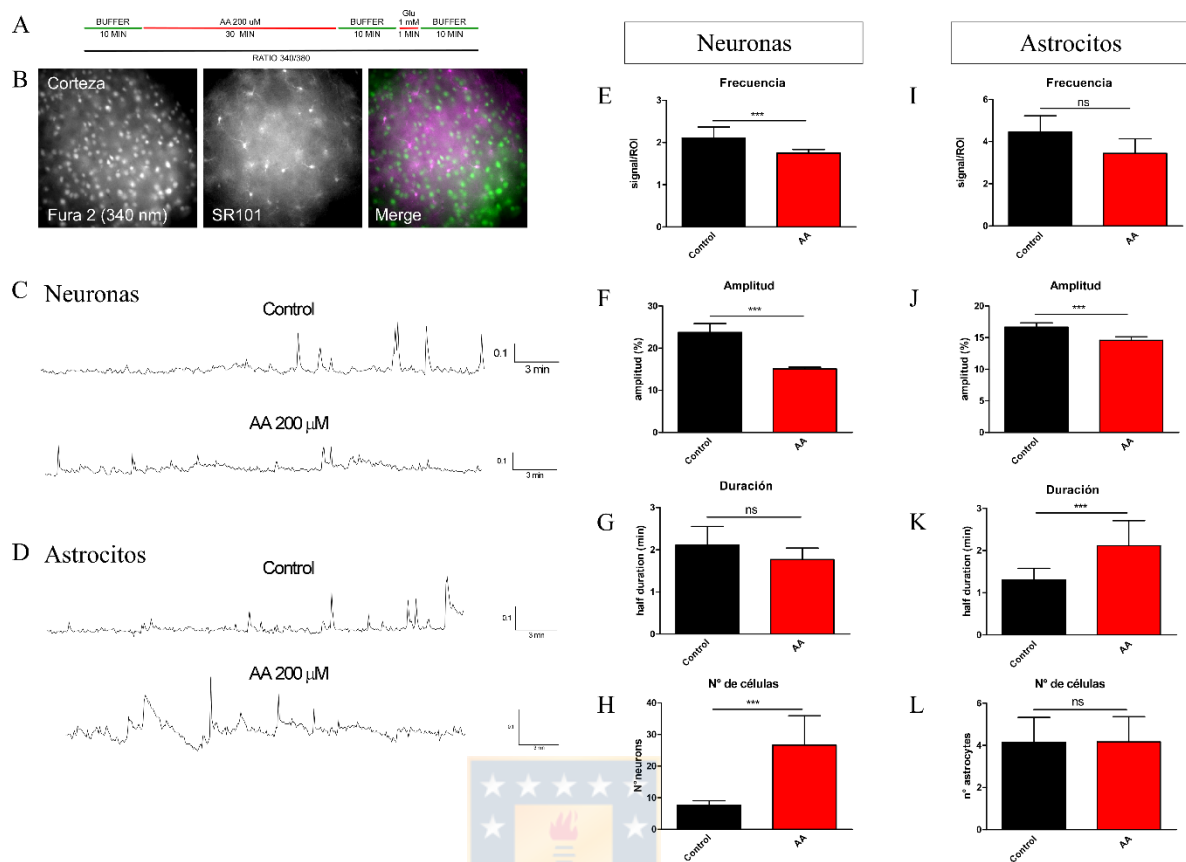


Figura 22. Caracterización de señales de calcio en neuronas y astrocitos corticales expuestos a AA.

A. Protocolo realizado para el análisis de señales de calcio en *slices* agudos corticales de ratón P14-P21, los cuales fueron expuestos durante 30 min al estímulo de AA 200 μ M. **B.** Imágenes representativas de una *slice* marcada con la sonda Fura-2 AM, para el análisis de calcio intracelular, y SR101 para el marcaje de astrocitos. **C.** Señal representativa de una neurona cortical control o expuesta a AA durante 30 minutos de análisis. **D.** Señales de calcio representativas en un astrocito de una *slice* control o una *slice* tratada con AA. Comparación de señales de calcio obtenidas en neuronas o astrocitos durante los 30 minutos de análisis, en presencia (AA) o ausencia (control) de 200 μ M AA. **E,I.** Frecuencia, según el número de señales por cada célula analizada. **F, J.** Amplitud de la señal. **G, K.** Tiempo de señal, según la mitad de duración de cada señal analizada. **H, L.** Número de neuronas o astrocitos que presentan señales de calcio, respectivamente. Fueron consideradas señales que tuvieran una intensidad 3 veces mayor al ruido de cada análisis. Análisis estadístico t-student (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001). Barras muestran promedios \pm SEM, N=6.

6.11 Inhibición del transporte del DHA a través de GLUT1 induce daño neuronal en corteza de ratas postnatales.

Con el fin de estudiar *in vivo* el rol del reciclamiento de vitamina C en la morfología neuronal, realizamos inyecciones únicas del inhibidor WZB117 en la corteza cerebral externa. Éstos experimentos fueron realizados en ratas de 5 días postnatal (P5), por lo tanto, primero realizamos una caracterización de la expresión de GLUT1 en la corteza cerebral. Mediante inmunofluorescencia se observaron estructuras tubulares fuertemente positivas a GLUT1, que corresponden a los vasos sanguíneos, acompañado de una marca más difusa en el resto del parénquima cerebral (Figura 23 A, D cabezas de flechas). La inmunorreacción contra vimentina, fue utilizada para la identificación de las células astrocíticas, las cuales presentan numerosos procesos, formando un complejo entramado dentro de la corteza cerebral (Figura 23 B, F, cabezas de flechas). La marca de GLUT1 co-localiza con vimentina, confirmando que los astrocitos postnatales presentes en la corteza cerebral efectivamente expresan GLUT1 (Figura 23 C, G cabezas de flechas).

Se ha propuesto que WZB117 es un inhibidor específico de GLUT1, de esta forma al ser inyectado en la corteza cerebral debería afectar directamente la entrada de glucosa y DHA en astrocitos. Sin embargo, Ojelabi y cols. (2016), sugieren que WZB117 podría unirse también a GLUT3, transportador de glucosa expresado a nivel neuronal.

Considerando esta información, analizamos el efecto que tiene el tratamiento con WZB117 en neuronas mantenidas *in vitro* en diferentes condiciones. En una primera fase, se evaluó la viabilidad celular en ausencia de glucosa por 24 h, coincubando con o sin lactato, el cual puede ser utilizado como fuente energética en ausencia de glucosa (muy abundante en corteza cerebral de 5 días post-natal). Se observó en neuronas corticales una disminución del 41,46% en ausencia de glucosa la cual no fue recuperada por la suplementación con lactato (Figura 24 A). Si las neuronas y astrocitos corticales

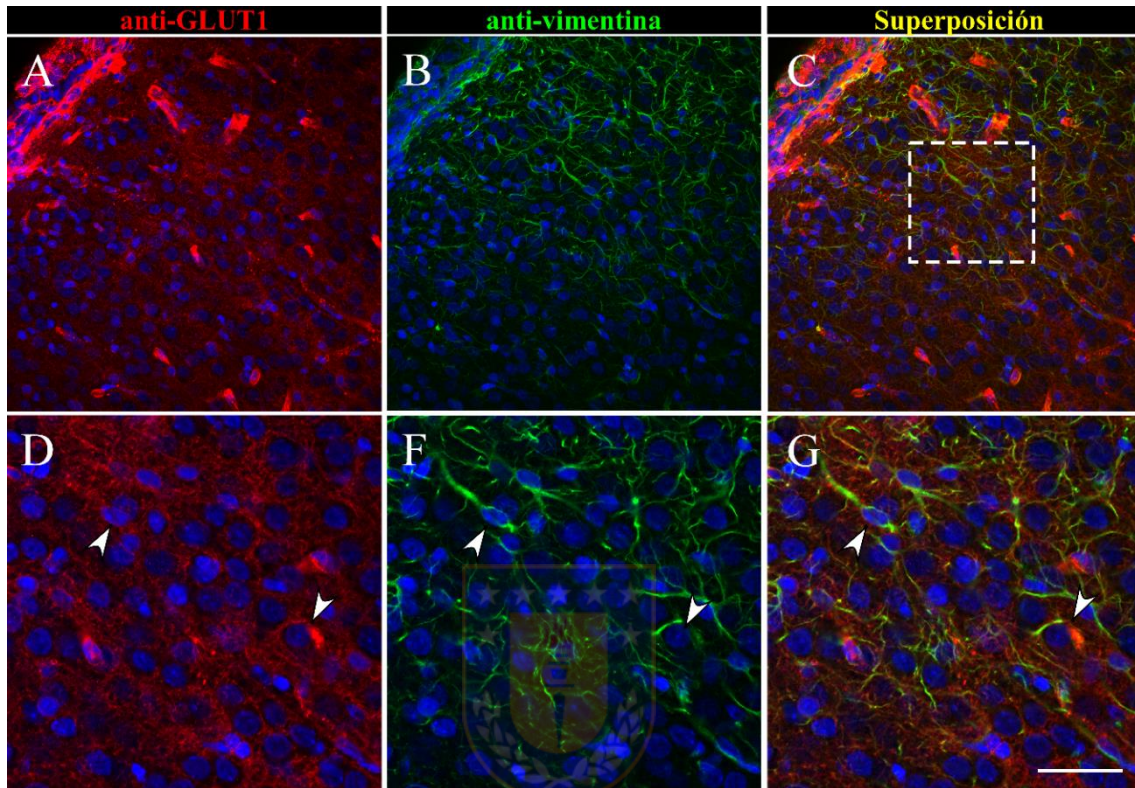


Figura 23. Expresión de GLUT1 en astrocitos corticales de rata postnatal.

A-C. Caracterización inmunohistoquímica en corte grueso de cerebro P5 de rata utilizando anti-GLUT1 (A, rojo) y anti-vimentina (B, verde), analizados mediante *Z-stack* por microscopía confocal. **D-F.** Imagen en mayor aumento adquirida en un plano focal de la zona marcada en C, donde se observan células que expresan GLUT1 (D, cabezas de flechas) y que presentan la marca para vimentina (F, cabezas de flechas). La superposición de los canales se observa en C y G. Hoechst fue utilizado para marcar núcleos. Barra de tamaño, 50 μm .

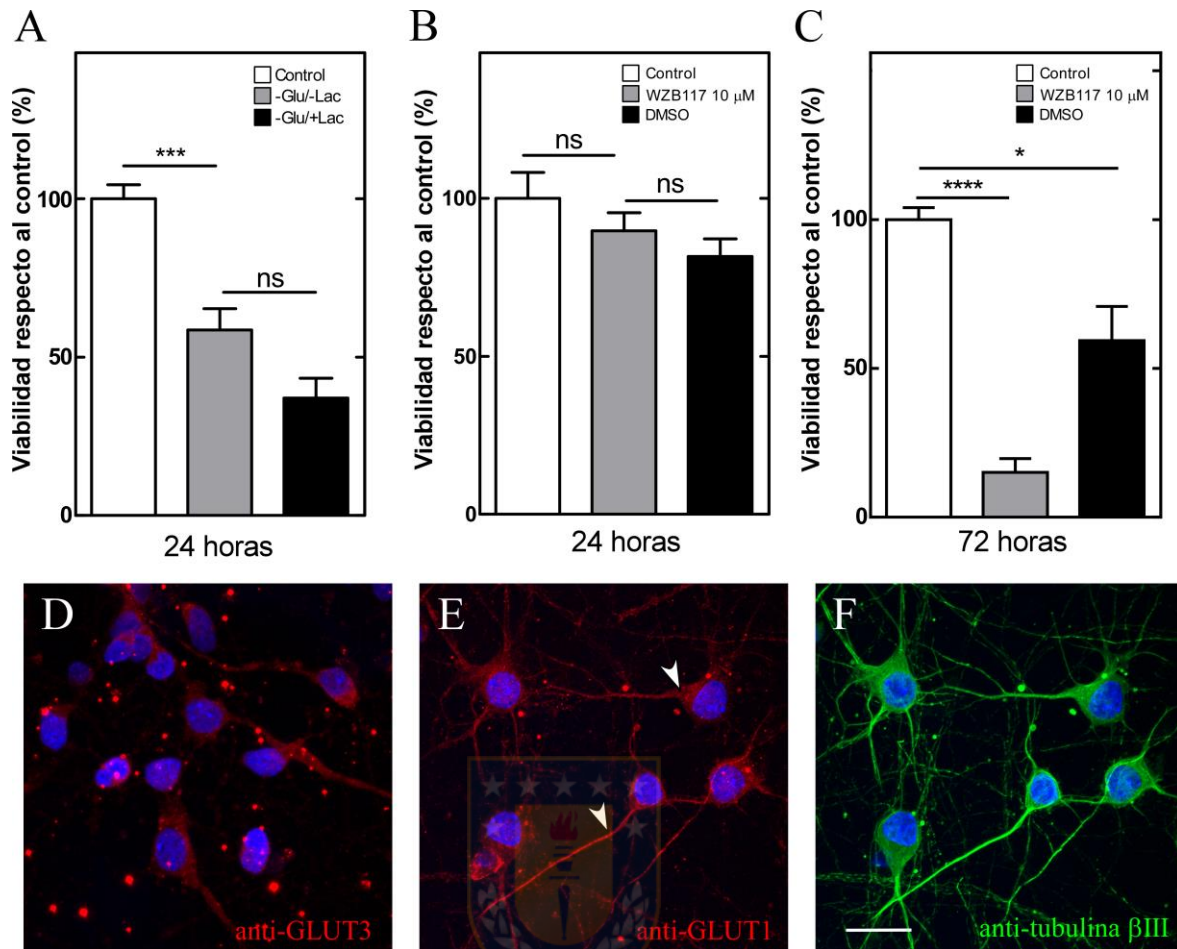


Figura 24. Efecto de la ausencia de glucosa y presencia de WZB117 en viabilidad neuronal.

A. Análisis de la viabilidad utilizando el método de XTT en neuronas corticales de 7 DIV realizados en presencia de glucosa 25 mM (control), en ausencia de glucosa y lactato (-Glu/-Lac) o en ausencia de glucosa y presencia de lactato 5 mM (-Glu/+Lac), durante 24 h. **B-C.** Análisis de viabilidad realizado en neuronas corticales, expuestas al inhibidor WZB117 (10 μ M) o su vehículo (DMSO), durante 24 (B) o 72 h (C). **D-F.** Inmunocitoquímica realizada en neuronas corticales de 7 DIV, utilizando los anticuerpos anti-GLUT3 (D), anti-GLUT1 (E) o anti-tubulina β III (F), donde se observa una importante inmunoreacción contra GLUT1 a nivel del soma y procesos neuronales (F, cabezas de flecha). Hoechst fue utilizado como marcador nuclear. Análisis estadístico ANOVA, seguido de test Tukey. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Gráficos representan promedio \pm SEM, N=3.

dependieran totalmente de la captación de glucosa como fuente única de energía, la presencia de WZB117 afectaría su viabilidad por medio de la privación sostenida en la captación de glucosa. Sin embargo, se ha comprobado que durante las primeras semanas postnatales el cerebro es nutrido principalmente por cuerpos cetónicos, obtenidos desde la leche materna (Nehlig, 2004), por lo tanto, tanto astrocitos como neuronas no dependerían de la captación de glucosa para la mantención de su metabolismo. Posteriormente, evaluamos la viabilidad neuronal en presencia de WZB117 10 μ M (concentración que será utilizada en las inyecciones *in vivo*), sin observarse una disminución significativa en la viabilidad celular durante 24 h (Figura 24 B), sin embargo, al mantener el inhibidor durante 72 h, si se detectó una disminución del $84,91 \pm 4,6\%$ en la viabilidad celular (Figura 24 C). Este resultado podría sugerir que WZB117 se uniría también a GLUT3 y podría inducir la muerte neuronal por falta del transporte de glucosa, sin embargo, al evaluar mediante inmunocitoquímica la expresión de los transportadores de glucosa, detectamos que *in vitro* las neuronas de 7 DIV no sólo expresan GLUT3 (Figura 24 D), sino que inducen una importante expresión de GLUT1, tanto a nivel del soma, como también en sus procesos neuronales (Figura 24 E, cabezas de flechas). Por lo tanto, la disminución observada a las 72 h, en presencia de WBZ117, se podría adjudicar a la inducción en la expresión de GLUT1 por parte de las neuronas corticales *in vitro*, las cuales sólo deberían expresar GLUT3, impidiendo una correcta interpretación de nuestros resultados y siendo imposible determinar si efectivamente, WB117 es capaz de unirse a GLUT3 a nivel neuronal.

Una vez que comprobamos que GLUT1 se expresa en los astrocitos jóvenes presentes en la corteza, y considerando que WZB117 puede ser un inhibidor específico para GLUT1, realizamos inyecciones únicas en la corteza cerebral externa con un lentivirus que expresa la proteína EGFP, el cual utilizamos como “guía” de la inyección, mezclado con WZB117 10 μ M. Adicionalmente, se realizó una inyección aguda de lentivirus EGFP y DHA 100 μ M, para analizar el efecto local de la forma oxidada de la vitamina C en la

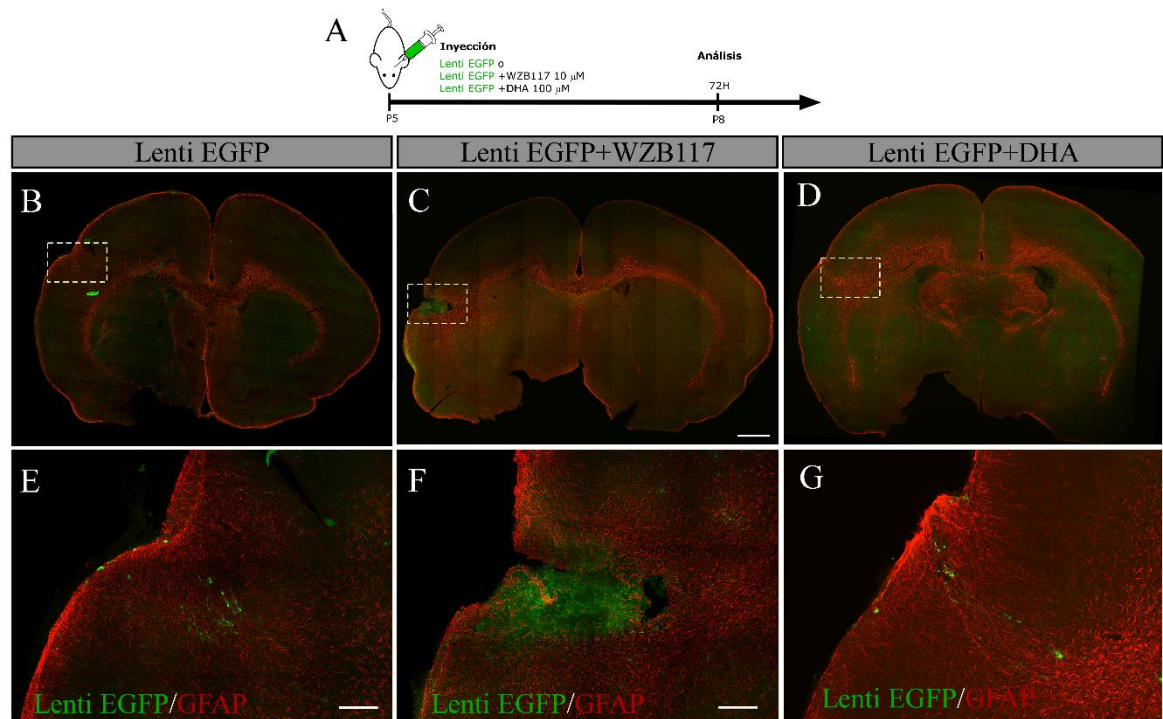


Figura 25. Efecto morfológico de inyección intracortical de WZB117 y DHA en rata postnatal.

A. Diseño experimental para la inyección intracortical aguda del inhibidor de GLUT1, WZB117 (10 μ M), mezclado con lentivirus EGFP o lentivirus EGFP, en ratas postnatales de 5 días (P5). El lentivirus EGFP fue utilizado para el seguimiento de la inyección. **B-G.** Inmunohistoquímica utilizando anti-GFAP (rojo), en cortes gruesos de cerebro de ratas P8, luego de 72 horas post-inyección con lentivirus EGFP (**B-E**), mezcla del inhibidor de GLUT1, WZB117 con lentivirus EGFP (**C-F**) o mezcla de DHA 100 μ M con lentivirus EGFP (**D-G**). **B-D.** Análisis confocal utilizando Tile-scan. **D-G.** Análisis en mayor aumento de las zonas destacadas en B-D (línea punteada). Barra de tamaño, 50 μ m.

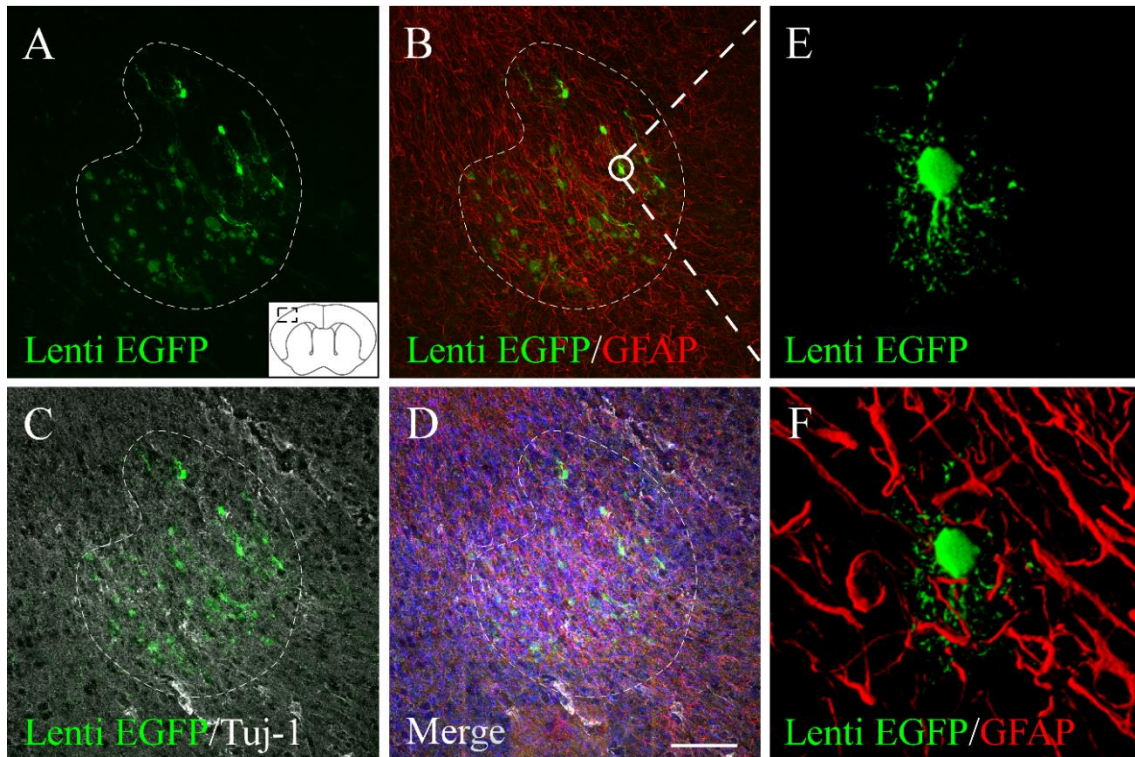


Figura 26. Inyección de lentivirus control induce expresión de EGFP a nivel neuronal.

Caracterización inmunohistoquímica en la zona inyectada con el lentivirus control EGFP, en cerebro de rata P8, luego de 72 horas post-inyección. **A.** Expresión de EGFP (verde) en la zona inyectada. **B.** Superposición de EGFP con la inmunoreacción contra GFAP. **C.** Colocalización de la reacción positiva para tubulina β III y EGFP (verde). **D.** Superposición de todos los canales de flujorescencia, con marcador nuclear Hoechst. **E-F.** Reconstrucción 3D de neurona positiva para EGFP (**E**). Análisis de la ausencia de codistribución con la marca para GFAP (**F**). Barra de tamaño, 50 μ m.

morfología neuronal *in vivo*. Las inyecciones se realizaron en ratas de 5 días postnatal, las cuales se mantuvieron por 72 h post-inyección junto a la madre.

Los análisis de microscopía confocal mostraron que la inyección única del lentivirus EGFP, induce la expresión de esta proteína en una reducida población celular al interior de la corteza cerebral, sin detectarse cambios en la citoarquitectura cortical (Figura 25 B, E). Por el contrario, la inyección de la mezcla lentivirus EGFP+WZB117 se observa una importante lesión cortical, que concentra la marca lentiviral al interior de la zona inyectada (Figura 25 C,F). Al inyectar lentivirus+DHA no se detectan cambios importantes respecto a la citoarquitectura general de la corteza cerebral (Figura 25 D, G). Análisis inmunohistoquímicos en el cerebro control, inyectado sólo con lentivirus, mostraron que la expresión de la proteína EGFP se localiza a nivel nuclear y citoplasmático, en células que presentan largos procesos celulares (Figura 26 A), pero que no expresan el marcador glial GFAP (Figura 26 B), lo que se corrobora en la reconstrucción 3D (Figura 26 E-F). Además, se detectó colocalización de EGFP y tubulina β III, marca neuronal distribuída por el citoesqueleto que genera una densa trama cortical (Figura 26 C-D) confirmado que este lentivirus tiene tropismo neuronal. Por otra parte, el análisis de la zona inyectada con la mezcla lentivirus EGFP+WZB117, muestra una importante zona central, donde se concentra la marca lentiviral, la cual se detecta en agregados al interior de la zona de lesión y a nivel citoplasmático (Figura 27 A). La inmurreacción contra GFAP, denota una importante presencia de astrocitos reactivos que rodean la zona inyectada (Figura 27 B-C). La marca contra tubulina β III se detecta irregular (inyección lentiviral EGFP), predominando en pequeños agregados, que se distribuyen mayoritariamente al interior de la zona inyectada (Figura 27 D). Posterior a la caracterización de esta lesión cortical mediante inmunofluorescencia en corte grueso, realizamos análisis de inmunohistoquímica en cortes de 7 μ m. Utilizando la tinción de hematoxilina-eosina se observa que la lesión comienza en un corte frontal rostral como una disminución en la intensidad de la tinción en la zona inyectada (Figura 28 A), sin embargo, al analizar un corte más caudal se detecta no sólo una disminución

en la presencia celular, sino que además, la lesión se abre hacia la zona más interna de la corteza cerebral generando una especie de cavidad (Figura 28 B). Por lo tanto, la lesión abarca el espesor completo de la corteza cerebral. Al observar con mayor aumento la corteza cerebral en una zona normal (Figura 28 c), destaca una población homogénea de neuronas piramidales (Figura 28 C, cabezas de flechas). Al observar la zona inyectada, se detectan núcleos picnóticos y una alteración en el neurópilo (Figura 28 D, cabezas de flechas). El análisis con anti-GFAP (inmunoperoxidasa en campo claro), mostró células fuertemente reactivas, tanto al interior como al borde de la lesión (Figura 28 F,f cabezas de flechas), en comparación al lóbulo control, donde se detecta una marca uniforme en todo el parénquima (Figura 28 E,e). Al utilizar un anticuerpo para tubulina β III, se detectó una reacción homogénea en el lóbulo control, donde se puede observar el complejo entramado de los procesos neuronales (Figura 28 G,g), en contraste, en el centro de la zona inyectada, la marca se vuelve más difusa, denotando la presencia de neuronas que poseen menor cantidad de procesos (Figura 28 H,h cabezas de flechas), aspecto no observado en regiones vecinas a la lesión (Figura 28 h, flechas).

6.12 Cambios en la morfología neuronal inducidos por la inhibición del reciclamiento de vitamina C en la corteza cerebral postnatal.

Luego de caracterizar la presencia de una importante lesión cortical, al realizar la inyección del lentivirus EGFP+WZB117, buscamos una herramienta experimental que nos permitiera evaluar si existían cambios en la morfología neuronal a nivel de espinas dendríticas. Para esto, se estandarizó la impregnación de Golgi-Cox con la modificación de *Ultra-Rapid Golgi Stain* (URG), publicada recientemente por Kassem y cols. (Kassem et al., 2018) . Esta impregnación, utilizada por primera vez por Camilo Golgi en 1873,

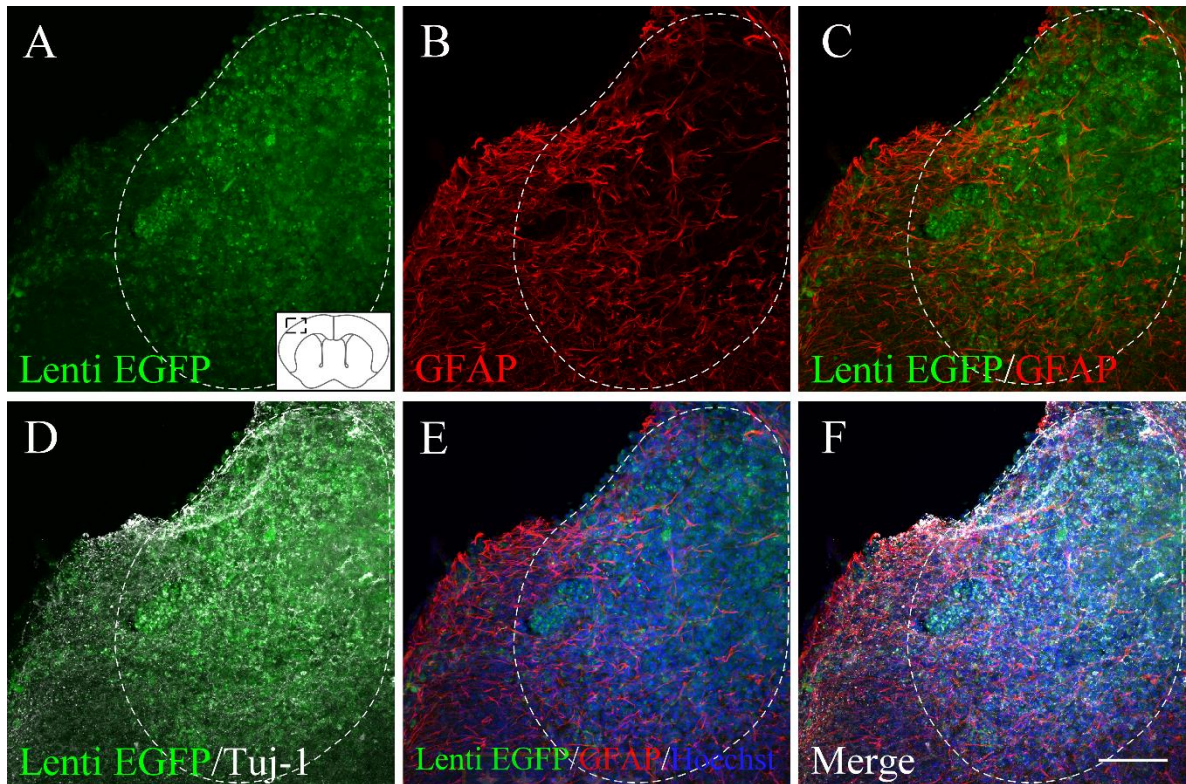


Figura 27. Caracterización inmunocitoquímica de la lesión cortical inducida por WZB117.

Análisis de corteza cerebral de rata (corte grueso) inyectada con una mezcla inhibidor WZB117/lentivirus EGFP luego de 72 h post-inyección. **A.** Marca de la expresión de EGFP (verde), en la zona de lesión. **B.** Inmunotinción de GFAP (rojo) y superposición con la marca lentiviral (**C**). **D.** Colocalización de la inmunotinción neuronal anti-tubulina β III (blanco) y expresión de EGFP. **E.** Inmunoreacción contra GFAP (rojo) en la zona positiva para la expresión de EGFP (verde) y marca nuclear (azul). **G.** Superposición de todos los canales. Hoechst fue utilizado como marcador nuclear. Barra de tamaño, 50 μ m.



Figura 28. Análisis morfológico de diferentes zonas, en la lesión cortical inducida por WZB117.

A-D. Tinción de hematoxilina-eosina en cortes obtenidos desde una zona rostral (**A**) y caudal (**B**) de la lesión cortical inducida por la inyección del lentivirus EGFP+WZB117. C-D. Imagen en mayor aumento de la zona marcada en c y d, respectivamente. Inmunohistoquímica asociada a GFAP (E-F) y tubulina β III (G-H), en zona caudal de la corteza cerebral, comparando el hemisferio control (E, G) y el inyectado con WZB117 (F, H). Análisis usando aumento mayor muestra células altamente reactivas para GFAP (f, cabeza de flechas) y para tubulina (h, cabeza de flechas). CC: corteza cerebral. VL: ventrículo lateral. Barra de tamaño: 10 μ m.

sigue siendo hasta la fecha, la técnica más adecuada para poder estudiar morfología neuronal. Para realizar esta técnica se utilizaron cortes de 100-150 μm obtenidos desde la corteza cerebral de ratas P8 control o luego de 72 h post-inyecctadas con el lentivirus EGFP+WZB117. En la figura 29 A es posible observar la impregnación de Golgi-Cox en toda la corteza cerebral, en un lóbulo control (microscopía de campo claro). Debido a que la precipitación oscura está compuesta por sulfuro mercúrico, la presencia de este metal pesado permite su observación mediante microscopía confocal, utilizando la función de reflexión y reconstrucción en 3D, como se muestran en la figura 29 B. Interesantemente, a pesar del procedimiento realizado durante la URG, la marca para EGFP se mantuvo y logró ser detectada en el lóbulo inyectado (Figura 29 D,F), esto permite observar nuevamente que existe una disminución en la marca neuronal al interior de la zona inyectada (Figura 29 D), en comparación al lóbulo control (Figura 29 C). Adicionalmente, al utilizar un aumento mayor y realizar análisis en diferentes planos, es posible reconstruir las neuronas que se encuentran impregnadas, tanto en la zona adyacente a la inyección (Figura 29 F), como en la zona control (figura 29 E). Se observa en la reconstrucción 3D, que las neuronas del lóbulo control presentan largos procesos (Figura 29 e, cabeza de flecha), en contraste con una neurona cercana a la zona inyectada, donde se detectan prolongaciones más pequeñas (Figura 29 f, cabeza de flecha). Luego de esta caracterización, utilizando microscopía confocal, se realizaron análisis utilizando campo claro para poder cuantificar las diferencias morfológicas que podrían existir en la población neuronal. En una primera aproximación, se cuantificó la cantidad de neuronas impregnadas, que se detectan en la zona externa de la corteza cerebral (lóbulo inyectado vs control) (Figura 30 A-B). La cuantificación muestra que existe un menor número de neuronas en la zona inyectada con la mezcla lentivirus EGFP+WB117, comparado con el lóbulo control (Figura 30 B').

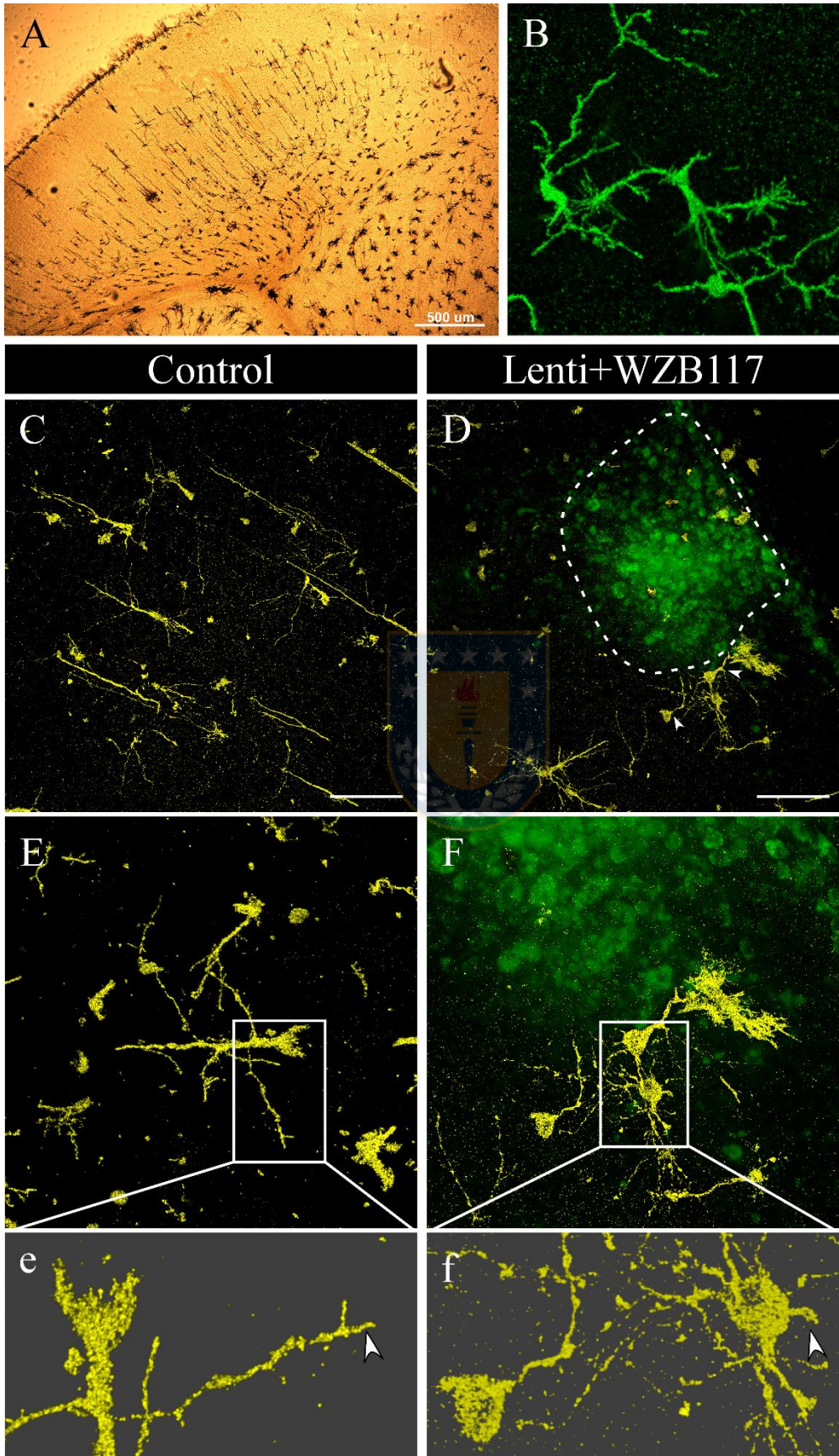


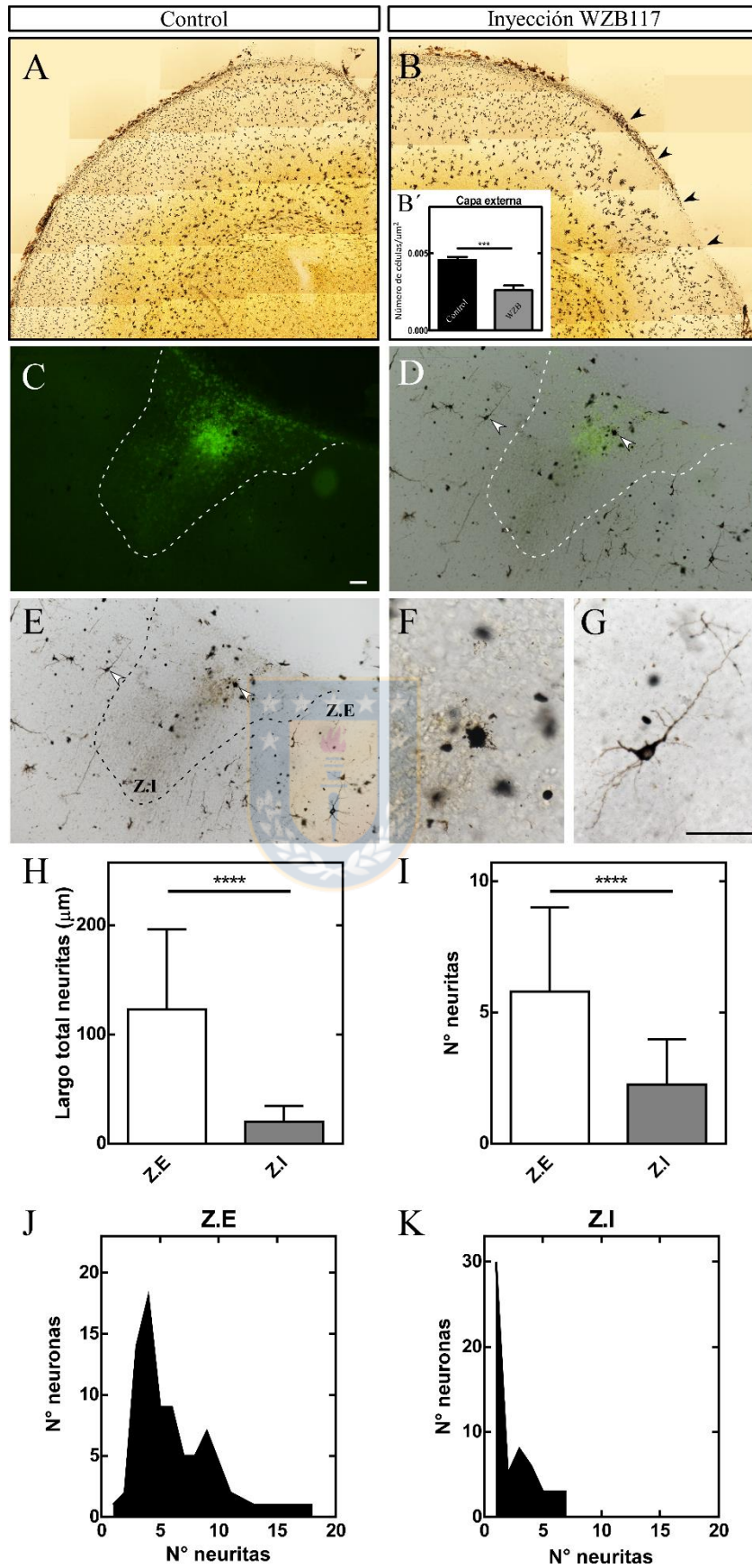


Figura 29. Análisis mediante microscopía confocal de impregnación Golgi-Cox en la corteza cerebral de rata postnatal, inyectada con lentivirus+WZB117.

A. Análisis en campo claro de la corteza cerebral externa de la rata P8 posterior a la impregnación URG. **B.** Análisis en Z-stack y posterior reconstrucción en 3D, utilizando la técnica de reflexión-microscopía confocal, para la detección de la impregnación en neuronas corticales. **C,E.** Análisis mediante microscopía confocal utilizando aumento menor (C) y un aumento mayor (E), en el lóbulo control del cerebro de rata P8. **D, F.** Imágenes obtenidas mediante Z-stack de la zona de inyección, combinando reflexión y emisión fluorescente del lentivirus EGFP (D). **F.** Imagen obtenida a mayor aumento para observar el detalle morfológico de las neuronas que rodean la zona de inyección. **e,f.** Aumento digital y reconstrucción 3D de las zonas señaladas en E y F, respectivamente. Barras de tamaño, 50 μm .

Posteriormente, se utilizó el microscopio de epifluorescencia para detectar la zona inyectada EGFP positiva (Figura 30 C) y realizar la superposición con la imagen en campo claro del corte impregnado con URG (Figura 30 D). Utilizando esta superposición se delimitó la zona inyectada (Z.I) y la zona externa a la inyección (Z.E) (Figura 30 E), en las cuales se tomaron imágenes en aumento mayor con el fin de analizar la morfología neuronal. De esta manera se observa que las neuronas en la Z.I poseen notoriamente menor presencia de procesos neuríticos, comparado con las neuronas que se encuentran en la Z.E (Figura 30 F-G). Utilizando el plugin NeuroJ (software ImageJ (W. Rasban, NIH) se cuantificó la presencia y el largo total de neuritas en las neuronas presentes en la Z.E y en la Z.I, nuestros análisis demuestran que las neuronas de la Z.I presentan un largo menor de neuritas ($20,14 \pm 2,4 \mu\text{m}$) comparado con las neuronas de la Z.E ($122,6 + 9,7 \mu\text{m}$) (Figura 30 H), debido a que presentan una menor cantidad de neuritas totales (Figura 30 I). Lo anterior se observa de mejor manera en los gráficos J y K, de la figura 30, donde se muestra que en la Z.E las neuronas poseen entre 2 a 18 neuritas, sin embargo, la población de la Z.I sólo poseen entre 2 a 7 neuritas por neurona.

La utilización de la impregnación URG, nos ha permitido demostrar *in vivo*, que la presencia de un inhibidor del transporte de DHA (a través de GLUT1) a nivel astrocítico, induce la generación de una lesión cortical que afecta principalmente la morfología neuronal, observándose neuronas con menor presencia y longitud de procesos neuríticos, en la zona inyectada.



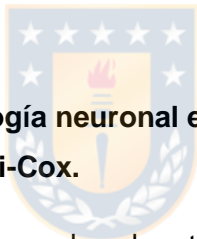


Figura 30. Análisis de la morfología neuronal en la zona de inhibición con WZB117, mediante impregnación de Golgi-Cox.

Reconstrucción en *Tile-scan* de un cerebro de rata P8, inyectado con WZB117 luego de 72 h de tratamiento, e impregnado con Golgi-Cox para marcaje neuronal. **A.** Reconstrucción del lóbulo control (sin inyección). **B.** Zona inyectada, donde se observa la disminución de la impregnación neuronal (cabezas de flechas) **B'**. Cuantificación de la marca Golgi-Cox en el lóbulo control y lóbulo inyectado, en la zona externa de la corteza cerebral. **C.** Imagen obtenida por microscopía de epifluorescencia en lóbulo inyectado con lentivirus EGFP+WZB117. **D.** Superposición de la imagen en fluorescencia y en campo claro, de la zona de inyección. **E.** Imagen en campo claro, que muestra la impregnación URG en neuronas dentro de la zona de inyección (Z.I) y la zona externa a la inyección (Z.E). **F-G.** Imagen en aumento mayor de neuronas señaladas en E, correspondientes a la Z.I y Z.E, respectivamente. **H.** Cuantificación de la suma total del largo de neuritas cuantificadas en neuronas de la Z.E y Z.I. **I.** Comparación del número de neuritas cuantificadas por neurona, entre la Z.E y la Z.I. **J-K.** Gráfico de frecuencia del número de neuritas en la Z.E y Z.I, respectivamente. Análisis estadístico t-student (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001; ****p <0.0001). Gráfico muestra promedio \pm SEM. 30-40 neuronas cuantificadas por zona. Barra de tamaño: 10 μ m.

Finalmente, nos preguntamos si al inyectar a la corteza una dosis de la forma oxidada de vitamina C, DHA, se podrían inducir cambios similares a los observados con el inhibidor de GLUT1. Para ello, siguiendo el mismo protocolo previamente descrito, se realizó una inyección única de DHA 100 μ M y lentivirus EGFP, en la corteza cerebral de rata P5 y se obtuvieron los cerebros luego de 72 h. El análisis inmunohistoquímico, en cortes grueso, nos mostró que la proteína EGFP se expresa en el soma y citoplasma de algunas neuronas en la zona inyectada (Figura 31 A), las cuales se rodean de astrocitos fuertemente positivos a GFAP (Figura 31 B). Respecto a la expresión del marcador tubulina β III, se detecta una marca característica en el parénquima, sin embargo, en la zona de inyección se observa una pequeña región en donde no existe marca para tubulina β III (Figura 31 D), además existe una menor presencia de astrocitos (Figura 31 E). Para corroborar esta observación, se utilizó la impregnación URG para la visualización de la morfología neuronal, sin embargo, en este caso al superponer las imágenes de epifluorescencia (Figura 32 A) y la imagen en campo claro (Figura 32 B), se detecta que tanto al interior (Z.I) como al exterior (Z.E) de la inyección, existe impregnación neuronal (Figura 32 C). Neuronas de la Z.I (Figura 32 C, cabeza de flecha), presentaron largas neuritas, muy diferente a las características morfológicas observadas previamente en las neuronas de la Z.I con WZB117 (Figura 32 D). Por lo tanto, la inyección aguda de 100 μ M DHA, en la corteza cerebral no induce cambios morfológicos neuronales, posiblemente, debido a la alta presencia de astrocitos que podrían reciclar de manera eficiente el DHA y prevenir daño neuronal.

Para concluir con este objetivo, estudiamos si efectivamente la lesión neuronal inducida por la inyección de WZB117 involucra un proceso de muerte celular. Se utilizó la incubación con 2,3,5-Cloruro de Trifeniltetrazolium o TTC. Este es un colorante

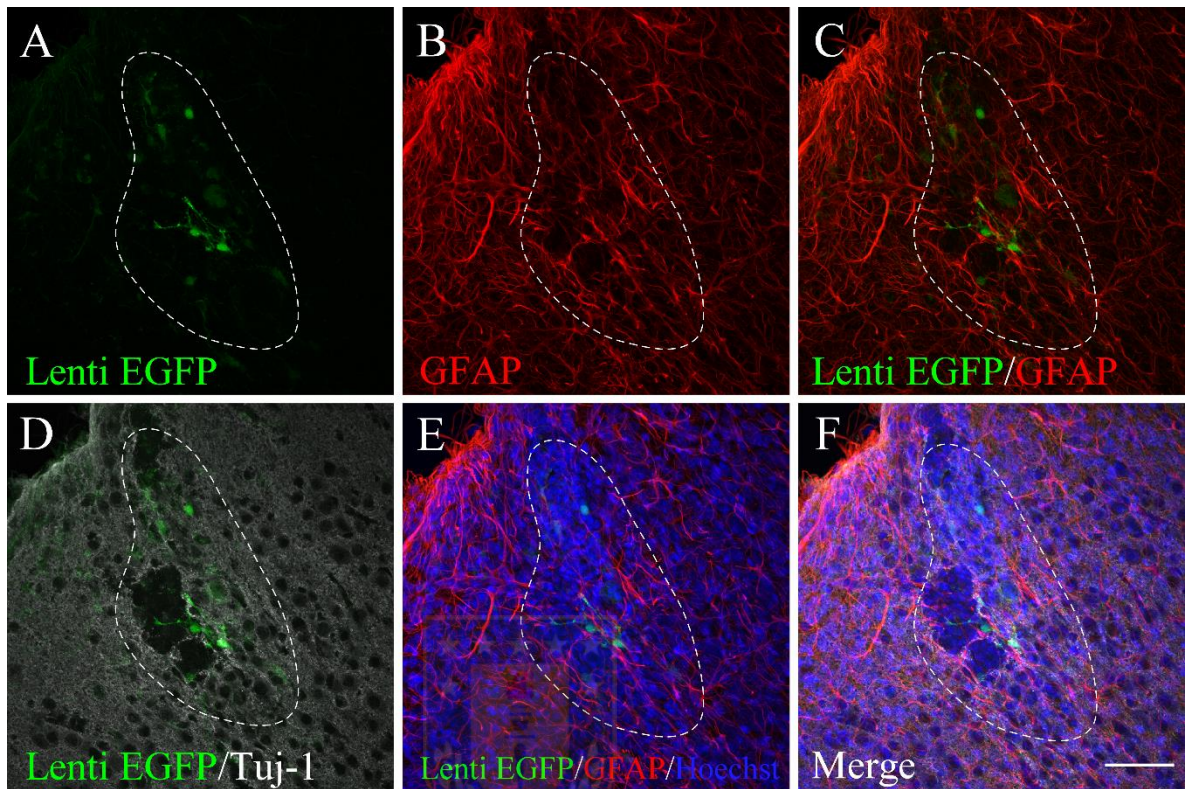


Figura 31. Caracterización inmunocitoquímica de una zona inyectada con lentivirus EGFP+DHA en corteza cerebral de rata postnatal.

Estudio inmunohistoquímico de la zona inyectada con la mezcla de lentivirus EGFP/DHA (línea punteada), donde se observa expresión de la proteína fluorescente verde (**A**). **B**. Inmunoreacción contra la marca glial GFAP y superposición con la zona EGFP positiva (**C**). **D**. Marca neuronal utilizando anti-tubulina β III (blanco) en la zona inyectada. **E**. Colocalización de la expresión de EGFP (verde) y la marca para células gliales (rojo) junto al marcador nuclear Hoechst. **F**. Superposición de los cuatro canales analizados. Barra de tamaño 50 μ m.

utilizado para detectar zonas de infarto, a nivel cerebral, luego de la inducción de isquemia y reperfusión. TTC corresponde a una sal incolora, que se reduce en presencia de deshidrogenasas, las cuales abundan en las mitocondrias, por lo tanto permite diferenciar entre tejidos metabólicamente activos y zonas de muerte (Benedek et al., 2006). Ratas P5 fueron inyectadas con lentivirus EGFP, lentivirus EGFP+WZB117 o lentivirus+DHA 100 μ M y mantenidas durante 72 h post-inyección. Una vez obtenidos los cerebros, éstos fueron cortados en rebanadas de 3 mm, las cuales fueron incubadas directamente con TTC. Se detectó que sólo en el lóbulo inyectado con lentivirus EGFP+WZB117, se observó una zona de muerte celular, donde no hay coloración roja (Figura 33 C-D). El cerebro control inyectado con el lentivirus EGFP (Figura 33 A-B) y el cerebro inyectado con la mezcla lentivirus-DHA, no presentaron una zona blanquecina (Figura 33 E-F).

De esta manera, podemos confirmar que la inyección con el inhibidor WZB117 induce una lesión cortical, la cual en su interior presenta neuronas que han visto afectada su morfología neuronal, con una menor cantidad de neuritas, pero que además, es una zona donde ha ocurrido muerte celular, lo cual podría ser una consecuencia de la inhibición del reciclamiento de DHA.

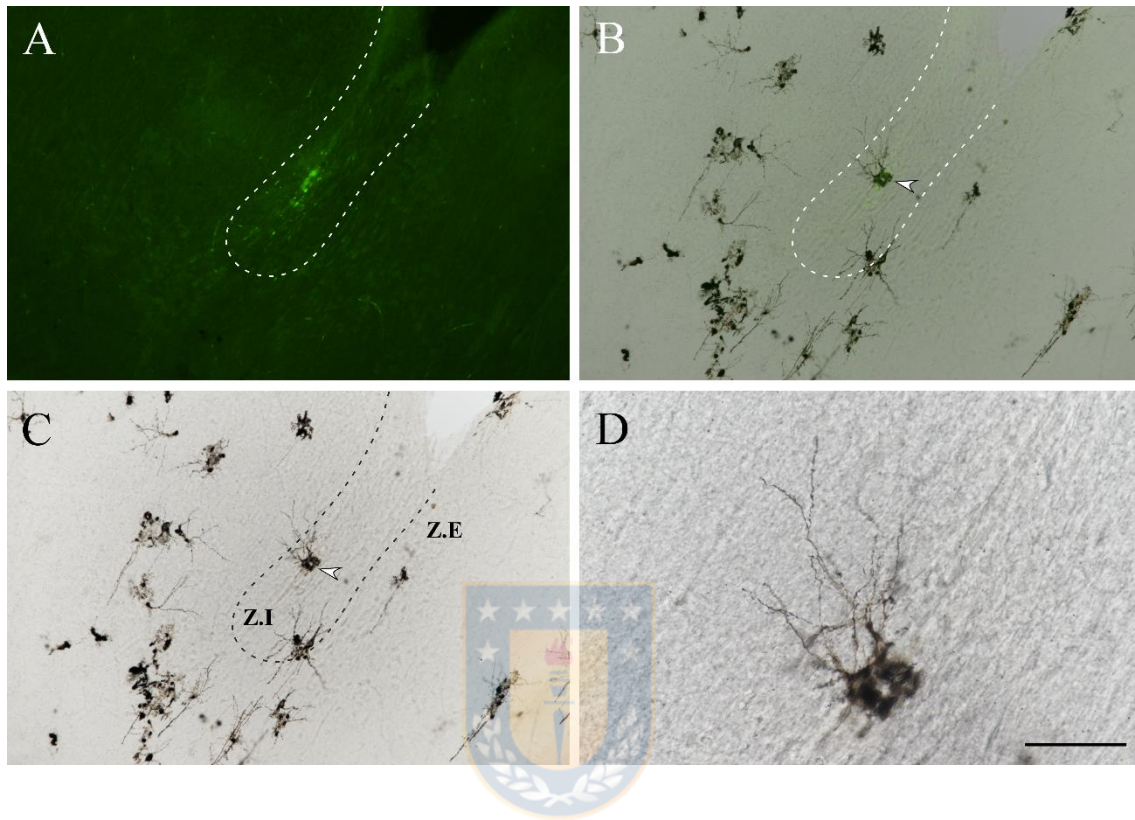


Figura 32. Inyección de lentivirus EGFP+DHA no induce cambios en la morfología neuronal cortical.

A. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia para detectar la zona de inyección (zona punteada, Z.I). **B.** Superposición de la imagen que muestra la expresión de EGFP y la imagen en campo claro, que muestra la impregnación neuronal. **C.** Imagen de la impregnación neuronal en el lóbulo inyectado que muestra la Z.I y la zona externa (Z.E). **D.** Neurona señalada en C que se encuentra en la Z.I y que no presenta menor cantidad de neuritas. Barra de tamaño: 10 μm .

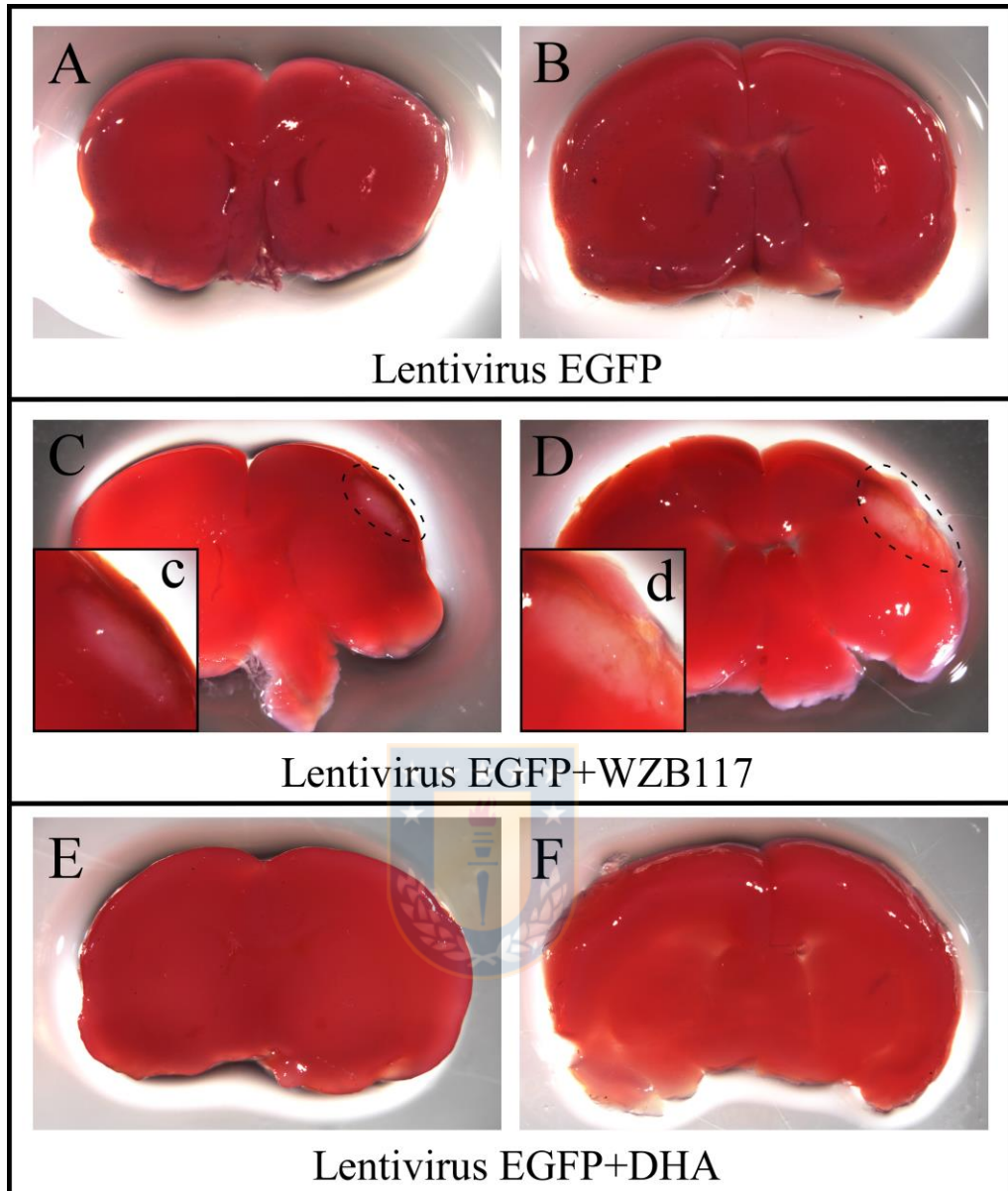


Figura 33. Inyección intracortical de lentivirus EGFP+WZB117, induce lesión cortical con muerte celular.

Análisis de zonas de muerte celular mediante incubación con TTC en cerebros de rata P8. **A-B.** Rebanadas de cerebro de rata control, inyectado con lentivirus EGFP de zona rostral (A) y caudal (B). **C-D.** Cerebro de rata P8 inyectado con la mezcla lentivirus EGFP+WZB117, donde se observa una zona de muerte celular por la falta de tinción (zona demarcada), tanto en porción rostral (C) como en una porción caudal (D). **c-d.** Aumentos digitales de zona demarcada en C y D, respectivamente. **E-F.** Rebanadas de porción rostral (E) y caudal (F) de cerebro, inyectado con lentivirus+DHA, donde no se observan zonas de muerte.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto diferenciador de AA y efecto de DHA en NE adheridas.

Si bien la adhesión a un sustrato es un estimulador de la diferenciación neuronal *Per se* para las NE, comprobamos que la presencia de AA 100 μ M durante las primeras 48 horas en este modelo podría estimular la obtención de un linaje neuronal con un mayor volumen de neuritas. Previamente, nuestro laboratorio ha comprobado que la suplementación con concentraciones fisiológicas de AA incrementa la expresión de marcadores neuronales como tubulina β III en NE formadas por la línea celular P19, la cual presenta características de NSC; lo mismo se observó en NE formadas desde pared ventricular de rata adulta (Pastor et al., 2013). Diversas evidencias corroboran que AA induce diferenciación en células precursoras, Lee y cols. en 2003 proponen que el tratamiento con AA en precursores corticales no sólo incrementa la diferenciación neuronal, sino que también induce un aumento en el número de eventos y en la amplitud de mEPSC en neuronas corticales, sugiriendo que AA estimula procesos de maduración neuronal (Lee et al., 2003). De esta misma forma, la suplementación con AA durante la diferenciación de células R1 induce un aumento en la expresión de genes de diferenciación neuronal como Ntrk2 y BDNF (Shin, Ahn, Lee, Lee, & Lee, 2004). Finalmente, al tratar con AA precursores aislados desde mesencéfalo ventral se obtienen células TH+, marcador clásico de neuronas dopaminérgicas, sugiriendo que ascorbato podría regular la diferenciación de un tipo neuronal específico (Yan et al., 2001). Esto último ha sido recientemente relacionado con el rol que tiene AA como cofactor de las enzimas TET, siendo TET1 y la actividad de JMJD3 las que mediarían el incremento en la expresión de genes dopaminérgicos como Th y Nurr1 (He et al., 2015; Wulansari et al., 2017). Todas estas evidencias apoyan nuestros resultados en donde AA estimula una fuerte diferenciación neuronal.

Respecto al efecto comparado de AR y AA sobre las NE en adhesión, interesadamente en nuestra condición experimental hemos detectado que AA induce mayor volumen de procesos neuríticos que AR, este resultado se opone a lo esperado ya que AR desde el año 1982 ha sido descrito como un potente diferenciador neuronal al ser utilizado en células indiferenciadas (Jones-Villeneuve, McBurney, Rogers, & Kalnins, 1982; Nitti et al., 2010). En el año 2013 Gao y cols., comprobaron en células F1 que el tratamiento con AR induce diferenciación disminuyendo el tamaño de colonias y la marca contra fosfatasa alcalina, mientras que, al suplementar con AA se recupera la pluripotencia mediado por un incremento en la expresión de factores como Esrrb, Eras y Nanog, asociados a la proliferación celular. Más tarde, compararon el efecto de AR y AA sobre la línea celular F9 la cual presenta características de células madres embrionarias (ESC), observando nuevamente que AR induce diferenciación neuronal, mientras que, AA potencia el fenotipo indiferenciado incrementando la expresión del gen Nanog mediante la señalización JAK/STAT (Wu et al., 2014). Considerando que AR es secretado por la meninges durante el desarrollo embrionario, llegando a impactar las células de la GR para inducir la diferenciación de neuronas corticales (Siegenthaler et al., 2009) y que AA se encuentra altamente concentrado durante el desarrollo embrionario en la corteza cerebral (Kratzing et al., 1985) parece posible postular que ambas moléculas se encuentren trabajando de manera conjunta durante el desarrollo embrionario de la corteza regulando procesos de diferenciación y mantención de la pluripotencia.

Sin embargo, en estadios más avanzados del desarrollo cuando las células ya adquieren un compromiso neuronal, como es el caso de nuestro modelo *in vitro*, la presencia de AA potenciaría un mayor crecimiento neurítico durante las primeras horas, mientras que el estímulo de AR es más lento pero sostenido en el tiempo. Esto podría explicarse por los mecanismos de señalización por el que cada molécula induciría la diferenciación neuronal; el efecto diferenciador de AA ha sido mayormente relacionado con su efecto epigenético al ser cofactor de enzimas demetilasas, a la activación de quinasas como ERK1/2, así como también,

a su efecto pro-oxidante que activaría la vía WNT/ β -catenina durante la diferenciación de células precursoras neuronales humanas (He et al., 2015; Rharass et al., 2017; Salazar et al., 2016). Por su parte, AR es una molécula de señalización exclusivamente nuclear la cual modula directa o indirectamente la expresión de más de 500 genes, entre ellos neurogenina 1 y MAP2 (Maden, 2007). Sin embargo, hasta la fecha, AA y AR no han sido relacionados mediante alguna vía de señalización específica en el contexto del crecimiento de neuritas.

Si bien la NE en adhesión es una estructura heterogénea, que posee en su interior células indiferenciadas nestina positivas y células gliales positivas a GFAP, la población más numerosa es la que ha adquirido un linaje neuronal positiva a tubulina β III. Respecto al estado redox de vitamina C en las neuronas, se ha comprobado que intracelularmente éstas oxidan hasta un 80% de AA hacia DHA en una hora, y realizan eflujo de esta molécula oxidada hacia el medio extracelular (Cisternas et al., 2014). Por lo tanto, la acumulación gradual de DHA en los cultivos luego de 72 horas de tratamiento se sustenta en la baja capacidad reductora que poseen las neuronas inmaduras que forman la NE y que expresan SVCT2, sumado a una baja presencia de astrocitos maduros en la estructura que puedan reducir el DHA hacia AA. De esta manera, la NE en adhesión es incapaz de establecer un mecanismo de reciclamiento de vitamina C utilizando las poblaciones celulares que alberga en su interior. Previamente, se ha demostrado que la suplementación con DHA en células de cáncer de colon induce una disminución en la glicólisis y un aumento en la actividad de la vía de las pentosas (Yun et al., 2015). Éstos mismos cambios metabólicos han sido descrito en neuronas corticales expuestas a DHA, detectándose además una disminución en los niveles de GSH y un incremento en la captación de lactato (Cisternas et al., 2014). Scheffler y cols., han descrito que la suplementación con DHA disminuye el crecimiento de neuritas en células PC12 diferenciadas con NGF, sin embargo, esto no ha sido relacionado con la falta de un sistema de reciclamiento de vitamina C (Scheffler et al., 2019). Por lo tanto, esta es la primera vez que se reporta cómo la acumulación sostenida de DHA puede alterar la morfología neuronal.

7.2 Reciclamiento de vitamina C y regulación de estructuras neuríticas mediante balance redox

La suplementación con DHA en neuronas corticales previamente expuestas a H_2O_2 induce muerte neuronal lo cual es revertido en presencia de astrocitos corticales que captan DHA desde el medio (Ferrada et al., 2020; Garcia-Krauss et al., 2015), por lo tanto, hasta la fecha la función del reciclamiento de vitamina C a nivel neuronal sólo ha sido descrita en el contexto de la mantención del metabolismo y viabilidad neuronal. En este trabajo proponemos por primera vez que este mecanismo regula el crecimiento neurítico, ya que las células que componen la NE poseen todos los elementos para que ocurra el reciclamiento en presencia de células previamente caracterizadas por su alto potencial de captación de DHA, como la línea HL60 (F. J. Nualart et al., 2003) o células U87 y astrocitos humanos previamente descritas como recicladoras de vitamina C (Garcia-Krauss et al., 2015). Si bien nuestro laboratorio ha comprobado que la expresión de SVCT2 y captación de AA pueden potenciar la generación de estructuras de maduración neuronal como lamelopodios y filopodios en células de neuroblastoma (Salazar et al., 2015), no existen evidencias previas que atribuyan a DHA una función reguladora de la morfología neuronal. DHA es una molécula que en buffer salino puede tener una vida media de hasta 50 min (Himmelreich, Drew, Serianni, & Kuchel, 1998), sin embargo, a altas concentraciones o en un contexto de estrés oxidativo se oxida irreversiblemente a 2,3-ácido dicetogulónico (2,3-DKG) el cual puede descomponerse en subproductos que derivan de la fragmentación de la cadena principal de 6 carbonos (Smuda & Glomb, 2013). Éstos productos carbonílicos son altamente reactivos, y se ha comprobado que bajo condiciones de estrés oxidativo pueden llevar a cabo la reacción de Maillard generando productos de glicación terminal como CML y pentosidina en el cristalino (Fan et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que tanto AA como DHA pueden incrementar los niveles de CML durante la diferenciación neuronal (Scheffler et al., 2019), también se ha comprobado que DHA podría unirse a GSH (Regulus, Desilets, Klarskov, & Wagner, 2010), mediar la S-

tionilación de glutaredoxina y homocisteína (Ahuie Kouakou et al., 2019) e inducir la S-glutationilación de GADPH (Yun et al., 2015). De esta forma, DHA tiene la capacidad de inducir modificaciones proteicas que alteran la función de antioxidantes y péptidos que contengan aminoácidos con un grupo tiol como cisteína. En nuestro modelo, la acumulación de DHA induce un ambiente de estrés oxidativo marcado por el aumento de ROS, el balance redox puede afectar la dinámica del citoesqueleto, siendo entonces un mecanismo que puede regular procesos de crecimiento/acortamiento o pérdida de procesos neuríticos dependiendo de las dinámicas de los microfilamentos de actina y tubulina (Figura 34). El monómero de actina contiene 5 residuos de cisteína y 16 de metionina, por su parte, α y β tubulina poseen 12 y 8 residuos de cisteína, respectivamente; siendo entonces estructuras susceptibles a oxidación (Wilson & Gonzalez-Billault, 2015). Particularmente, se ha detectado que la glutationilación de Cys 374 en G-actina induce un cambio estructural que enlentece la adición del monómero al filamento en crecimiento (Dalle-Donne, Giustarini, Rossi, Colombo, & Milzani, 2003). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la acumulación de DHA desencadena modificaciones proteicas terminales como la generación de CML y la carbonilación, las cuales podrían afectar a proteínas del citoesqueleto afectando así la mantención de neuritas.

7.3 Transporte de AA en neuronas corticales y presencia del reciclamiento de vitamina *in vivo*.

Diversas evidencias *in vitro* han comprobado que neuronas tanto corticales como de cerebelo transportan AA eficientemente de manera dependiente de sodio (Caprile et al., 2009; M. Castro et al., 2001; Cisternas et al., 2014), sin embargo, no existen reportes *ex vivo* o *in vivo* que permitan comprobar que este transporte ocurre a nivel neuronal. En este trabajo hemos utilizado un método indirecto para estudiar si el transporte de AA ocurre en neuronas corticales de las capas II/III en ratones jóvenes (P14-P21), midiendo los niveles de sodio intracelular. Esto

se sustenta en la estequiometría que tiene el co-transporte de sodio-ascorbato a través de SVCT2, se ha descrito un coeficiente de Hill cercano a 2 para sodio, por lo tanto, SVCT2 presenta 2 sitios de unión a sodio que serían cooperativos, con una estequiometría de 2:1, ingresando dos moléculas de sodio por cada AA que ingresa a la célula (Godoy et al., 2007). En nuestros experimentos detectamos un incremento significativo en los niveles de Na⁺ intraneuronal al exponer rebanadas de cerebro a concentraciones fisiológicas de AA (200 μM), lo cual nos permite reafirmar que un contexto *ex vivo* existe un transporte efectivo de AA en neuronas corticales. Cabe mencionar que también detectamos un incremento en el sodio intracelular de astrocitos corticales, esto es llamativo ya que *in vitro* los astrocitos corticales sólo son capaces de transportar la forma oxidada de vitamina C, DHA, y no AA (Astuya et al., 2005; Siushansian, Tao, Dixon, & Wilson, 1997). Sin embargo, no podemos descartar que el AA administrado durante los 30 minutos de análisis se oxidara hacia DHA, induciendo esta molécula un cambio en los niveles de sodio intracelular mediante un mecanismo que, hasta la fecha, no ha sido estudiado. Respecto a los análisis de los niveles de calcio intracelular en presencia de AA, aun cuando detectamos un mayor número de neuronas que presentan señales en presencia de AA; la disminución en la frecuencia y en la amplitud de las señales nos indican que no existiría un trabajo reverso del transportador NCX, el cual ha sido reportado como un transportador que saca sodio e ingresa calcio en presencia de un aumento del Na⁺ intracelular (Gerkau et al., 2018).

La presencia del reciclamiento de vitamina C en el cerebro postnatal temprano es, en la teoría, posible debido a que todos los elementos celulares se encuentran presentes desde el momento del nacimiento cuando ha terminado la neurogénesis y ha comenzado la gliogénesis (Ge & Jia, 2016; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). La caracterización inmunohistoquímica nos confirma que desde el día P1 en la corteza cerebral externa existe una importante presencia de la glía limitante, la cual sería la primera en localizarse (Olude et al., 2015), astrocitos que son positivos a GLUT1 y que podrían captar DHA. Estos astrocitos contactan

con las neuronas inmaduras positivas a tubulina β III, las cuales expresan SVCT2 (Salazar et al., 2014) y, que en este trabajo demostramos *ex vivo* que pueden captar AA (Figura 34).

7.4 Inhibición del reciclamiento de vitamina C *in vivo* induce lesión cortical afectando la morfología neuronal

WZB117 fue utilizado como una herramienta inhibitoria de GLUT1 a nivel astrocítico (Figura 34), esta molécula fue descrita en el año 2010 dentro de un conjunto de moléculas pequeñas sintetizadas para inhibir el transporte de glucosa a través de GLUT1 como herramienta anticancerígena (Zhang, Liu, Chen, & Bergmeier, 2010). A la fecha, WZB117 ha sido inyectado de manera intraperitoneal en ratones *nude* a los cuales se les había inducido la formación de tumores, este tratamiento ha sido mantenido desde 10 días hasta 10 semanas sin observarse consecuencias sistémicas diferentes a la disminución del crecimiento tumoral (Shibuya et al., 2015). Es por ello que elegimos esta molécula, ya que los reportes *in vivo* demuestran que no induce cambios a nivel sanguíneo como el número de plaquetas o linfocitos (Liu et al., 2012). Es interesante que en la literatura se utilice esta molécula como inhibidor del transporte de glucosa, sin analizar el efecto que tiene también en el transporte de DHA; molécula que previamente ha sido descrita como la forma que muchas células cancerosas captan mediante el efecto *bystander* (F. J. Nualart et al., 2003; Pena et al., 2019). Es por ello que caracterizamos exitosamente a WZB117 como un inhibidor efectivo del transporte de DHA a través de GLUT1, siendo incluso comparable al efecto inhibitor de citocalasina B. En el año 2016, se describe que WZB117 sería un inhibidor competitivo de la entrada de glucosa a través de GLUT1, uniéndose al poro central de este transportador por la cara exofacial (Ojelabi et al., 2016). Sin embargo, en este mismo estudio se comprueba que al sobreexpresar la isorforma humana de GLUT3 en células HEK, WZB117 presenta la misma K_m que para GLUT1, cercana 10 μ M. Hasta la fecha no existen más reportes que relacionen la afinidad de WZB con GLUT3, fue por

ello que intentamos caracterizarlo en cultivo primario de neuronas corticales, como un modelo de expresión exclusiva de GLUT3, sin embargo, descubrimos que *in vitro* las neuronas también inducen la expresión de GLUT1, siendo imposible discriminar si este inhibidor será dirigido exclusivamente a los astrocitos, o quizás, en menor proporción también podrá unirse a GLUT3 a nivel neuronal.

La inyección intracortical de WZB117 induce una importante lesión cortical a nivel neuronal luego de 3 días post-inyección, atribuimos este efecto a la falta de reciclamiento de DHA entre neurona-astrocito expuestos a esta molécula en la zona de inyección. Descartamos el efecto que tendría la inhibición del transporte de glucosa y la posible privación de esta misma molécula tanto a nivel neuronal como astrocítico, esto debido a que luego del nacimiento y comenzado el amamantamiento el cerebro es un modelo natural de dieta cetogénica. Esto significa que debido al alto contenido graso de la leche materna, se obtienen como productos mayoritarios cuerpos cetónicos (acetacetato y β -hidroxibutirato (β HB)), los cuales se captan entre 2 a 3 veces más eficientemente en la barrera hematoencefálica que la glucosa, para la cual sólo existe un 20% de captación durante las primeras dos semanas de vida, comparado con el cerebro adulto. Análisis utilizando glucosa y β HB radioactivos muestran que la captación de β HB incrementa entre los días P10-P14 y disminuye desde el día P17; concomitante con el aumento en la captación cerebral de glucosa recién al día P17-P21 (Nehlig, 1999). Por lo tanto, los cuerpos cetónicos pueden sustituir a la glucosa como sustrato energético, preservando la integridad y estabilidad neuronal durante la lactancia, hasta que las ratas se destetan y comienza a utilizar los carbohidratos como fuente energética neuronal (Nehlig, 2004). Por lo tanto, el efecto neuronal observado por la presencia de WZB117 no es atribuible a un fallo metabólico por ausencia de glucosa. La menor presencia y largo de neuritas debido a la inhibición del reciclamiento puede ser relacionada con la consecuente disminución en la disponibilidad de AA en el parénquima cerebral. En cobayos P2 mantenidos con una dieta baja en AA durante 3 semanas, se ha detectado una disminución de un 30% en la concentración

cerebral de AA, acompañado de un incremento en DHA que altera la homeostasis redox incrementando la peroxidación lipídica (Lykkesfeldt, Trueba, Poulsen, & Christen, 2007). Sumado a esto, se ha comprobado que la deficiencia de AA en la dieta de cobayos jóvenes genera una disminución en la generación de la memoria espacial, afectando la población neuronal del hipocampo (Tveden-Nyborg et al., 2009). La relación del acoplamiento neurona-astrocito con el control de la morfología neuronal también ha sido descrita en el contexto metabólico y la inducción de transportadores de lactato (MCT), la cual ha sido descrita como un mecanismo que puede modular procesos de sinaptogénesis y memoria. La entrada de lactato induciría la expresión de genes relacionados con la plasticidad neuronal (Suzuki et al., 2011), dentro de las señalizaciones descritas, se encuentra la activación de Erk1/2 (similar a lo observado con la sobreexpresión de SVCT2), que induciría la expresión de genes como Arc, Zif268 y cofilina fosforilada (Yang et al., 2014).

Nuestros resultados sugieren por primera vez, que en un contexto *in vivo*, la ausencia del reciclamiento de vitamina C y la consecuente acumulación de DHA pueden afectar la morfología neuronal (Figura 34), causando una lesión cortical con muerte celular, posiblemente relacionado con procesos de muerte como los recientemente descritos por nuestro laboratorio (Ferrada et al., 2020).

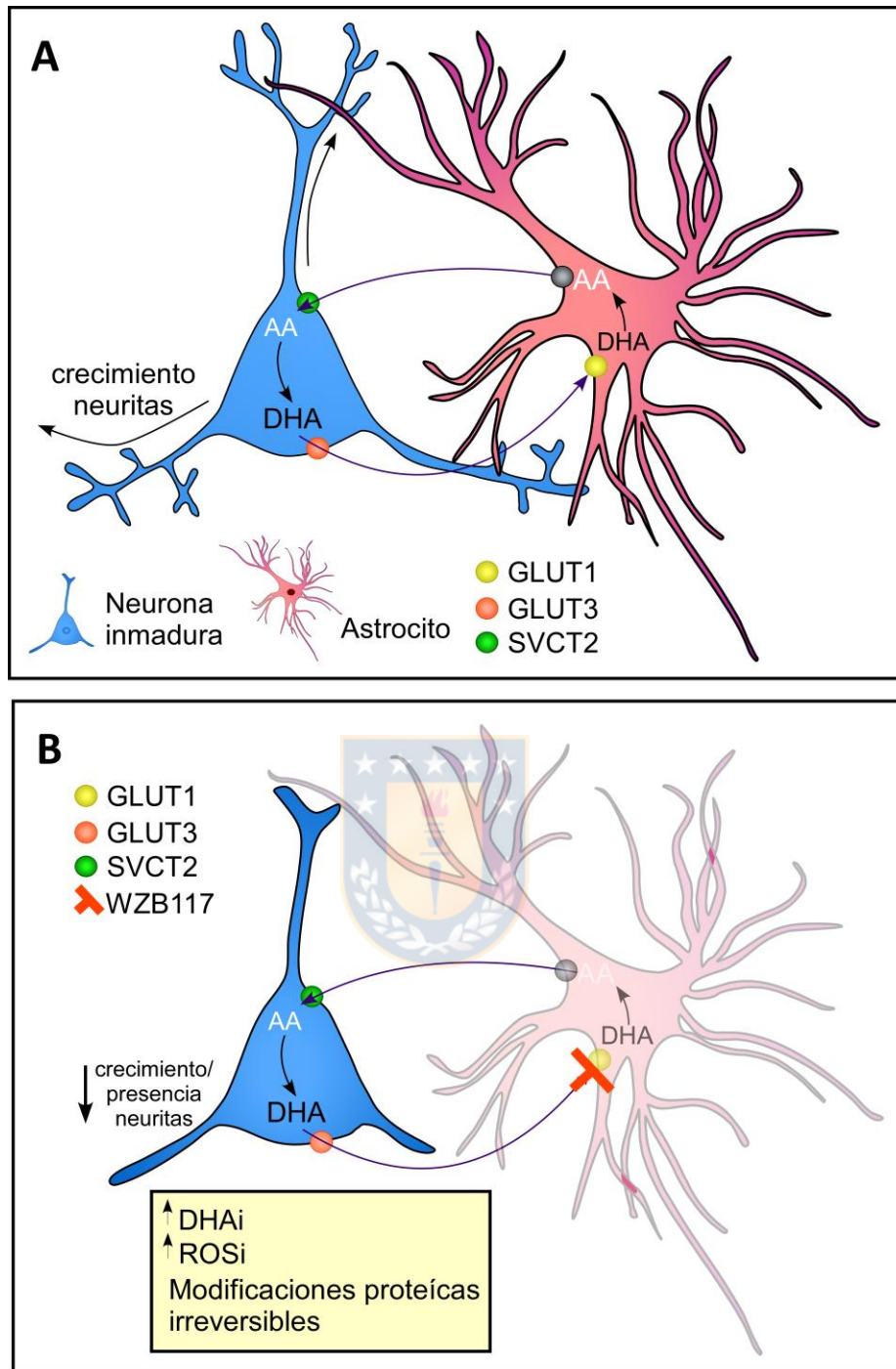


Figura 34. Modelo final del estudio.

A. Mecanismo de regulación del crecimiento de neuritas en presencia del reciclamiento de vitamina C entre neurona postnatal inmadura y astrocito. **B.** Efectos neuronales por ausencia de células recicladoras de DHA o en presencia de un inhibidor del transportador GLUT1, como WZB117.

8. PROYECCIONES

Si bien esta tesis no se encuentra enmarcada en un contexto patológico, recientemente hemos caracterizado que bajo diferentes procesos de neurodegeneración, como modelos de epilepsia, daño cortical y alzheimer, los astrocitos reactivos inducen la expresión de SVCT2 en las zonas de daño, lo que podría inducir un desbalance en el mecanismo del reciclamiento de vitamina C, exacerbando así el daño neuronal (Salazar et al., 2018). Sin embargo, en un contexto fisiológico es necesario conocer las dinámicas que tiene la vitamina C durante los diversos estadios del desarrollo cerebral, considerando que se han reportado bajas concentraciones de vitamina C en la población de los países de occidente (Agathocleous et al., 2017; Hansen, Tveden-Nyborg, & Lykkesfeldt, 2014), y que dentro de esta población existen mujeres embarazadas y en período de lactancia. En este contexto, estudios realizados en madres fumadoras y no fumadoras demuestran una significativa disminución en la concentración sanguínea de AA tanto de las madres como de los recién nacidos, lo que se encuentra fuertemente relacionado con pertenecer a un estrato socioeconómico bajo que impide una correcta alimentación (Madruga de Oliveira, Rondo, & Barros, 2004). Similares resultados fueron reportados en mujeres chilenas, las cuales presentaron menores niveles de vitamina C en plasma al pertenecer a un nivel socioeconómico bajo, comparado con el grupo perteneciente a un nivel más alto (Rozowski N et al., 2001). Análisis de la concentración de AA en la leche materna demuestran una significativa disminución en la perteneciente a madres fumadoras comparado con el grupo control (Ortega, Lopez-Sobaler, Quintas, Martinez, & Andres, 1998), sin embargo, no existen estudios chilenos que verifiquen los niveles sanguíneos de vitamina C en las mujeres que amamantan. Por lo tanto, esperamos que este estudio logre demostrar la relevancia que tiene este mecanismo desde los primeros días del nacimiento, momento en el que los niños y niñas reciben la vitamina C directamente desde la leche materna, niveles plasmáticos adecuados de la vitamina aseguran una alta concentración de AA en el parénquima cerebral, mantenida por el correcto funcionamiento del reciclamiento

de vitamina C; el cual será vital para regular los procesos de diferenciación y maduración neuronal.



9. CONCLUSIONES

1. La diferenciación neuronal de NE adheridas en ausencia de células que reciclen el DHA generado por el tratamiento prolongado con AA genera un ambiente oxidativo, mediado por un aumento en ROS, lo cual desencadena modificaciones proteicas irreversibles como la glicación y carbonilación. Estas modificaciones podrían afectar la estructura y función de proteínas asociadas al crecimiento de neuritas lo que afectaría su crecimiento y mantención en el tiempo.
2. Durante la diferenciación neuronal de NSC *in vitro* estimulada por presencia de AA, el mecanismo de reciclamiento de vitamina C establecido entre neuronas y células recicladoras de DHA es necesario para regular los niveles de AA/DHA en el medio, favoreciendo el crecimiento de neuritas en durante tratamientos prolongados con AA.
3. La inhibición *in vivo* del transporte de DHA a través de GLUT1 por parte de los astrocitos en la corteza cerebral postnatal temprana, afecta drásticamente la morfología neuronal, disminuyendo el número de neuritas y generando muerte celular. Sugiriendo de esta manera, que el mecanismo de reciclamiento de vitamina C puede establecerse entre la neurona inmadura y el astrocito cortical, regulando el proceso de maduración neuronal que se caracteriza por la extensión de procesos neuríticos para aumentar la arborización neuronal.

10. REFERENCIAS

- Agathocleous, M., Meacham, C. E., Burgess, R. J., Piskounova, E., Zhao, Z., Crane, G. M., . . . Morrison, S. J. (2017). Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*, *549*(7673), 476-481. doi: 10.1038/nature23876
- Ahuie Kouakou, G., Gagnon, H., Lacasse, V., Wagner, J. R., Naylor, S., & Klarskov, K. (2019). Dehydroascorbic acid S-Thiolation of peptides and proteins: Role of homocysteine and glutathione. *Free Radic Biol Med*, *141*, 233-243. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.022
- Alvarez-Buylla, A., & Lois, C. (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*, *13*(3), 263-272. doi: 10.1002/stem.5530130307
- Astuya, A., Caprile, T., Castro, M., Salazar, K., Garcia Mde, L., Reinicke, K., . . . Nualart, F. (2005). Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J Neurosci Res*, *79*(1-2), 146-156. doi: 10.1002/jnr.20326
- Barnes, A. P., & Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci*, *32*, 347-381. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125536
- Benbrook, D. M., Chambon, P., Rochette-Egly, C., & Asson-Batres, M. A. (2014). History of retinoic acid receptors. *Subcell Biochem*, *70*, 1-20. doi: 10.1007/978-94-017-9050-5_1
- Benedek, A., Moricz, K., Juranyi, Z., Gigler, G., Levay, G., Harsing, L. G., Jr., . . . Albert, M. (2006). Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, *1116*(1), 159-165. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.123
- Braun, S. M., & Jessberger, S. (2014). Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development*, *141*(10), 1983-1986. doi: 10.1242/dev.104596
- Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Montecinos, H., . . . Nualart, F. (2009). The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons,

- and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *J Neurochem*, *108*(3), 563-577. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05788.x
- Carpenter, K. J. (2012). The discovery of thiamin. *Ann Nutr Metab*, *61*(3), 219-223. doi: 10.1159/000343109
- Carpenter, K. J., & Sutherland, B. (1995). Eijkman's contribution to the discovery of vitamins. *J Nutr*, *125*(2), 155-163.
- Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J. C., . . . Nualart, F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem*, *78*(4), 815-823.
- Castro, T., Low, M., Salazar, K., Montecinos, H., Cifuentes, M., Yanez, A. J., . . . Nualart, F. (2008). Differential distribution of the Sodium-vitamin C cotransporter-1 along the proximal tubule of the mouse and human kidney. *Kidney Int*, *74*(10), 1278-1286. doi: 10.1038/ki.2008.329
- Cimmino, L., Dolgalev, I., Wang, Y., Yoshimi, A., Martin, G. H., Wang, J., . . . Aifantis, I. (2017). Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*, *170*(6), 1079-1095 e1020. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.032
- Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Martinez, F., Fernandez, E., Ferrada, L., Oyarce, K., . . . Nualart, F. (2014). The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *J Neurochem*, *129*(4), 663-671. doi: 10.1111/jnc.12663
- Corpe, C. P., Lee, J. H., Kwon, O., Eck, P., Narayanan, J., Kirk, K. L., & Levine, M. (2005). 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid: an ascorbate analog specific for Na⁺-dependent vitamin C transporter but not glucose transporter pathways. *J Biol Chem*, *280*(7), 5211-5220. doi: 10.1074/jbc.M412925200
- Chen, C., & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, *7*(8), 2745-2752.

- Chen, H., Zhang, L., Guo, Z., Wang, Y., He, R., Qin, Y., . . . Zhang, Y. (2015). Improving the development of early bovine somatic-cell nuclear transfer embryos by treating adult donor cells with vitamin C. *Mol Reprod Dev*, *82*(11), 867-879. doi: 10.1002/mrd.22531
- da Silva, J. S., & Dotti, C. G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci*, *3*(9), 694-704. doi: 10.1038/nrn918
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Rossi, R., Colombo, R., & Milzani, A. (2003). Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radic Biol Med*, *34*(1), 23-32. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01182-6
- deAzevedo, L. C., Fallet, C., Moura-Neto, V., Dumas-Duport, C., Hedin-Pereira, C., & Lent, R. (2003). Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *J Neurobiol*, *55*(3), 288-298. doi: 10.1002/neu.10205
- Esteban, M. A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., . . . Pei, D. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *6*(1), 71-79. doi: 10.1016/j.stem.2009.12.001
- Fan, X., Reneker, L. W., Obrenovich, M. E., Strauch, C., Cheng, R., Jarvis, S. M., . . . Monnier, V. M. (2006). Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(45), 16912-16917. doi: 10.1073/pnas.0605101103
- Farhy-Tselnicker, I., & Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev*, *13*(1), 7. doi: 10.1186/s13064-018-0104-y
- Ferrada, L., Barahona, M. J., Salazar, K., Vandenabeele, P., & Nualart, F. (2020). Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress. *Redox Biol*, *29*, 101408. doi: 10.1016/j.redox.2019.101408
- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, *330*(6005), 774-778. doi: 10.1126/science.1190928

- Fujisawa, K., Hara, K., Takami, T., Okada, S., Matsumoto, T., Yamamoto, N., & Sakaida, I. (2018). Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, *9*(1), 93. doi: 10.1186/s13287-018-0825-1
- Gao, Y., Yang, L., Chen, L., Wang, X., Wu, H., Ai, Z., . . . Zhang, Y. (2013). Vitamin C facilitates pluripotent stem cell maintenance by promoting pluripotency gene transcription. *Biochimie*, *95*(11), 2107-2113. doi: 10.1016/j.biochi.2013.08.001
- Garcia-Krauss, A., Ferrada, L., Astuya, A., Salazar, K., Cisternas, P., Martinez, F., . . . Nualart, F. (2015). Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-015-9497-3
- Garcia Mde, L., Salazar, K., Millan, C., Rodriguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., . . . Nualart, F. (2005). Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia*, *50*(1), 32-47. doi: 10.1002/glia.20133
- Ge, W. P., & Jia, J. M. (2016). Local production of astrocytes in the cerebral cortex. *Neuroscience*, *323*, 3-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.057
- Ge, W. P., Miyawaki, A., Gage, F. H., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*, *484*(7394), 376-380. doi: 10.1038/nature10959
- Gerkau, N. J., Rakers, C., Durry, S., Petzold, G. C., & Rose, C. R. (2018). Reverse NCX Attenuates Cellular Sodium Loading in Metabolically Compromised Cortex. *Cereb Cortex*, *28*(12), 4264-4280. doi: 10.1093/cercor/bhx280
- Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuniga, F. A., Sotomayor, P., Barra, V., . . . Vera, J. C. (2007). Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *J Biol Chem*, *282*(1), 615-624. doi: 10.1074/jbc.M608300200
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W. B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, *420*(6917), 812-816. doi: 10.1038/nature01276

- Hahn, M. A., Qiu, R., Wu, X., Li, A. X., Zhang, H., Wang, J., . . . Lu, Q. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep*, 3(2), 291-300. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.011
- Hansen, S. N., Tveden-Nyborg, P., & Lykkesfeldt, J. (2014). Does vitamin C deficiency affect cognitive development and function? *Nutrients*, 6(9), 3818-3846. doi: 10.3390/nu6093818
- Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med*, 46(6), 719-730. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018
- He, X. B., Kim, M., Kim, S. Y., Yi, S. H., Rhee, Y. H., Kim, T., . . . Lee, S. H. (2015). Vitamin C facilitates dopamine neuron differentiation in fetal midbrain through TET1- and JMJD3-dependent epigenetic control manner. *Stem Cells*, 33(4), 1320-1332. doi: 10.1002/stem.1932
- Himmelreich, U., Drew, K. N., Serianni, A. S., & Kuchel, P. W. (1998). ¹³C NMR studies of vitamin C transport and its redox cycling in human erythrocytes. *Biochemistry*, 37(20), 7578-7588. doi: 10.1021/bi970765s
- Huttner, W. B., & Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol*, 7(1), 29-39.
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A., & Kalnins, V. I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol*, 94(2), 253-262.
- Kassem, M. S., Fok, S. Y. Y., Smith, K. L., Kuligowski, M., & Balleine, B. W. (2018). A novel, modernized Golgi-Cox stain optimized for CLARITY cleared tissue. *J Neurosci Methods*, 294, 102-110. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.11.010
- Kim, J. H., Kim, M., He, X. B., Wulansari, N., Yoon, B. H., Bae, D. H., . . . Kim, S. Y. (2018). Vitamin C Promotes Astrocyte Differentiation Through DNA Hydroxymethylation. *Stem Cells*, 36(10), 1578-1588. doi: 10.1002/stem.2886

- Kratzing, C. C., Kelly, J. D., & Kratzing, J. E. (1985). Ascorbic acid in fetal rat brain. *J Neurochem*, *44*(5), 1623-1624.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, *32*, 149-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
- Lee, J. Y., Chang, M. Y., Park, C. H., Kim, H. Y., Kim, J. H., Son, H., . . . Lee, S. H. (2003). Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes. *J Neurosci Res*, *73*(2), 156-165. doi: 10.1002/jnr.10647
- Liang, W. J., Johnson, D., Ma, L. S., Jarvis, S. M., & Wei-Jun, L. (2002). Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C [corrected]. *Am J Physiol Cell Physiol*, *283*(6), C1696-1704. doi: 10.1152/ajpcell.00461.2001
- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., . . . Chen, X. (2012). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, *11*(8), 1672-1682. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0131
- Lykkesfeldt, J., Trueba, G. P., Poulsen, H. E., & Christen, S. (2007). Vitamin C deficiency in weanling guinea pigs: differential expression of oxidative stress and DNA repair in liver and brain. *Br J Nutr*, *98*(6), 1116-1119. doi: 10.1017/s0007114507787457
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, *8*(10), 755-765. doi: 10.1038/nrn2212
- Madruga de Oliveira, A., Rondo, P. H., & Barros, S. B. (2004). Concentrations of ascorbic acid in the plasma of pregnant smokers and nonsmokers and their newborns. *Int J Vitam Nutr Res*, *74*(3), 193-198. doi: 10.1024/0300-9831.74.3.193
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*, *86*(4), 883-901. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035

- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1999). Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci*, 14, 177-182.
- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*, 269(13), 9397-9400.
- Meredith, M. E., Harrison, F. E., & May, J. M. (2011). Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. *Biochem Biophys Res Commun*, 414(4), 737-742. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.146
- Minor, E. A., Court, B. L., Young, J. I., & Wang, G. (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem*, 288(19), 13669-13674. doi: 10.1074/jbc.C113.464800
- Mori, T., Buffo, A., & Gotz, M. (2005). The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 69, 67-99. doi: 10.1016/S0070-2153(05)69004-7
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., . . . Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267.
- Nehlig, A. (1999). Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Res*, 37(3), 211-221. doi: 10.1016/s0920-1211(99)00073-x
- Nehlig, A. (2004). Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(3), 265-275. doi: 10.1016/j.plefa.2003.07.006
- Niki, E. (1991). Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr*, 54(6 Suppl), 1119S-1124S. doi: 10.1093/ajcn/54.6.1119s
- Nishikimi, M., & Yagi, K. (1991). Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr*, 54(6 Suppl), 1203S-1208S.

- Nitti, M., Furfaro, A. L., Cevasco, C., Traverso, N., Marinari, U. M., Pronzato, M. A., & Domenicotti, C. (2010). PKC delta and NADPH oxidase in retinoic acid-induced neuroblastoma cell differentiation. *Cell Signal*, 22(5), 828-835. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.007
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., & Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821), 714-720. doi: 10.1038/35055553
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7(2), 136-144. doi: 10.1038/nn1172
- Nualart, F., Godoy, A., & Reinicke, K. (1999). Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res*, 824(1), 97-104. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01078-1
- Nualart, F., Mack, L., Garcia, A., Cisternas, P., Bongarzone, E. R., Heitzer, M., . . . Salazar, K. (2014). Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *J Stem Cell Res Ther*, 4(5), 209. doi: 10.4172/2157-7633.1000209
- Nualart, F., Salazar, K., Oyarce, K., Cisternas, P., Jara, N., Silva-Alvarez, C., . . . Tapia, J. C. (2012). Typical and atypical stem cells in the brain, vitamin C effect and neuropathology. *Biol Res*, 45(3), 243-256. doi: 10.4067/S0716-97602012000300006
- Nualart, F. J., Rivas, C. I., Montecinos, V. P., Godoy, A. S., Guaiquil, V. H., Golde, D. W., & Vera, J. C. (2003). Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem*, 278(12), 10128-10133. doi: 10.1074/jbc.M210686200
- Oga, T., Elston, G. N., & Fujita, I. (2017). Postnatal Dendritic Growth and Spinogenesis of Layer-V Pyramidal Cells Differ between Visual, Inferotemporal, and Prefrontal Cortex of the Macaque Monkey. *Front Neurosci*, 11, 118. doi: 10.3389/fnins.2017.00118

- Ojelabi, O. A., Lloyd, K. P., Simon, A. H., De Zutter, J. K., & Carruthers, A. (2016). WZB117 (2-Fluoro-6-(m-hydroxybenzoyloxy) Phenyl m-Hydroxybenzoate) Inhibits GLUT1-mediated Sugar Transport by Binding Reversibly at the Exofacial Sugar Binding Site. *J Biol Chem*, *291*(52), 26762-26772. doi: 10.1074/jbc.M116.759175
- Olude, M. A., Mustapha, O. A., Aderounmu, O. A., Olopade, J. O., & Ihunwo, A. O. (2015). Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *Front Neuroanat*, *9*, 67. doi: 10.3389/fnana.2015.00067
- Ortega, R. M., Lopez-Sobaler, A. M., Quintas, M. E., Martinez, R. M., & Andres, P. (1998). The influence of smoking on vitamin C status during the third trimester of pregnancy and on vitamin C levels in maternal milk. *J Am Coll Nutr*, *17*(4), 379-384. doi: 10.1080/07315724.1998.10718779
- Oyarce, K., Silva-Alvarez, C., Ferrada, L., Martinez, F., Salazar, K., & Nualart, F. (2018). SVCT2 Is Expressed by Cerebellar Precursor Cells, Which Differentiate into Neurons in Response to Ascorbic Acid. *Mol Neurobiol*, *55*(2), 1136-1149. doi: 10.1007/s12035-016-0366-5
- Padayatty, S. J., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis*, *22*(6), 463-493. doi: 10.1111/odi.12446
- Pastor, P., Cisternas, P., Salazar, K., Silva-Alvarez, C., Oyarce, K., Jara, N., . . . Nualart, F. (2013). SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche. *Front Cell Neurosci*, *7*, 119. doi: 10.3389/fncel.2013.00119
- Pena, E., Roa, F. J., Inostroza, E., Sotomayor, K., Gonzalez, M., Gutierrez-Castro, F. A., . . . Rivas, C. I. (2019). Increased expression of mitochondrial sodium-coupled ascorbic acid transporter-2 (mitSVCT2) as a central feature in breast cancer. *Free Radic Biol Med*, *135*, 283-292. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.015
- Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., Tagarelli, A., & Quattrone, A. (2010). Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Ann Nutr Metab*, *57*(2), 85-88. doi: 10.1159/000319165

- Qiu, S., Li, L., Weeber, E. J., & May, J. M. (2007). Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res*, *85*(5), 1046-1056. doi: 10.1002/jnr.21204
- Regulus, P., Desilets, J. F., Klarskov, K., & Wagner, J. R. (2010). Characterization and detection in cells of a novel adduct derived from the conjugation of glutathione and dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med*, *49*(6), 984-991. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.029
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*(5052), 1707-1710.
- Rharass, T., Lantow, M., Gbankoto, A., Weiss, D. G., Panakova, D., & Lucas, S. (2017). Ascorbic acid alters cell fate commitment of human neural progenitors in a WNT/beta-catenin/ROS signaling dependent manner. *J Biomed Sci*, *24*(1), 78. doi: 10.1186/s12929-017-0385-1
- Rice, M. E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, *23*(5), 209-216.
- Rice, M. E., & Russo-Menna, I. (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*, *82*(4), 1213-1223.
- Rony, I. K., Baten, A., Bloomfield, J. A., Islam, M. E., Billah, M. M., & Islam, K. D. (2015). Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif*, *48*(2), 140-156. doi: 10.1111/cpr.12162
- Rose, R. C. (1988). Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. *Biochim Biophys Acta*, *947*(2), 335-366.
- Rozowski N, J., Cuevas M, A., Castillo V, O., Marín L, P. P., Strobel L, P., Pérez P, D. D., . . . Leighton P, F. (2001). Diferencias en antioxidantes plasmáticos según nivel socioeconómico en mujeres chilenas. *Revista médica de Chile*, *129*, 43-50.

- Rumsey, S. C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M. J., Simpson, I. A., & Levine, M. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 275(36), 28246-28253. doi: 10.1074/jbc.M000988200
- Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I., & Levine, M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem*, 272(30), 18982-18989. doi: 10.1074/jbc.272.30.18982
- Salazar, K., Cerda, G., Martinez, F., Sarmiento, J. M., Gonzalez, C., Rodriguez, F., . . . Nualart, F. (2014). SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *J Neurochem*, 130(5), 693-706. doi: 10.1111/jnc.12793
- Salazar, K., Martinez, F., Perez-Martin, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., . . . Nualart, F. (2018). SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Mol Neurobiol*, 55(7), 5439-5452. doi: 10.1007/s12035-017-0762-5
- Salazar, K., Martinez, M., Ulloa, V., Bertinat, R., Martinez, F., Jara, N., . . . Nualart, F. (2015). SVCT2 Overexpression in Neuroblastoma Cells Induces Cellular Branching that is Associated with ERK Signaling. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-015-9553-z
- Salazar, K., Martinez, M., Ulloa, V., Bertinat, R., Martinez, F., Jara, N., . . . Nualart, F. (2016). SVCT2 Overexpression in Neuroblastoma Cells Induces Cellular Branching that is Associated with ERK Signaling. *Mol Neurobiol*, 53(10), 6668-6679. doi: 10.1007/s12035-015-9553-z
- Sandstrom, M. I., & Rebec, G. V. (2007). Extracellular ascorbate modulates glutamate dynamics: role of behavioral activation. *BMC Neurosci*, 8, 32. doi: 10.1186/1471-2202-8-32
- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., & Catani, M. V. (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, 34(3), 347-355. doi: 10.1007/s00726-007-0555-7
- Scheffler, J., Bork, K., Bezold, V., Rosenstock, P., Gnanapragassam, V. S., & Horstkorte, R. (2019). Ascorbic acid leads to glycation and interferes with neurite outgrowth. *Exp Gerontol*, 117, 25-30. doi: 10.1016/j.exger.2018.08.005

- Shibuya, K., Okada, M., Suzuki, S., Seino, M., Seino, S., Takeda, H., & Kitanaka, C. (2015). Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget*, *6*(2), 651-661. doi: 10.18632/oncotarget.2892
- Shin, D. M., Ahn, J. I., Lee, K. H., Lee, Y. S., & Lee, Y. S. (2004). Ascorbic acid responsive genes during neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Neuroreport*, *15*(12), 1959-1963. doi: 10.1097/00001756-200408260-00025
- Siegenthaler, J. A., Ashique, A. M., Zarbalis, K., Patterson, K. P., Hecht, J. H., Kane, M. A., . . . Pleasure, S. J. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell*, *139*(3), 597-609. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.004
- Siushansian, R., Tao, L., Dixon, S. J., & Wilson, J. X. (1997). Cerebral astrocytes transport ascorbic acid and dehydroascorbic acid through distinct mechanisms regulated by cyclic AMP. *J Neurochem*, *68*(6), 2378-2385. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68062378.x
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, *150*(1), 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Smuda, M., & Glomb, M. A. (2013). Maillard degradation pathways of vitamin C. *Angew Chem Int Ed Engl*, *52*(18), 4887-4891. doi: 10.1002/anie.201300399
- Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., . . . Nussbaum, R. L. (2002). Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med*, *8*(5), 514-517. doi: 10.1038/nm0502-514
- Spector, R., & Lorenzo, A. V. (1974). Specificity of ascorbic acid transport system of the central nervous system. *Am J Physiol*, *226*(6), 1468-1473.
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, *144*(5), 810-823. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.018

- Svirbely, J. L., & Szent-Gyorgyi, A. (1932). The chemical nature of vitamin C. *Biochem J*, 26(3), 865-870.
doi: 10.1042/bj0260865
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Wu, H., Dai, Q., . . . Jin, P. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, 14(12), 1607-1616. doi: 10.1038/nn.2959
- Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*, 9, 114. doi: 10.3389/fnins.2015.00114
- Takano, T., Xu, C., Funahashi, Y., Namba, T., & Kaibuchi, K. (2015). Neuronal polarization. *Development*, 142(12), 2088-2093. doi: 10.1242/dev.114454
- Tran, K. A., Jackson, S. A., Olufs, Z. P., Zaidan, N. Z., Leng, N., Kendzioriski, C., . . . Sridharan, R. (2015). Collaborative rewiring of the pluripotency network by chromatin and signalling modulating pathways. *Nat Commun*, 6, 6188. doi: 10.1038/ncomms7188
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., . . . Hediger, M. A. (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399(6731), 70-75. doi: 10.1038/19986
- Tveden-Nyborg, P., Johansen, L. K., Raida, Z., Villumsen, C. K., Larsen, J. O., & Lykkesfeldt, J. (2009). Vitamin C deficiency in early postnatal life impairs spatial memory and reduces the number of hippocampal neurons in guinea pigs. *Am J Clin Nutr*, 90(3), 540-546. doi: 10.3945/ajcn.2009.27954
- Ulloa, V., Garcia-Robles, M., Martinez, F., Salazar, K., Reinicke, K., Perez, F., . . . Nualart, F. (2013). Human choroid plexus papilloma cells efficiently transport glucose and vitamin C. *J Neurochem*, 127(3), 403-414. doi: 10.1111/jnc.12295
- Ulloa, V., Saldivia, N., Ferrada, L., Salazar, K., Martinez, F., Silva-Alvarez, C., . . . Nualart, F. (2019). Basal Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions. *Sci Rep*, 9(1), 14422. doi: 10.1038/s41598-019-50772-2

- Vannucci, S. J. (1994). Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem*, *62*(1), 240-246. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62010240.x
- Vannucci, S. J., Maher, F., & Simpson, I. A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, *21*(1), 2-21.
- Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischbarg, J., & Golde, D. W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*, *364*(6432), 79-82. doi: 10.1038/364079a0
- von Bohlen Und Halbach, O., & von Bohlen Und Halbach, V. (2018). BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res*, *373*(3), 729-741. doi: 10.1007/s00441-017-2782-x
- Wilson, C., & Gonzalez-Billault, C. (2015). Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Front Cell Neurosci*, *9*, 381. doi: 10.3389/fncel.2015.00381
- Wu, H., Wu, Y., Ai, Z., Yang, L., Gao, Y., Du, J., . . . Zhang, Y. (2014). Vitamin C enhances Nanog expression via activation of the JAK/STAT signaling pathway. *Stem Cells*, *32*(1), 166-176. doi: 10.1002/stem.1523
- Wulansari, N., Kim, E. H., Sulistio, Y. A., Rhee, Y. H., Song, J. J., & Lee, S. H. (2017). Vitamin C-Induced Epigenetic Modifications in Donor NSCs Establish Midbrain Marker Expressions Critical for Cell-Based Therapy in Parkinson's Disease. *Stem Cell Reports*, *9*(4), 1192-1206. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.017
- Yan, J., Studer, L., & McKay, R. D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem*, *76*(1), 307-311.

- Yang, J., Ruchti, E., Petit, J. M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(33), 12228-12233. doi: 10.1073/pnas.1322912111
- Yun, J., Mullarky, E., Lu, C., Bosch, K. N., Kavalier, A., Rivera, K., . . . Cantley, L. C. (2015). Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*, *350*(6266), 1391-1396. doi: 10.1126/science.aaa5004
- Zhang, W., Liu, Y., Chen, X., & Bergmeier, S. C. (2010). Novel inhibitors of basal glucose transport as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett*, *20*(7), 2191-2194. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.02.027

