



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia  
Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

**EFFECTO DE LA VITAMINA C EN CÉLULAS  
ENDOTELIALES MICROVASCULARES DE CEREBRO  
HUMANO EN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN *IN*  
*VITRO*.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica clínica e inmunología

**POR SOLANGE PILAR ARRIAGADA CANCINO**

CONCEPCIÓN, CHILE

JUNIO DEL 2023

Profesor Guía: Coralia Rivas Rocco

Co-guía: Eveling Inostroza Pérez

Departamento de Fisiopatología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

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

Profesor Guía

---

Dra. Coralía Rivas R.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Co-Guía

Comisión evaluadora:



---

Dra. Eveling Inostroza P.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Enrique Guzmán.  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

---

Dra. Mafalda Maldonado.  
Evaluador Externo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Claudio Aguayo.  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	iii
TABLA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIACIONES.....	vii
RESUMEN .....	xi
SUMMARY .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Barrera hematoencefálica. ....	1
1.2. Células endoteliales.....	4
1.3. Proteínas de uniones estrechas.....	4
1.4. Disfunción endotelial y pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica. ....	5
1.5. Accidente cerebrovascular.....	7
1.6. Isquemia y reperfusión en el cerebro. ....	8
1.7. Estrés oxidativo en isquemia y reperfusión.....	10
1.7.1. Hipoxia. ....	10
1.7.2. Reoxigenación.....	12
1.8. Antioxidantes. ....	15
1.9. Vitamina C. ....	15
1.10. Transportadores de ácido ascórbico (SVCTs). ....	19
1.11. Antecedentes de terapias con vitamina C.....	20
2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVO GENERAL.....	26
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	26
6. MATERIALES Y METODOS .....	27
6.1. Cultivo Celular.....	27

6.2. Modelo de isquemia y reperfusión.....	27
6.3. Estandarización de Cloruro de Cobalto.....	28
6.4. Tratamiento de Ácido Ascórbico.....	28
6.5. Evaluación de Viabilidad.....	28
6.5.1. Ensayo de exclusión con azul de tripán.....	29
6.5.2. Ensayo MTT.....	29
6.6. Extracción de Proteínas.....	29
6.7. Western Blot.....	30
6.8. Inmunofluorescencia.....	30
6.9. RT-qPCR.....	31
6.10. Citometría de flujo.....	32
6.11. Análisis Estadísticos.....	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1. Establecer un modelo de isquemia y reperfusión in vitro con línea celular HBMEC.....	33
7.1.2. Detección de la proteína ZO-1 en HBMEC.....	35
7.1.3. Estandarización del cloruro de cobalto en HBMEC.....	38
7.1.4. Efecto de hipoxia en HBMEC.....	40
7.1.5. Expresión de HIF1- $\alpha$ en modelo de HBMEC sometidas a isquemia y reperfusión.....	42
7.1.6. Disfunción endotelial posterior a isquemia y reperfusión.....	45
7.2.1. Expresión de transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1 posterior a isquemia y reperfusión en HBMEC postconfluentes.....	47
7.2.2. Expresión del transportador de vitamina C SVCT1 posterior a isquemia y reperfusión en HBMEC postconfluentes.....	49
7.2.3. Expresión relativa del ARNm de los transportadores de vitamina C posterior a isquemia y reperfusión.....	51
7.2.4. Efecto de la isquemia y reperfusión sobre los niveles de la muerte celular y los niveles de ROS.....	53

7.2.5. Efecto de la vitamina C sobre los niveles de muerte celular y los niveles de ROS posterior a una isquemia y reperfusión. ....	55
8. DISCUSIÓN .....	59
9. BIBLIOGRAFÍA .....	72



## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la unidad neurovascular y las proteínas de uniones estrechas.....	3
Figura 2. Transportadores de vitamina C .....	18
Figura 3. Proliferación y viabilidad de células HBMEC. ....	34
Figura 4. Expresión de proteínas de uniones estrechas en HBMEC diferenciadas. ....	36
Figura 5. Efecto del cloruro de cobalto en la viabilidad de HBMEC. ....	39
Figura 6. Efecto del tratamiento con distintos tiempos de hipoxia sobre las células HBMEC. ....	41
Figura 7. Expresión de proteína HIF1-a post isquemia y reperfusión. ....	44
Figura 8. Disminucion de la expresion de la proteína de uniones estrechas ZO-1 post isquemia y reperfusión.....	46
Figura 9. Efecto de la isquemia y reperfusión en la expresión de los transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1 en HBMEC postconfluentes.....	48
Figura 10. Efecto de la isquemia y reperfusión en la expresión del tranportador de vitamina C SVCT1 en HBMEC postconfluentes.....	50
Figura 11. Expresión relativa del ARNm de los transportadores de vitamina C en HBMEC post isquemia y reperfusión. ....	52
Figura 12. Efecto de isquemia y reperfusión sobre la muerte celular y los niveles de ROS en HBMEC postconfluentes. ....	54
Figura 13. Efecto de tratamiento con Vitamina C sobre la muerte celular y niveles de ROS de HBMEC postconfluentes sometidas a isquemia y reperfusión. ....	57
Figura 14. Modelo propuesto del efecto de la isquemia y reperfusión sobre modelo de BHE <i>in vitro</i> y sus transportadores de vitamina C.....	71

## LISTA DE ABREVIACIONES

AA: ácido ascórbico

ACV: accidente cerebrovascular

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosina trifosfato

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: albúmina de suero bovino

CE: células endoteliales

CEMC: células endoteliales microvasculares de cerebro

Cm<sup>2</sup>: centímetros cuadrados

CO: cloruro de cobalto

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

CoCl<sub>2</sub>: cloruro de cobalto

DHA: ácido dehidroascórbico

DIV: días *in vitro*

FIH: factor inhibidor HIF

GLUT: transportador de glucosa

GULO: enzima gulonolactona oxidasa

HBMEC: células endoteliales microvasculares de cerebro humano



HBMECi: células endoteliales microvasculares de cerebro humano indiferenciadas

HDAC1: Histona deacetilasa 1

HIF1- $\alpha$ : factor inducido por hipoxia uno alfa

HRE: elementos de respuesta a la hipoxia

Hx: hipoxia

Isq-R: isquemia y reperfusión

kDa: kilo dalton

Km: constante de Michaelis

LD<sub>50</sub>: Dosis letal media

mg: milígramo

mL: mililitro

mM: milimolar

min: minuto

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nm: nanómetro

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

ns: diferencia no significativa

NVU: unidad neurovascular

Nx: normoxia





O<sub>2</sub>: oxígeno molecular

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: super óxido anión

OMS: organización mundial de la salud

PHD: prolil-4-hidroxilasa

PFA: paraformaldehído

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute

s: diferencia significativa

SNC: sistema nervioso central

SVCT: transportador de ácido ascórbico dependiente de sodio

TJ: uniones estrechas

TJP: proteínas de uniones estrechas

Tris: trisaminometano

tto: tratamiento

TX: tritón

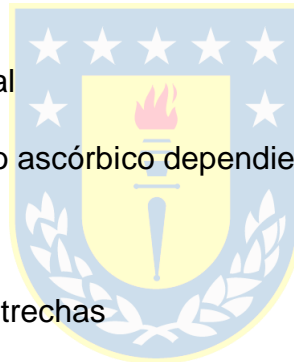
µg: microgramo

µM: micromolar

XDH: xantina deshidrogenasa

XO: xantina oxidasa

XOR: xantina oxidorreductasa



ZO: zónula ocluyente

° C: grados Celsius



## RESUMEN

Los Accidentes cerebrovasculares (ACV) son la segunda causa de muerte en Chile, donde el 60% de los casos es de tipo isquémico. En estos se genera una reducción de nutrientes y oxígeno en la zona afectada del cerebro, lo cual desencadena un desbalance redox con un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan daño y muerte celular. Dentro de las células afectadas están las células endoteliales (CE), las cuales son las encargadas proteger la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que su muerte facilita la destrucción y pérdida de funcionalidad de la BHE. Para regular el desbalance redox existen los antioxidantes como la vitamina C (VitC), que está presente en el organismo en su forma oxidada (ácido dehidroascórbico; DHA) y reducida (ácido ascórbico; AA). Siendo el AA un potente reductor capaz de neutralizar radicales libres. Ambas formas de la VitC ingresan a la célula por distintos transportadores, los GLUTs por el DHA y los SVCTs por el AA. Existe evidencia de que los transportadores SVCT2 aumentan su expresión en procesos isquémicos en células de endotelio cerebral de ratón, pero esto aún no ha sido estudiado en células de endotelio cerebral humano.

En el presente estudio implementamos un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica utilizando células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC), que al diferenciarlas expresan proteínas de uniones estrechas (TJP) al igual que una BHE, evaluamos las TJP con la expresión de la proteína ZO-1 mediante inmunofluorescencia. Establecimos un modelo *in vitro* de isquemia y reperfusión (Isq-R), evaluando por MTT sus efectos sobre la viabilidad celular, por westernblot la expresión de HIF1- $\alpha$  y por inmunofluorescencia la disminución de la expresión de la proteína ZO-1. Evaluamos la expresión de los transportadores de VitC posterior a una Isq-R mediante RT-qPCR e inmunofluorescencia. Además, analizamos mediante

citometria de flujo el aumento de los niveles de ROS posterior a la Isq-R y el efecto del tratamiento con VitC sobre estos niveles.

Nuestros resultados muestran que el modelo de Isq-R *in vitro* es capaz de generar daño endotelial en nuestro modelo de BHE. Además, encontramos que posterior a una Isq-R hay una disminución en la expresión de los transportadores GLUT1 y SVCT2, mientras que SVCT1 aumenta su expresión. También, encontramos niveles de ROS elevados posterior a una Isq-R, los cuales disminuyen luego de 24 horas de reperfusión. Observamos una tendencia en la disminución de los niveles de ROS, donde el tratamiento con AA generó niveles menores de ROS con respecto a la condición sin tratamiento. Estos resultados permiten dilucidar el importante rol que cumplen los antioxidantes sobre el daño oxidativo, y en concreto la gran relevancia que toma la VitC junto a sus transportadores en la BHE bajo un estado de Isq-R, el cual se asemeja a la condición que se genera a nivel cerebral en un ACV. Destacamos el hallazgo del aumento de expresión del transportador SVCT1, el cual podría estar cumpliendo un rol crucial en este tipo de patologías.

Aún faltan muchas aristas por estudiar, pero con los resultados obtenidos posiblemente estamos ante un futuro blanco terapéutico para disminuir el daño que se genera en el ACV y otras patologías que aún no posee un tratamiento efectivo.

## SUMMARY

Stroke is the second leading cause of death in Chile, where 60% of cases are ischemic. In these cases, a reduction of nutrients and oxygen occurs in the affected area of the brain, triggering a redox imbalance with an increase in reactive oxygen species (ROS) levels that generate cellular damage and death. Among the affected cells are endothelial cells (EC), which are responsible for protecting the integrity of the blood-brain barrier (BBB). Therefore, their death facilitates the destruction and loss of BBB functionality. Antioxidants such as vitamin C (VitC) are available to regulate the redox imbalance. VitC exists in the body in its oxidized form (dehydroascorbic acid; DHA) and reduced form (ascorbic acid; AA). AA is a potent reductant capable of neutralizing free radicals. Both forms of VitC enter the cell through different transporters: DHA enters through GLUTs, and AA through SVCTs. There is evidence that SVCT2 transporters increase their expression in ischemic processes in mouse cerebral endothelial cells, but this has not yet been studied in human cerebral endothelial cells.

In this study, we implemented an in vitro model of the blood-brain barrier using human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), which, upon differentiation, express BBB-like tight junction proteins (TJPs). We evaluated the TJPs through ZO-1 protein expression using immunofluorescence. We established an in vitro model of ischemia and reperfusion and evaluated its effects on cell viability through the MTT assay, the expression of HIF1- $\alpha$  through western blot, and the decrease in ZO-1 protein expression through immunofluorescence. Subsequently, we assessed the expression of VitC transporters after ischemia and reperfusion using RT-qPCR and immunofluorescence. Additionally, we analyzed the increased levels of ROS after ischemia and reperfusion and the effect of VitC treatment on these levels using flow cytometry.

Our results demonstrate that the in vitro ischemia and reperfusion model is capable of generating endothelial damage in our BBB model. We also found a decrease in the expression of GLUT1 and SVCT2 transporters after ischemia and reperfusion, while SVCT1 showed increased expression. Furthermore, we observed elevated levels of ROS after ischemia and reperfusion, which decreased after 24 hours of reperfusion. There was a trend towards decreased ROS levels, and AA treatment generated lower ROS levels compared to the untreated condition.

These results shed light on the important role of antioxidants in oxidative damage, particularly emphasizing the relevance of VitC and its transporters in the BBB under an ischemia and reperfusion state that resembles the conditions occurring in a stroke. We highlight the finding of increased SVCT1 transporter expression, which may play a crucial role in such pathologies.

While there are still many aspects to be studied, the obtained results potentially open up therapeutic opportunities to mitigate the damage caused by stroke and other conditions that currently lack effective treatments.

# 1. INTRODUCCIÓN

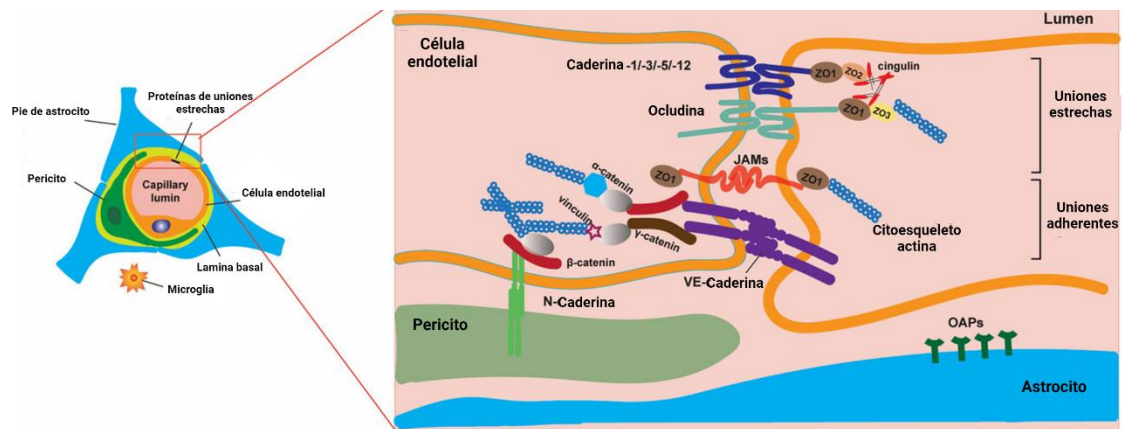
## 1.1. Barrera hematoencefálica.

Dentro de las barreras biológicas del cerebro existe la barrera hematoencefálica (BHE), la cual está presente en todos los organismos con un sistema nervioso central (SNC) bien desarrollado (Abbott, 2005). La BHE es una estructura celular y bioquímica que forma una interfaz altamente selectiva entre la sangre y el cerebro, desempeñando un papel esencial en el mantenimiento de un entorno óptimo para el funcionamiento y la homeostasis del SNC (Knox et al., 2022).

La función de la BHE surge de una asociación de células cerebrales, la cual se denomina unidad neurovascular (NVU, por su sigla en inglés), está compuesta por las células endoteliales (CE) del cerebro, las células murales (pericitos y células del músculo liso vascular), astrocitos, neuronas, microglía y una membrana basal (Iadecola, 2017; Serlin et al., 2015) (**Figura 1**). Una de las características estructurales más relevantes de la BHE son las uniones estrechas (TJ, por su sigla en inglés) entre las células endoteliales del cerebro, que sellan el espacio paracelular formando una barrera continua (Wong et al., 2013), mientras que la membrana basal, los astrocitos y los pericitos rodean a las células endoteliales (Dong, 2018). De esta forma, las células endoteliales recubiertas en el lado luminal por glucocálix y en el lado basal por la membrana basal, conforman los vasos sanguíneos continuos no fenestrados que regulan estrechamente el movimiento de moléculas, iones y células entre la sangre y el SNC (Daneman, 2012; Jin et al., 2021; Zlokovic, 2008). A través de este endotelio, hay una difusión libre y rápida de oxígeno desde la sangre al cerebro y una difusión de dióxido de carbono en la dirección opuesta, lo cual es esencial para el metabolismo cerebral normal y la regulación del pH en el fluido intersticial del cerebro y las células que conforman la NVU (Kadry et al., 2020).

Las moléculas lipofílicas pequeñas (< 400 Da) que forman menos de 8 enlaces de hidrógeno también pueden cruzar la BHE (Pardridge, 2015), mientras que la glucosa, los aminoácidos y otros nutrientes ingresan al cerebro a través de transporte facilitado a través de transportadores. La captación de moléculas más grandes como la insulina, la leptina y la transferrina de hierro se facilita a través de la endocitosis mediada por receptores (Pardridge et al., 1985; Zhang & Pardridge, 2001), Sin embargo, las células endoteliales que conforman los vasos presentan una baja tasa de tráfico de vesículas, por lo que la transcitosis es limitada (Ayloo & Gu, 2019). Estas características, permiten que la BHE posea baja permeabilidad paracelular y sea altamente restrictiva con el paso de sustancias que puedan ser nocivas para el cerebro, protegiendo así de toxinas, patógenos, inflamación y lesiones (Kadry et al., 2020; Van Itallie & Anderson, 2006). En diversos estudios se ha concluido que la alteración de alguna de sus propiedades de barrera protectora o la pérdida de su integridad generan disfunción en la BHE, desencadenando la alteración de la homeostasis y la desregulación en la entrada y salida de moléculas y células al SNC, que finalmente genera daño y degeneración neuronal (Daneman & Prat, 2015; Feng et al., 2023; Rodrigo et al., 2013).





**Figura 1. Esquema de la unidad neurovascular y las proteínas de uniones estrechas.**

Asociación de células cerebrales y organización molecular de proteínas de uniones estrechas (TJP, por su sigla en inglés) (modificado de Kadry et al., 2020). La asociación entre el pie de astrocitos, pericitos, microglías, lamina basal y células endoteliales (CE) es denominada unidad neurovascular. Las CE son capaces de formar la BHE gracias a las uniones estrechas u ocluyentes, que están conformadas por TJP. Estas proteínas son: ocludina, caderina-1/-3/-5/-12, claudina, zónula ocluyente -1/-2, entre otras.

## **1.2. Células endoteliales.**

Las CE son células de epitelio plano simple que se pliegan sobre sí mismo formando los vasos y microvasos del organismo (Aird, 2007a, 2007b), en el cerebro las CE cumplen el rol de formar el endotelio cerebrovascular, el cual es un tejido extremadamente activo responsable de regular el tráfico de células, sustratos y otras moléculas a través de la BHE. Además, es responsable de controlar el tono vasomotor y mantener la homeostasis en la interfaz sangrepared vascular. Las células endoteliales microvasculares del cerebro (CMEC, por su sigla en inglés) que componen la microvasculatura de la BHE, se caracterizan por expresar TJP interendoteliales, tener baja presencia de caveolas en la superficie luminal y poseer un alto número de mitocondrias (Kadry et al., 2020) en comparación con las CE de otros distritos vasculares. Las CMEC son capaces de regular el transporte paracelular a través las TJP (Wong et al., 2013), las cuales sellan las vías paracelulares entre las CE adyacentes y proporcionan una protección alrededor de la célula, separando su porción luminal de la región basolateral (Liebner et al., 2011). Por lo tanto, las TJP evitan el transporte paracelular y restringen severamente el transporte de la mayoría de las moléculas y de iones pequeños que puedan dañar de alguna manera al cerebro (Van Itallie & Anderson, 2006). Esto genera que la mayor parte del tráfico molecular entre el sistema vascular y el cerebro sea por el transporte transcelular (Wong et al., 2013).

## **1.3. Proteínas de uniones estrechas.**

Como se mencionó antes, las uniones estrechas, también llamadas uniones ocluyentes, están conformadas por las TJP. En la BHE, las TJP se encuentran entre las CMEC y cumplen la función de restringir en gran medida el transporte paracelular y transcelular, lo que genera una barrera con baja permeabilidad (Dolman et al., 2005). Es por esto, que la expresión y funcionalidad de las TJP

se utiliza como una medida de la integridad de la BHE (Abbott et al., 2006; Kandel et al., 2000).

Las uniones estrechas u ocluyentes son un complejo que consta de tres proteínas transmembrana (claudina, ocludina y moléculas de uniones adherentes (JAM, por su sigla en inglés)) y varias proteínas accesorias citoplasmáticas (zónula ocluyente (ZO) -1, -2, -3, entre otras), que se unen a las proteínas del citoesqueleto de actina (**Figura 1**). Estas proteínas en conjunto son indispensables para mantener la integridad de la BHE (C. Li et al., 2021). La claudina, específicamente la claudina-5, es considerada el componente primario de sellado de las uniones estrechas (Abbott et al., 2006; Kandel et al., 2000), contribuyendo a reducir el movimiento de iones paracelulares y ayudando a estrechar la hendidura paracelular (Eisenblätter & Galla, 2002). La ocludina está presente en los filamentos de las uniones estrechas y ayuda a regular las propiedades de adhesión entre las células, además de interactuar con las proteínas de andamiaje intracelulares y el citoesqueleto de actina (Kandel et al., 2000). Las ZO son proteínas asociadas periféricamente que interactúan con claudinas, ocludinas y JAM para anclar las proteínas de membrana y unir las al citoesqueleto de actina (Abbott et al., 2006; Agarwal et al., 2011). Como la alteración de las TJP genera disfunción endotelial y pérdida de la integridad de la BHE (Bolton et al., 1998), a lo largo de los años los estudios han asociado la alteración local de estas con patologías del sistema nervioso central (Bronger et al., 2005; Correale & Villa, 2007; Desai et al., 2007; Kaur & Ling, 2008; Remy & Beck, 2006).

#### **1.4. Disfunción endotelial y pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica.**

La BHE es relativamente impermeable, pero en condiciones patológicas se ve afectada por la liberación de agentes vasoactivos, citoquinas y mediadores químicos que aumentan su permeabilidad. Varios de estos agentes son

liberados por el propio endotelio, como por ejemplo la endotelina que tiene un efecto autocrino sobre el mismo endotelio, actuando sobre los receptores de endotelina A de las CE (Kadry et al., 2020). Además, el endotelio es el principal lugar para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) (Fraser, 2011), de esta forma median el estrés oxidativo y contribuyen a la disrupción y destrucción de la BHE (C. Li et al., 2021). Es por esto que la disfunción endotelial se considera una característica patológica de la destrucción de la BHE (Blanchette & Daneman, 2015).

La disfunción de la BHE se ha reportado en muchas condiciones patológicas del SNC, como la esclerosis múltiple (Correale & Villa, 2007), epilepsia (Remy & Beck, 2006), tumores cerebrales (Bronger et al., 2005), enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Desai et al., 2007) y agresiones hipóxicas e isquémicas (Kaur & Ling, 2008). Esta disfunción de barrera puede variar desde cambios leves y transitorios en la permeabilidad de la BHE con la apertura de la unión estrecha, hasta la ruptura crónica de la barrera, donde también pueden ocurrir cambios en los sistemas de transporte y de las enzimas. Esto genera la activación microglial y la infiltración de diferentes componentes plasmáticos y células inmunitarias en el parénquima cerebral que causan finalmente una alteración de la homeostasis del SNC y un daño variable en el cerebro circundante (Blanchette & Daneman, 2015).

Aún no es posible determinar en todos los casos si la pérdida de la integridad de la BHE es la causa del inicio de la enfermedad o si es el resultado de la progresión de la enfermedad neurológica. Sin embargo, está demostrado que la alteración de la barrera contribuye y exagera la patología en desarrollo (Daneman, 2012; Jin et al., 2021; Persidsky et al., 2006; Zlokovic, 2008).

### **1.5. Accidente cerebrovascular.**

Los accidentes cerebro vasculares (ACV) afectan a 15 millones de personas en el mundo anualmente. De estos un tercio fallece y otro tercio queda con secuelas permanentes según reportes de la organización mundial de salud (OMS). En Chile, el ACV es la segunda causa de muerte con 29.542 egresos hospitalarios en el año 2021 (MINSAL), lo que significa 81 casos por día y se calcula que de estos casos fallece una persona cada 72 minutos. Además, es la segunda causa de muertes prematuras, con 2.310 defunciones en el 2013 en personas entre 30 y 69 años, y la primera causa específica de años de vida saludables perdidos por discapacidad y muerte prematura en mayores de 74 años. Por lo tanto, es responsable de más de un 15% del total de muertes y discapacidad en el país (Labbé Atenas et al., 2018). Por todo lo anterior, el ACV se constituye como un problema crítico de Salud Pública (MINSAL, 2014)

Los ACV se generan cuando el flujo de sangre de una zona del cerebro disminuye o se detiene, ocasionando la disminución de nutrientes y oxígeno (hipoxia) en la región afectada. Dependiendo del tiempo que se mantenga esta afección se puede generar un daño permanente en las células cerebrales ocasionando las secuelas y la muerte de pacientes. Los ACV se clasifican en hemorrágicos e isquémicos, el primero es menos frecuentes y se ocasiona por la ruptura de un vaso sanguíneo del cerebro que origina un derrame (derrame cerebral). Mientras que el segundo representa el 65% de los ACV que ocurren en Chile (MINSAL, 2013), y son provocados por la oclusión de una arteria cerebral (Rahme et al., 2012) en la cual un ateroma o un trombo obstaculiza el paso de la sangre generando una inmediata reducción del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente (isquemia focal). Esta reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el sector afectado (Arango-Dávila & Pimienta, 2004), y puede cambiar en minutos u horas generando un estado de isquemia e hipoxia en las células cerebrales de la zona afectada. El impacto de la isquemia

cerebral depende de la gravedad y la duración de la reducción del flujo sanguíneo, por consiguiente, una isquemia poco grave pero prolongada produce cambios equivalentes a una isquemia corta y grave (Mies et al., 1991). Posterior a este estado de isquemia, ocurre la reoxigenación o reperfusión, en donde se crea un desequilibrio entre la tasa de generación de ROS y la capacidad del tejido para desintoxicar estas especies reactivas, generando así más daño en el tejido afectado (Guarnieri et al., 1980).

Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para tratar el daño y las secuelas en los pacientes que padecen esta patología aguda, sin embargo, todos concuerdan en que la protección de la NVU es un componente esencial de la terapia de un ACV. El endotelio cerebral es el primero en verse enfrentado al daño que genera una isquemia y reperfusión (Isq-R), las principales afectadas son las CE que conforman la red vascular (Xiang et al., 2018). Algunos estudios han apuntado a que las CE pueden jugar un rol importante en la fisiopatología de la isquemia cerebral (Wang et al., 2018) y han determinado que tratar específicamente el endotelio cerebral no solo puede mejorar la disfunción endotelial sino también reducir la lesión parenquimatosa (Ridder et al., 2015; Shi et al., 2017; Yang et al., 2019) y de esta forma reducir el daño que ocasiona esta patología.

### **1.6. Isquemia y reperfusión en el cerebro.**

La isquemia se define como la disminución del flujo sanguíneo en una zona afectada, donde se genera una disminución de nutrientes y oxígeno, mientras que la reperfusión o también llamada reoxigenación vascular, es el restablecimiento de la circulación que propicia la llegada de sangre y nutrientes. Ambas ocurren en el ACV, ocasionando una desregulación en el cerebro y la activación de distintos mecanismos en respuesta al daño generado (Soares et al., 2019). En los primeros minutos de la isquemia, la reducción del flujo sanguíneo cerebral desencadena una serie de eventos bioquímicos que causan

disfunción metabólica, como la reducción de la formación de ATP, falla de la bomba de Na-K-ATPasa, disminución en el pH del tejido, despolarización de la membrana, entrada de calcio a través de la activación de canales de calcio operados por voltaje y liberación excesiva de aminoácidos excitadores (glutamato) (Wahlgren & Ahmed, 2003). Al pasar un mayor tiempo de isquemia, la activación de los receptores de glutamato conduce a un aumento adicional del calcio intracelular, la activación de enzimas intracelulares como la fosfolipasa, la óxido nítrico sintasa, la proteasa, la endonucleasa y la oxidasa. El tejido cerebral isquémico sigue una serie de eventos secundarios que incluyen alteraciones vasculares, celulares y moleculares, donde la respuesta vascular a la isquemia activa a las CE y regula al alza los leucocitos circulantes (Huang et al., 2006). Además de las moléculas de adhesión, que incluye a las selectinas E- (superficie endotelial), P- (superficie plaquetaria), L- (superficie leucocitaria), ICAM-1 e integrinas (Zhang et al., 1998). Los leucocitos pueden viajar a través de las CE al cerebro al interactuar con estas moléculas de adhesión y secretar citoquinas proinflamatorias en el cerebro (Feuerstein et al., 1994; Zhang et al., 2000). La respuesta inflamatoria aguda después de un ACV conduce a interacciones entre plaquetas, leucocitos, linfocitos y células endoteliales que son finalmente las responsables tanto de la lesión de la BHE como de la infiltración de células inmunitarias en el parénquima cerebral (Zhang et al., 1998).

En la reperfusión, se reestablece el flujo sanguíneo, esto ocurre de forma turbulenta, por lo que produce estrés mecánico en el endotelio y genera daño en las CE. Además, la reoxigenación genera alteraciones a nivel enzimático que aumentan la producción de ROS, favoreciendo el estrés oxidativo.

Por lo tanto, la Isq-R cerebral es la responsable de las alteraciones que favorecen la disfunción de la BHE, la fuga de moléculas y células hacia el

cerebro, aumento del estrés oxidativo e inflamación, causando edema y daño cerebral (Jung et al., 2010).

### **1.7. Estrés oxidativo en isquemia y reperfusión.**

En un ACV existen muchos mecanismos que producen un aumento en los niveles de ROS, que al estar en concentraciones elevadas causan estrés oxidativo (McGarry et al., 2018), hay un desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes. Un ambiente celular prooxidante genera daño oxidativo (Saeed et al., 2007), ocurre oxidación de moléculas biológicas, incluidas el ADN, los lípidos celulares y las proteínas (McGarry et al., 2018), dando como consecuencia una función celular deteriorada y una viabilidad celular disminuida (Apostolova & Victor, 2015; Kidwell et al., 2000; Li et al., 2000; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Como son muchos los mecanismos de producción de ROS, mencionaremos los dos principales factores que favorecen el daño oxidativo en esta patología, la hipoxia y la reoxigenación.

#### **1.7.1. Hipoxia.**

La isquemia cerebral genera hipoxia a nivel celular, la cual se define como una disminución transitoria o permanente en el suministro de oxígeno a un nivel insuficiente para mantener la función celular en una zona determinada del organismo (McGarry et al., 2018; Saeed et al., 2007), en consecuencia, se puede producir daño tisular en la zona afectada (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009).

Las células, en respuesta a la baja oxigenación tisular activan los factores inducidos por hipoxia (HIF) para mejorar la transcripción de diversos genes, algunos de estos implicados en la glucólisis, la angiogénesis y la supervivencia celular, lo que promueve la defensa contra el estrés por hipoxia (Kaelin &



Ratcliffe, 2008). HIF es un complejo heterodimérico que se compone de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , estos en presencia de oxígeno o normoxia no son capaces de formar el complejo debido a las proteínas dependientes de oxígeno prolin-4-hidroxilasa (PHD) y factor inhibidor de HIF (FIH), que hidroxilan la subunidad  $\alpha$  en residuos de prolina y asparagina (Alizadeh et al., 2018). La hidroxilación por parte de la PHD da como resultado el reclutamiento de la ubiquitina ligasa de la proteína E3 de von Hippel-Lindau y la degradación proteosómica inmediata de HIF-1 $\alpha$  y -2 $\alpha$  (Epstein et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Durante la hipoxia la oxigenación disminuye, las proteínas PHD y FIH son menos activas, generando HIF- $\alpha$  hipohidroxilado, que se acumula y transloca al núcleo para formar el complejo HIF por dimerización con HIF-1 $\beta$ . Posteriormente, HIF recluta a su coactivador p300/CBP y se une específicamente a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE, por su sigla en inglés), HIF cumple su rol como factor de transcripción de una gran cantidad de genes dependientes de HIF (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009; Davis et al., 2018; Lando et al., 2002). Dentro de las proteínas que se han descrito que están relacionadas con HIF, se encuentra el factor de crecimiento endotelial (VEGF-A), transportadores de glucosa (GLUTs) y BCL2/BNIP3, relacionadas con la angiogénesis, glicolisis y apoptosis, respectivamente.

El aumento de ROS en la condición de hipoxia ocurre en las mitocondrias de las células que están generando energía por fosforilación oxidativa. Las mitocondrias generan ROS durante el curso de la fosforilación oxidativa normal, el rápido movimiento de electrones a través de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna puede resultar en la fuga de electrones que pueden formar  $O_2^-$  a través de la reducción univalente de  $O_2$  (Dröse & Brandt, 2012; Zorov et al., 2014). En condiciones normales, todos los complejos de la cadena transportadora de electrones tienen los componentes redox necesarios para generar ROS, siendo los complejos I y III las principales

fuentes en condiciones normales (Brown et al., 2010; Nickel et al., 2014). Durante la hipoxia, las mitocondrias cambian la oxidación de sustratos relacionados con NAD (complejo I) a oxidación de succinato (complejo II) (Lukyanova et al., 2018), generando ROS cuando el complejo I / III se inhibe o las concentraciones de succinato son bajas (Quinlan et al., 2012). Este aumento descontrolado de ROS también genera la inactivación de PHD, favoreciendo aún más la estabilización de HIF-1 $\alpha$  (Hamanaka & Chandel, 2009).

En diversos estudios se ha evaluado el daño que produce la hipoxia en distintas líneas celulares del cerebro, se ha determinado que las CE reaccionan más fuerte y rápidamente a la privación de oxígeno que otras células cerebrales como astrocitos y neuronas (Engelhardt et al., 2015), además reducen significativamente su viabilidad e incrementan la apoptosis (Mata-Greenwood et al., 2017).

### **1.7.2. Reoxigenación.**

La reoxigenación generada por la reperfusión genera una producción excesiva de ROS (Granger & Kvietys, 2015). Por muchas décadas se ha estudiado las posibles fuentes de ROS, se ha determinado que las más probables en contribuir estrés oxidativo inducido por reperfusión son la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa (Nox) (Brennan et al., 2009), las mitocondrias y la óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada. Estas están presentes en la mayoría de los tejidos, y asocia la producción de ROS a la fuente predominante en un tejido, como la xantina oxidasa en el tracto gastrointestinal y las mitocondrias en órganos metabólicamente activos como el corazón y cerebro. Sin embargo, todas contribuyen en la producción de ROS en menor o mayor medida, y posiblemente estas también generan señalización y activación de otras fuentes de producción de ROS

### **1.7.2.1. Xantina oxidorreductasa (XOR).**

Es una molibdoflavoenzima compleja que controla la hidroxilación de la xantina a ácido úrico. En mamíferos existe dos formas interconvertibles de esta enzima, xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO), siendo la XDH la forma predominante en el tejido sano. XDH usa preferentemente  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones, mientras que XO usa  $\text{O}_2$  como aceptor de electrones terminal, por lo que posee la capacidad de generar ROS. XO ha sido ampliamente estudiado como fuente potencial de ROS en tejidos y cultivos celulares expuestos a Isq-R, se han descrito efectos beneficiosos al inhibir la XO en diferentes tejidos post isquémicos. La producción de ROS depende de la expresión y actividad que presenta XOR en cada tejido (Rowe et al., 1984). En el cerebro no se ha mostrado una actividad XOR significativa, sin embargo, los estudios inmunohistoquímicos han determinado niveles elevados de XOR en el endotelio vascular de estos tejidos (Vickers et al., 1998). Por lo cual, este es un posible mecanismo por el cual se genera ROS en una Isq-R cerebral.

### **1.7.2.2. NADPH oxidasa.**

La familia Nox/Duox de NADPH oxidasas también se ha implicado en la producción de ROS en la reperfusión, donde las enzimas Duox y Nox-4 producen predominantemente peróxido de hidrógeno, mientras que las isoenzimas restantes de Nox producen en gran medida superóxido (Brandes et al., 2010). Si bien, los estudios indican que la NADPH oxidasa no es la mayor fuente de ROS en el cerebro (Granger & Kvietys, 2015), las células fagocíticas y CE utilizan la enzima Nox-2 para generar ROS. Y se ha demostrado que las NADPH oxidasas son una fuente importante de ROS en una variedad de condiciones patológicas, incluida la Isq-R (Kahles & Brandes, 2013; Kleikers et al., 2012; Lambeth et al., 2008).

### **1.7.2.3. Mitocondrias.**

Las mitocondrias han sido implicadas como una fuente importante de producción de ROS inducida por Isq-R en una variedad de órganos, especialmente en aquellos que son metabólicamente muy activos como el corazón y el cerebro (Cardoso et al., 2015; Sanderson et al., 2013; Zorov et al., 2014). Como se mencionó antes, durante una isquemia disminuye la reserva de NADPH mitocondrial, esto no se recupera con la reperfusión por lo que sigue aumentada la producción de ROS mitocondrial a causa de la inhibición del complejo I / III (Quinlan et al., 2012).

### **1.7.2.4. Óxido nítrico sintasa (NOS)**

Existen 3 isoformas de NOS reconocidas, NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS) (Förstermann & Sessa, 2012), estas generan óxido nítrico (NO) a través de la oxidación de L-arginina. NOS se puede convertir en una enzima generadora de  $O_2^-$  por un desacoplamiento de esta misma, se reduce el NO celular y aumenta  $O_2^-$  (Alkaitis & Crabtree, 2012). Esta conversión enzimática se ha implicado en la generación de ROS inducida por Isq-R, donde las mayores consecuencias patológicas se han visto en el desacoplamiento de eNOS. Además, el estrés oxidativo genera la oxidación del cofactor  $BH_4$  de NOS a  $BH_2$  (Kietadisorn et al., 2012),  $BH_2$  puede ocupar el sitio de unión de  $BH_4$  en NOS, provocando el desacoplamiento. Es decir, en respuesta al estrés oxidativo NOS puede iniciarse un ciclo de retroalimentación positiva con la producción de  $O_2^-$  generada por su desacoplamiento (Granger & Kvietys, 2015). Algunos estudios han indicado que el  $O_2^-$  generado por la xantina oxidasa (De Pascali et al., 2014) y la NADPH oxidasa (Siu et al., 2015) también está implicado en la oxidación de  $BH_4$ .

## **1.8. Antioxidantes.**

El estrés oxidativo se genera cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida (González-Mangado & Morera Prat, 2001). Como se mencionó antes, el estrés oxidativo generalmente ocurre cuando hay altos niveles de ROS o radicales libres, los cuales son moléculas cuya estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad. Un mecanismo que tiene el organismo para combatir este estrés oxidativo es utilizar moléculas antioxidantes, las cuales son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Flora et al., 2015). Se considera antioxidante a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que otra molécula para interaccionar con un Radical libre o ROS (Mayor Oxilia, 2010). Los antioxidantes pueden ser enzimáticos, donde catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los Radicales libres, o no enzimáticos que actúan directamente colisionando con el radical libre, cediendo un electrón, oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico (Birben et al., 2012). Además, los antioxidantes se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por las células) y exógenos (que ingresan a través de la dieta). Dentro de los exógenos tenemos vitaminas, como la vitamina A, C y E, de las cuales hay evidencia clínico epidemiológica de que hay un beneficios al consumirlas, ya sea dietario o como suplemento (Coronado et al., 2015; Villagrán et al., 2019).

## **1.9. Vitamina C.**

El antioxidante exógeno soluble más abundante en el cuerpo humano es la vitamina C (Tu et al., 2017), el cual es un nutriente esencial en la fisiología y patología humana por su gran efecto antioxidante. Esta vitamina está presente en todos los seres vivos (Mandl et al., 2009; Yang, 2013), la mayoría de los

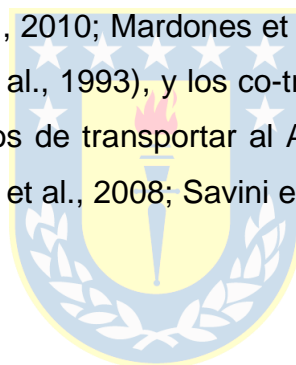
mamíferos pueden sintetizarla a partir de la glucosa a través de la vía hexurónica que termina con la oxidación de la gulonolactona en l-ascorbato por la enzima gulonolactona oxidasa (GULO) (Munoz-Montesino et al., 2021). Sin embargo, los humanos y algunas otras especies han perdido la capacidad de sintetizar esta vitamina debido a varias mutaciones en el gen GULO, lo que provoca el requisito obligatorio de obtener vitamina C de la dieta (Mandl et al., 2009; Yang, 2013). La vitamina C es necesaria en muchos eventos fisiológicos, incluida la homeostasis redox, la síntesis de neuropéptidos y colágeno, la desmetilación de histonas, la desglicanación de proteoglicanos y la regulación del factor de transcripción inducible por hipoxia, en donde actúa como cofactor enzimático de la enzima 2-oxoglutarato y Fe<sup>2+</sup> dependiente de dioxigenasa que favorecerá la activación de PHD (Linowiecka et al., 2020; Munoz-Montesino et al., 2021).

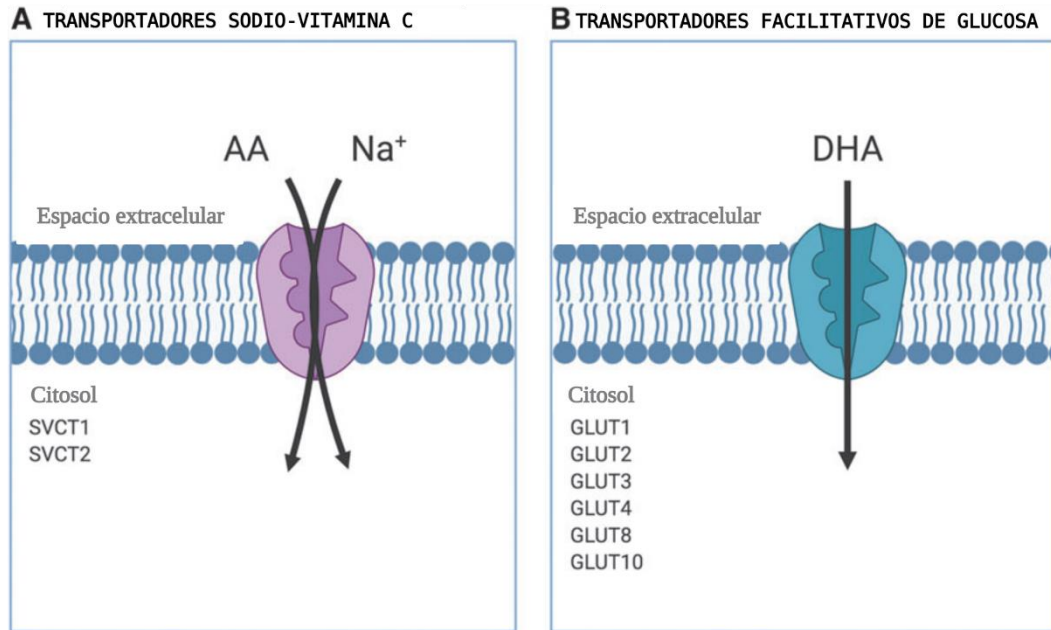
La vitamina C está presente en forma oxidada y reducida, el ácido dehidroascórbico (DHA) y el ácido ascórbico (AA), respectivamente. El DHA presenta una vida media corta de aproximadamente 15 segundos (Rivas et al., 2008), por lo que ingresa a las células y rápidamente es metabolizado a AA por reductasas. El AA es sumamente efectivo contra peróxidos, hidroxilos, peroxinitrilos y súper oxido radicales (Carr & Frei, 1999). Además, posee el beneficio de oxidarse parcialmente, generando ácido semi-dehidroascórbico que es un radical libre que puede tanto aceptar como ceder electrones y oxidarse aún más hasta DHA. Esta propiedad química de oxidación reversible es la que respalda las propiedades biológicas que posee el AA (Villagrán et al., 2019).

En el cuerpo humano el AA posee una concentración en el plasma de 30 a 60  $\mu$ M (Capellmann et al., 1994), y en estudios de suplementación se determinó que los humanos necesitan aproximadamente 60-100 mg de vitamina C al día para mantener estos niveles normales en plasma y tejidos (Levine et al., 2020).

La concentración en los tejidos varía según su requerimiento de AA, incluso hay algunos tejidos donde se puede encontrar 100 veces más concentrado que en el plasma (Rivas et al., 2008). En el cerebro, el AA alcanza concentraciones de hasta 10mM, lo cual se asocia a que es un órgano vulnerable a los aumentos de ROS debido a la baja actividad de las enzimas antioxidantes de las neuronas y las altas concentraciones de lípidos peroxidables, hierro y consumo de oxígeno (Saeed et al., 2007), por lo cual, la vitamina C juega un rol esencial como protector en las células cerebrales.

Para ingresar a la célula, tanto el DHA como el AA utilizan transportadores (**Figura 2**), siendo los transportadores de la familia GLUTs los capaces de transportar el DHA, específicamente las isoformas GLUT 1, 2, 3, 4, 8 y 10 (Corpe et al., 2013; Lee et al., 2010; Mardones et al., 2011; Michels et al., 2013; Rumsey et al., 2000; Vera et al., 1993), y los co-transportadores sodio/AA de la familia SVCTs los encargados de transportar al AA, SVCT1 y SVCT2 (Munoz-Montesino et al., 2021; Rivas et al., 2008; Savini et al., 2008).





**Figura 2. Transportadores de vitamina C**

(Modificado de Muñoz-Montesino et al., 2021). **A)** Los transportadores funcionales de vitamina C reducida (AA) que se han descrito en el cuerpo humano son SVCT1 y SVCT2 (Rivas et al., 2008; Savini et al., 2008). **B)** Mientras que para la vitamina C oxidada (DHA) es captada por 6 de 14 miembros de la familia de transportadores de glucosa, estos son GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 y GLUT10. (Corpe et al., 2013; Lee et al., 2010; Mardones et al., 2011; Michels et al., 2013; Rumsey et al., 2000; Vera et al., 1993)



### **1.10. Transportadores de ácido ascórbico (SVCTs).**

Como se mencionó anteriormente, el AA es transportado por co-transportadores de sodio/ascorbato o SVCTs, estos pertenecen a la familia de transportadores de solutos SLC23 donde se han descrito hasta la fecha dos miembros funcionales, SVCT1 y SVCT2. Los genes que codifican SVCT1 y SVCT2 en humanos son SLC23a1 y SLC23a2 respectivamente, están ubicados en distintos cromosomas y las proteínas que codifican tienen tamaños diferentes, 598 aminoácidos para SVCT1 y 650 aminoácidos para SVCT2 (Munoz-Montesino et al., 2021), poseen una  $K_M$  aparente para el AA de  $100\mu M$  y  $20\mu M$  respectivamente (Godoy et al., 2007). Las proteínas SVCTs se expresan de manera diferencial, SVCT1 es expresada en tejidos epiteliales donde controla la homeostasis del ácido ascórbico en todo el cuerpo, mientras que SVCT2 se expresa más ubicuamente, siendo funcionalmente activo en el cerebro, tejido neuroendocrino, pulmón y otros órganos (Gess et al., 2013; Rivas et al., 2008). Con respecto a la presencia de estos transportadores en el cerebro, varios estudios muestran la expresión de SVCT2 en neuronas, células gliales, células de Schwann y células gliales del sistema nervioso periférico (Gess et al., 2013). Si bien no existe en literatura evidencia de la presencia de los transportadores SVCTs en las CMEC humanas, en nuestro laboratorio se caracterizó mediante PCR tiempo real e inmunofluorescencia la expresión de SVCT1 y SVCT2 en líneas celulares de endotelio cerebral humano (HBMEC) (Guzmán, 2004; Inostroza et al., 2023)(datos no publicados).

En el año 2011 un estudio de Gess y colaboradores determinó que al inducir infarto cerebral a ratones ocluyendo la arteria cerebral media y post reperusión, aumentaban de manera significativa en los días posteriores al infarto la expresión del transportador SVCT2 en CE de cerebro (Gess et al., 2011). Este aumento se intuye esta ocasionado por el aumento de estrés oxidativo que se genera en la Isq-R, en que aumenta la demanda de AA para neutralizar

radicales libres. Además, en el año 2017 Salazar y colaboradores evaluaron SVCT2 en distintas patologías cerebrales, y encontraron un aumento de la expresión de SVCT2 en astrocitos en todas las patologías estudiadas. Este aumento del transportador SVCT2 fue inversamente proporcional con los niveles plasmáticos de AA, indicando que esta disminución plasmática se debe a la entrada de AA por medio de los transportadores al cerebro para disminuir el daño oxidativo que está ocurriendo a nivel cerebral (Salazar et al., 2018).

Todos estos resultados apuntan a que en condiciones patológicas existe un aumento de uno de los transportadores SVCTs con el fin de compensar el daño oxidativo generado. Como se mencionó antes, en un ACV se genera daño y muerte en las células que componen la NVU ocasionado por los altos niveles de ROS que genera la Isq-R, una de las principales afectadas son las CE que conforman la red vascular (Xiang et al., 2018). Por lo que nace la inquietud de saber si al igual que en las otras líneas celulares, las HBMEC puedan compensar el daño aumentando SVCTs.

### **1.11. Antecedentes de terapias con vitamina C.**

A lo largo de las décadas, se ha analizado el efecto de la vitamina C en diversas patologías relacionadas con el estrés oxidativo, patologías tanto crónicas como agudas. Se ha determinado que el impacto moderado que genera la vitamina C es debido a su biodisponibilidad oral limitada y su rápida eliminación (Chang et al., 2020). Debido esto, los estudios han apuntado a tratamientos parenterales, para lograr las concentraciones necesarias en sangre para generar algún efecto significativo en los pacientes. Sin embargo, esto aún sigue siendo un tema controversial debido a los diversos resultados que se reportan sobre los efectos que la vitamina C estaría ejerciendo en cada enfermedad, donde algunos afirman efectos benéficos y otros efectos dañinos.

Centrándonos en las patologías que afectan al cerebro y a la BHE, existen estudios clínicos retrospectivos de caso control de pacientes con ACV, donde al administrarles 1000 mg diarios no observaron efectos significativos entre los pacientes tratados y no tratados (Rabadi & Kristal, 2007). Por otro lado, un meta-análisis del 2013 determinó que existen relaciones inversas significativas entre la ingesta dietética de vitamina C, la vitamina C circulante y el riesgo de ACV (Chen et al., 2013). También, un estudio de Chang y colaboradores del 2016 afirma que las dosis supra fisiológicas de AA pueden tener un uso terapéutico en cuidados intensivos (Chang et al., 2016). En estudios clínicos más recientes, se ha demostrado que la vitamina C mejora la supervivencia de pacientes con traumatismo craneoencefálico (Macías Limón et al., 2021).

En estudios preclínicos, Dhar-Mascareño y colaboradores en el año 2005, concluyó que la vitamina C previene la hipoxia y el daño inducido por esta en el endotelio humano, los resultados indicaron que el AA intracelular protege a las CE de la apoptosis inducida por hipoxia y reperfusión, al prevenir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de las caspasas 3 y 9, además de anular el aumento de ROS (Dhar-Mascareño et al., 2005). Mientras que Ferrada y colaboradores en el año 2020, encontraron que el tratamiento *in vitro* con 200  $\mu$ M de AA en un ambiente con altos niveles de estrés oxidativo regula la expresión de genes pro y anti apoptóticos, pero que al oxidarse en las neuronas, induce alteraciones morfológicas que activarían la vía necroptótica, sugiriendo que la vitamina C induce necroptosis (Ferrada et al., 2020).

Por otro lado, en distintos estudios preclínicos *in vivo* se ha evidenciado beneficios al administrar tratamientos con vitamina C. En 1998, se reportó efectos de la vitamina C en estudios con monos *Maccaca radiata*, donde se les administró 2g de AA por vía parenteral e inmediatamente después se les efectuó un ACV ocluyendo su arteria cerebral media por 4 horas, los resultados indicaron un tamaño medio del infarto significativamente menor en los monos

pre tratados con AA en comparación con los tratados con placebo (Henry & Chandy, 1998). También en el 2015 se probó el AA como tratamiento posterior a un ACV en ratas, encontraron que el AA reducía significativamente la permeabilidad de la BHE y el edema cerebral en comparación con animales control. Por lo que concluyeron que el tratamiento agudo con AA puede considerarse un candidato útil para complementar del tratamiento actual que se utiliza para la isquemia cerebral (Allahtavakoli et al., 2015). También se ha demostrado que en ratas, la administración parenteral de vitamina C mejora significativamente los déficits neurológicos, reduce el infarto y edema cerebral ocasionados por un ACV, reduce las respuestas inflamatorias, las alteraciones en la BHE y la apoptosis neuronal. Sugiriendo que la administración parenteral de vitamina C tiene potencial como agente adyuvante junto a los tratamientos ya existentes en el tratamiento agudo del ACV isquémico (Chang et al., 2020).

Si bien, hay muchos estudios tanto preclínicos como clínicos que evalúan el efecto de la vitamina C, no se encontró en literatura estudios recientes que evalúen los transportadores de AA o DHA con respecto al rol que están cumpliendo en la patología. Si bien se sabe que estos se expresan de manera fisiológica, es importante evaluar que ocurre con ellos en la fisiopatología, ya que de estos depende finalmente la entrada de la vitamina C a las células y los posibles efectos que pueda ejercer a nivel intracelular.

## 2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

El presente proyecto se fundamenta en el problema generado por el accidente cerebrovascular, enfermedad que constituye la segunda causa de muerte en Chile y la principal causa de invalidez adquirida en el adulto, y que debido al envejecimiento de la población se encuentra en incremento continuo. Actualmente no posee un tratamiento capaz de revertir el daño causado por el estrés oxidativo que ocasiona la isquemia y reperfusión, provocando la alta tasa de mortalidad y número de pacientes con secuelas permanentes. Los niveles de muerte celular dependen de la gravedad del accidente cerebrovascular, dentro de las células afectadas por esta falta de oxígeno se encuentran las células endoteliales que conforman la red vascular. Se ha demostrado que tratándolas específicamente en un accidente cerebrovascular se puede mejorar la disfunción endotelial y así disminuir los daños que esta patología conlleva.

La vitamina C al ser un potente antioxidante es capaz de contrarrestar los altos niveles de estrés oxidativo en el organismo. Esta vitamina se encuentra en altas concentraciones en el cerebro, por consiguiente, los transportadores SVCTs de ácido ascórbico podrían jugar un rol fundamental en patologías a nivel cerebral con altos niveles de agentes oxidantes como los accidentes cerebrovasculares. Un marcado aumento en el potencial antioxidante podría ser una posible terapia para tratar un ACV, así como otras enfermedades neurovasculares. En nuestro equipo de investigación, utilizamos un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro* conformado por células HBMEC. Caracterizamos la expresión de estos transportadores de vitamina C y determinando que estas células captan vitamina C y expresan endógenamente SVCT1 y SVCT2.

En la actualidad no existe literatura que compruebe si al igual que ocurre en ratones, alguno de los transportadores SVCTs aumenten su expresión en el endotelio cerebral humano bajo una condición de isquemia y reperfusión generada por un accidente cerebrovascular. Tampoco se ha estudiado el

posible efecto de administrar vitamina C como terapia para contrarrestar específicamente el daño en las células endoteliales y en los diferentes tipos celulares que conforman el parénquima de cerebro humano.

Estas aristas nos hacen plantear las preguntas: **¿Los transportadores SVCTs de las células endoteliales de cerebro humano aumentan su expresión posterior a una isquemia y reperfusión? Y si es así, ¿Qué efecto tendrá un tratamiento con vitamina C sobre las células endoteliales de cerebro humano posterior a la isquemia y reperfusión?**



### 3. HIPÓTESIS

El estrés oxidativo ocasionado por la isquemia y reperfusión de un accidente cerebrovascular provocara el aumento de la expresión de los transportadores de ácido ascórbico SVCTs para favorecer la entrada de vitamina C al medio intracelular de las células endoteliales microvasculares de cerebro humano, contrarrestando así el estrés oxidativo. La administración de vitamina C favorece un aumento del potencial antioxidante, el cual revierte el daño oxidativo y la muerte celular producida por la isquemia y reperfusión en células endoteliales microvasculares de cerebro humano.



#### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de la vitamina C para disminuir el daño oxidativo y la muerte celular causada por isquemia y reperfusión en un modelo *in vitro* de células endoteliales vasculares de cerebro humano.

#### 5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer un modelo de isquemia y reperfusión *in vitro* con línea celular HBMEC
2. Evaluar niveles de ROS, muerte celular y expresión de transportadores de vitamina C en HBMEC sometidas a isquemia y reperfusión.
3. Determinar efecto de Vitamina C sobre altos niveles de ROS y muerte celular inducida por isquemia y reperfusión en HBMEC.



## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Cultivo Celular.

Se utilizó la línea celular inmortalizada HBMEC (human brain microvascular endothelial cells), estas células adherentes al ser diferenciadas de 12 a 14 días llegan a un plateau de proliferación y comienzan a expresar en su superficie proteínas de uniones ocluyentes o estrechas, lo cual es una de las principales características de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Los cultivos celulares fueron cultivados en medio RPMI 1640 con 25 mM HEPES (pH 7.4), 10% (v/v) suero bovino, 1 mM piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 1% (v/v) aminoácidos no esenciales MEM, 1% (v/v) vitaminas MEM y penicilina/estreptomicina (100 U/ml). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Para este estudio se utilizaron HBMEC postconfluentes diferenciadas por 12-14 DIV.

### 6.2. Modelo de isquemia y reperfusión.

El modelo utilizado de isquemia y reperfusión para este estudio estuvo constituido por dos grandes factores de la isquemia cerebral: la falta de glucosa y la hipoxia. Se utilizaron células diferenciadas, a las cuales al momento de comenzar el experimento se les cambió el medio sin glucosa para luego someterlas a la hipoxia.

Para generar la hipoxia se utilizó un modelo de hipoxia *in vitro* (Mata-Greenwood et al., 2017; Zhu et al., 2010), en el cual se ocupó una cámara de hipoxia (Stem Cell Technologies)(Sagrillo-Fagundes et al., 2018). En esta cámara fueron depositadas las placas de cultivo celular, posteriormente se cerró herméticamente y se conectó a un tanque de gas 1%O<sub>2</sub>; 5%CO<sub>2</sub>; 94%N<sub>2</sub>, se hizo fluir el gas a 40mmHg por 2 minutos, desplazando el oxígeno ambiental y dejando en el interior de la cámara un ambiente de hipoxia. Luego de esto se dejó la cámara incubando a 37°C por el tiempo necesitado.

Para generar la reperfusión, luego de incubar las células en isquemia, se sacaron las placas de la cámara de hipoxia y rápidamente se les administro medio con glucosa. Como control positivo de isquemia se trataron células en normoxia con 700 $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> en medio de cultivo sin glucosa.

### **6.3. Estandarización de Cloruro de Cobalto.**

Se utilizó el cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) como control positivo de los experimentos de hipoxia, ya que es un competidor de hierro que comúnmente se utiliza en los estudios para efectuar hipoxias químicas (Davis et al., 2018; Sethi et al., 2018).

Para determinar en qué concentraciones y tiempos de incubación usar el CoCl<sub>2</sub>, se efectuaron curvas de citotoxicidad con ensayos de MTT. Se probaron los rangos de concentración de 0 a 10.000  $\mu$ M y tiempos de incubación de 6, 12 y 24 horas.

### **6.4. Tratamiento de Ácido Ascórbico.**

Para evaluar el efecto de la vitamina C sobre muerte celular y niveles de ROS, se hicieron tratamientos con AA: 200 $\mu$ M y 1000 $\mu$ M. Ambas concentraciones fueron administradas directamente al cultivo celular a las 2 horas de reperfusión, luego de dar el tratamiento, las células fueron incubadas en condiciones normales (37° 5%CO<sub>2</sub>). Finalmente, las muestras fueron evaluadas a las 3 y 24 horas de tratamiento (5 y 26h de reperfusión). Se utilizaron control células en condiciones de normoxia y células sin tratamiento de AA.

### **6.5. Evaluación de Viabilidad.**

Posterior a someter los cultivos a las distintas condiciones de hipoxia, isquemia y reperfusión, se evaluó la viabilidad celular mediante dos técnicas diferentes, por ensayo de exclusión azul de tripán y por MTT.

### **6.5.1. Ensayo de exclusión con azul de tripán.**

El azul de tripán es un colorante derivado de la toluidina capaz de teñir solo las células muertas, ya que no puede penetrar a las células vivas con membrana íntegra.

Para este ensayo se utilizaron cultivos en placa de 12 pocillos, luego de someter las muestras a la condición de estudio, se procedió a tripsinizar las células, luego se agregó medio completo (con suero bovino) y se re-suspendió para luego tomar una alícuota representativa. La alícuota se mezcló con azul de tripán 0,4% (p/v) en la proporción 1:1, se sembró en una cámara de Neubauer y se procedió a contar en el microscopio la cantidad de células vivas y muertas en cada muestra.

### **6.5.2. Ensayo MTT.**

MTT este es un ensayo colorimétrico que evalúa la actividad metabólica celular (Stockert et al., 2018), que en condiciones definidas es indicador de viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. El ensayo se basa en la reducción de la sal tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas.

Se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos, posterior al tratamiento al cual se sometieron las células, se procedió a aspirar el medio y adicionar 100µL de MTT [1mg/mL] por pocillo, la placa se dejó incubando por 4h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se aspiró el sobrenadante y se solubilizaron los cristales de formazán obtenidos con 100 µL de isopropanol, se agitó por 15 min y finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 570nm.

### **6.6. Extracción de Proteínas.**

Se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos, posterior a los tratamientos de las células, rápidamente se dejó las placas en hielo y se aspiró el medio, se lavó

con PBS frío y se adicionó 400 µL de buffer ripa (Thermo Fisher Scientific) más inhibidores de proteasas (1:50) (Thermo Fisher Scientific), con un escrapeador se rasparon las placas y se colectaron las muestras.

Para obtener extracto de proteínas nucleares, se centrifugó las muestras a 13.000 rpm por 1 minuto a 4°C, el sobrenadante obtenido correspondió a las proteínas citosólicas, el pellet se re-suspendió en buffer C (20%glicerol; 20mM Hepes ph7,9; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA) y con ayuda de un homogeneizador DOUNCE, posterior a esto se incubó en hielo por 30 minutos. Luego se centrifugó a 13.000 rpm por un minuto a 4°C y el sobrenadante obtenido corresponde a las proteínas nucleares. Todas las muestras proteicas extraídas se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

#### **6.7. Western Blot.**

De cada muestra de proteínas se denaturaron 50µg con buffer de carga y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7%. Luego se transfirieron a una membra de PVDF y se efectuó la inmunodetección. Se utilizaron los anticuerpos primarios anti HIF-α (R&D Systems) y anti HDAC (Santa Cruz Biotechnology). Y los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa-699 y Alexa-799 (Jacson laboratories) para revelar las proteínas estudiadas. Las membranas fueron escaneadas con el equipo LI-COR BIOSCIENCES y cuantificadas con el programa Fiji.

#### **6.8. Inmunofluorescencia.**

La evaluación de la integridad de la barrera endotelial formada por HBMEC y la expresión de los trasportadores de vitamina C se efectuó mediante inmunofluorescencia.

Las HBMEC diferenciadas se fijaron en p-formaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS (pH 7,4). Las células fijadas se incubaron durante 30 min en PBS que contenía albúmina de suero bovino al

1%, se permeabilizaron las muestras con 0,1% tritón (TX) en PBS por 5 minutos y se incubaron con anticuerpos primarios, los cuales fueron anti ZO-1 (USBiological), anti SVCT1 (Santa Cruz Biotechnology), anti SVCT2 (Santa Cruz Biotechnology) y anti GLUT1 (Abcam). Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 2 h con anti-IgG conjugado con FITC, CY3 y CY5 (DAKO). Finalmente, las muestras fueron lavadas y montadas con Vectashield + DAPI (Vector Laboratories) y observadas bajo un microscopio multifotón espectral (LSM780 Zeiss).

### **6.9. RT-qPCR.**

Se evaluó por RT-qPCR los niveles relativos de ARNm de los transportadores de vitamina C. La extracción del ARN total se efectuó con el kit Absolutely RNA Miniprep Kit Catalog #400800 (Agilent). La expresión relativa de ARNm fue cuantificada a través del método de RT-qPCR en un equipo Agilent Technologies AriaMx Real Time PCR system). La pureza e integridad de las muestras de ARN fueron verificadas por medición de la relación de absorbancia 260/280 nm, donde la relación de absorbancia debe ser > 2.0 a 260/280 nm.

Para PCR, la mezcla de reacción se preparó 15 µl por muestra, la cual contenía 7,5 µl de 2X mezcla maestra Brilliant II SYBR Green QRT-PCR, 200 nM de partidador sentido y anti-sentido, 0,3 µl transcriptasa reversa (RT) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para ajustar el volumen final. Posteriormente se agregó 100 ng de ARN experimental a cada reacción. Las condiciones de RT-qPCR fueron para la transcriptasa reversa 50°C por 30 minutos, luego la inactivación de la enzima a 95 ° C por 10 minutos. Seguidos de 40 ciclos de 95° C durante 30 s y 60° C por 1 minuto, seguido de un programa de curva de melting predeterminado en el equipo. La expresión relativa de ARNm fue normalizada con la expresión del ARNm de β actina. Los partidores que se utilizaron fueron: 5'-CTGCTCATCAACCGCAAC-3' 5'-CTTCTTCTCCCGCATCATCT-3' (GLUT1), 5'-GCCTTGCTTTCATACTTGAC-3' 5'-TGGAAGACATGTCACTGTTG-3' (SVCT1),

5'-AACTGCTATGTTTGTAGGGG-3' 5'-CAAATTGTACGACTCCATGC-3'  
(SVCT2) y 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3' 5'-CGCTCAGGAGGAGCAAT  
GAT-3' ( $\beta$ -actina).

#### **6.10. Citometría de flujo.**

Los efectos de la isquemia, reperfusión y vitamina C sobre la muerte celular y los niveles de ROS se evaluaron mediante citometría de flujo.

Se utilizó el kit CellROX™ Green Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen) para evaluar ROS, el cual es un reactivo permeable a las células y no fluorescente mientras está en el estado reducido, al reaccionar con ROS este se oxida y muestra una intensa señal fluorogénica que tiene una absorción/emisión máxima de 508/525 nm. También se utilizó el marcador Zombie NIR™ Fixable Viability (BioLegend) para muerte celular, el cual es una tinción fluorescente reactiva con aminos, no permeable a las células vivas, pero si con membranas comprometidas proporcionando una señal que tiene una absorción/emisión máxima de 633/746 nm.

Las muestras fueron analizadas por el citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 y los datos obtenidos fueron analizados con el programa FLOWJO.

#### **6.11. Análisis Estadísticos.**

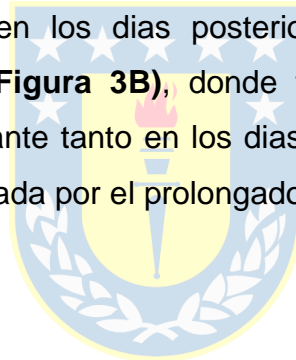
Los resultados fueron graficados como promedio  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías. Se consideraron valores estadísticamente significativos: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Prism, Ca, USA).

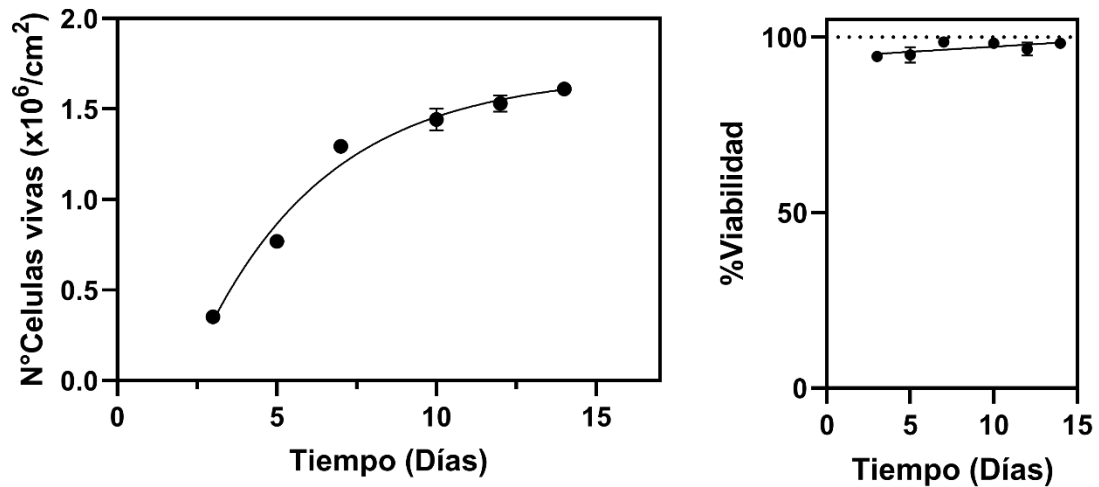
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Establecer un modelo de isquemia y reperfusión *in vitro* con línea celular HBMEC

#### 7.1.1. Modelo de BHE *in vitro* con células HBMEC.

Para comenzar la investigación, se generó un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro* con la línea celular HBMEC, a estas se le evaluó la proliferación cultivando las células por DIV con la finalidad de corroborar su diferenciación (**Figura 3A**), contamos el número de células mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán a los 3, 5, 7, 10, 12 y 14 días en cultivo, y observamos que las células HBMEC proliferan hasta llegar a un plateau a los 10 DIV que se mantiene en los días posteriores. Además, evaluamos la viabilidad de las HBMEC (**Figura 3B**), donde fue posible observar que se mantiene la viabilidad constante tanto en los días de proliferación como en los días de plateau, sin ser afectada por el prolongado tiempo en cultivo *in vitro*.





**Figura 3. Proliferación y viabilidad de células HBMEC.**

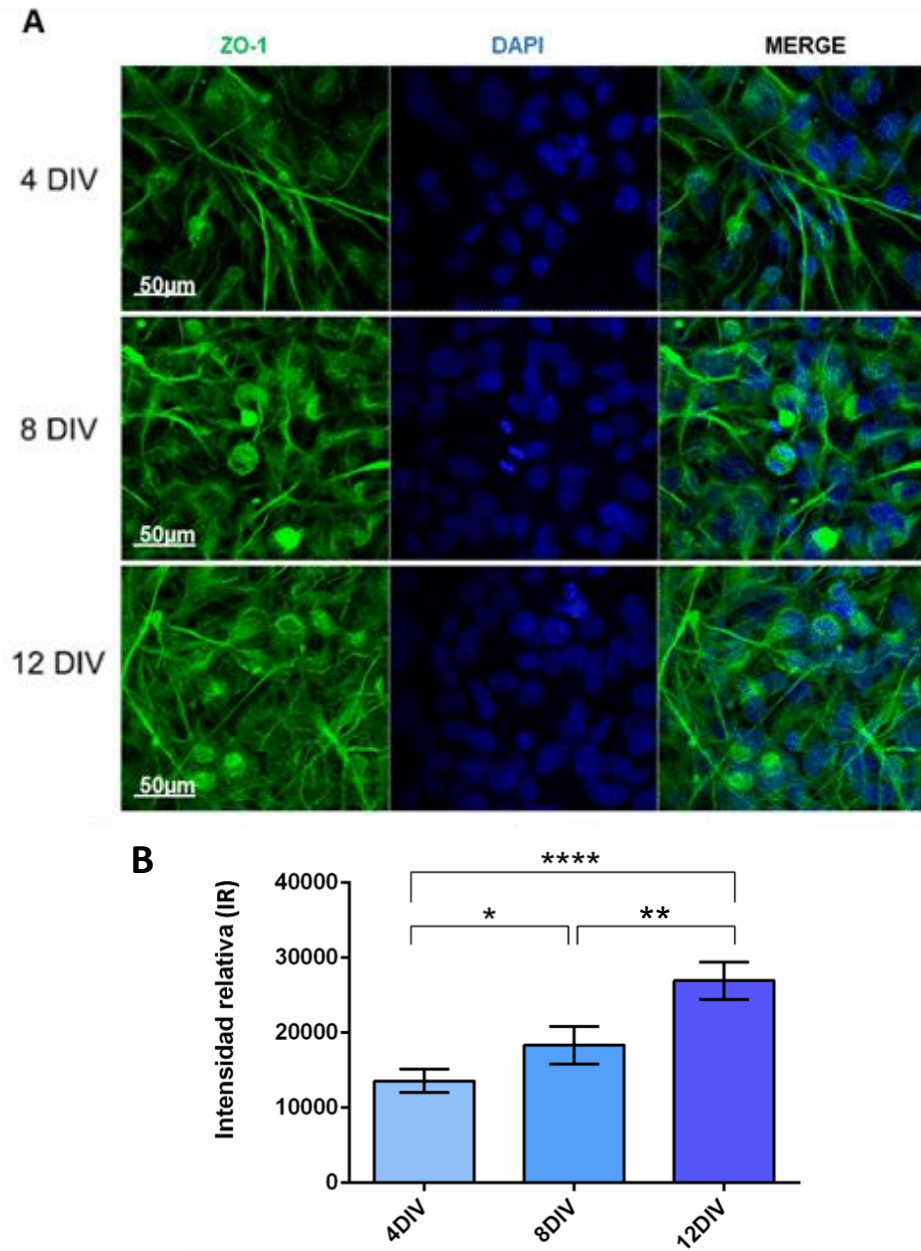
Se evaluó la proliferación y viabilidad celular mediante ensayo de exclusión con azul de tripán. **A)** Proliferación de HBMEC y **B)** la viabilidad de HBMEC desde 3 hasta 14 DIV. Los datos son presentados como millón de células/centímetro cuadrado. Los resultados muestran el promedio  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones realizadas en triplicado. Las células HBMEC en cultivo proliferan de manera exponencial hasta los 10 DIV, donde llegan a un plateau que se mantiene en los DIV posteriores, manteniendo siempre su viabilidad alta.



### 7.1.2. Detección de la proteína ZO-1 en HBMEC.

Para controlar la diferenciación de las células endoteliales cerebrales, se evaluó la expresión de la proteína zónula ocluyente 1 con la técnica de inmunofluorescencia (**Figura 4**), ZO-1 es una de las principales proteínas que conforma las uniones estrechas en la barrera hematoencefálica. La figura presentada muestra la comparativa entre las células HBMEC con 4, 8 y 12 DIV. Donde se aprecia un aumento de la expresión de la proteína ZO-1 (en verde), a medida que aumentan los DIV (**Figura 4A**). Cuantificamos la intensidad relativa de la expresión de ZO-1 (**Figura 4B**), encontramos que a los 8 DIV y 12 DIV aumenta significativamente la expresión de la proteína con respecto a la expresión de la proteína a los 4 DIV ( $p < 0,05$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente). Además, la expresión de ZO-1 a los 12 DIV es significativamente mayor que a los 8 DIV ( $p < 0,01$ ).





**Figura 4. Expresión de proteínas de uniones estrechas en HBMEC diferenciadas.**

Expresión de la proteína ZO-1 a los 4, 8 y 12 DIV. **A)** Expresión por Inmunofluorescencia de la proteína ZO-1 (verde), proteína de uniones estrechas

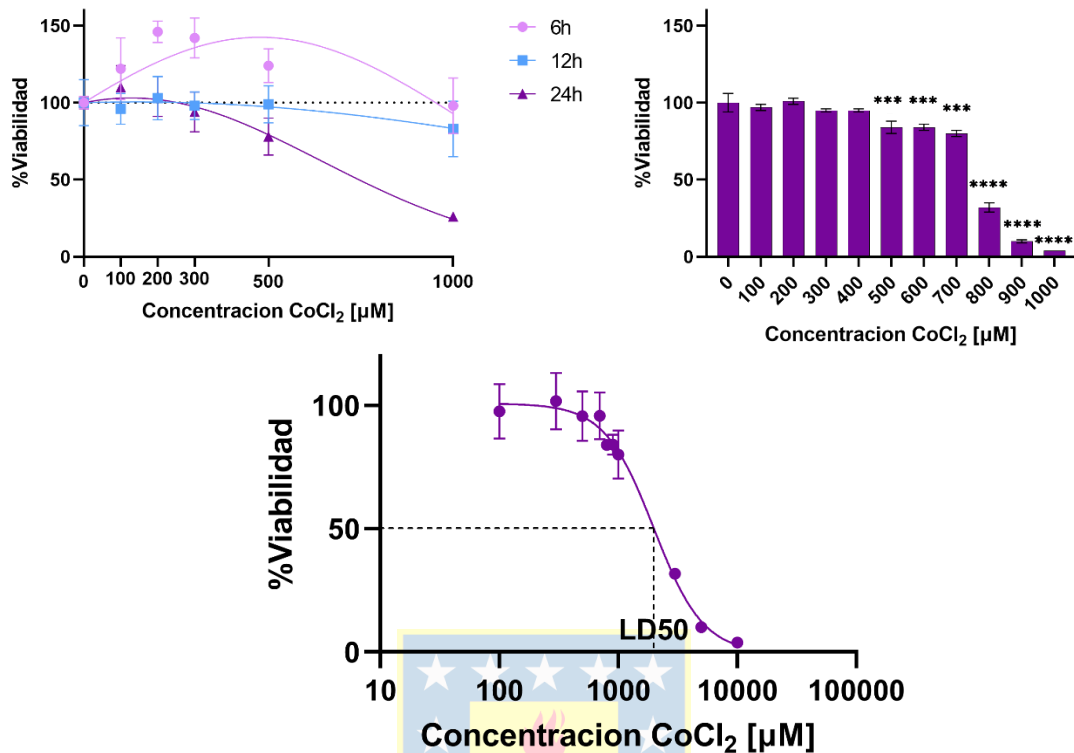
que indica diferenciación de HBMEC. En la fila superior se muestra HBMEC con 4 DIV, en la fila del centro HBMEC con 8 DIV y en la fila inferior HBMEC con 12 DIV. La figura muestra un aumento de la expresión de la proteína ZO-1 en células HBMEC al pasar los DIV. Núcleos marcados con dapi (azul). Barra de magnificación de 50  $\mu$ M. **B)** Intensidad relativa de ZO-1 en HBMEC. Se observa un aumento significativo en el transcurso de los DIV de la expresión relativa de ZO-1 (ANOVA p: <0,0001, s).



### 7.1.3. Estandarización del cloruro de cobalto en HBMEC.

Para implementar un modelo de isquemia y reperfusión, utilizamos como control positivo de hipoxia tratamientos con  $\text{CoCl}_2$ . El cloruro de cobalto es ampliamente utilizado en variados estudios como un inductor de hipoxia química, esto debido a que es capaz de competir con el hierro y de esta forma hipoactiva a PHD permitiendo que HIF1- $\alpha$  se establezca al no ser hidroxilado y degradado. (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009; Davis et al., 2018; Lando et al., 2002).

Mediante ensayos de MTT determinamos la concentración de  $\text{CoCl}_2$  a utilizar en los tratamientos con HBMEC, buscando que generara un efecto sobre la viabilidad celular similar al que ocurre en una hipoxia cerebral. Lo primero que se evaluó fue el tiempo de incubación con  $\text{CoCl}_2$ , donde realizamos curvas de dosis-respuesta de viabilidad en función de la concentración sobre HBMECi, y estudiamos los tiempos de incubación 6, 12 y 24h a concentraciones crecientes de 0, 100, 200, 300, 500 y 1.000 $\mu\text{M}$  respectivamente (**Figura 5A**). En los resultados se observó que tanto el tratamiento por 6h como de 12h de incubación en concentraciones crecientes de  $\text{CoCl}_2$  no se vio afectada la viabilidad de las células HBMEC, mientras que disminuyó significativamente al incubar por 24h ( $p: 0,0001$ ) la viabilidad de las HBMEC con concentraciones iguales o mayores a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$ . Posteriormente evaluamos el efecto del  $\text{CoCl}_2$  sobre la viabilidad de las HBMECi. Para lo cual tratamos las células por 24h con  $\text{CoCl}_2$  (0-1.000  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 5B**). Encontramos que a partir de los 500  $\mu\text{M}$  de tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  disminuye de manera significativa la viabilidad celular ( $p: <0,0001$ ). Finalmente, se determinó el LD50 del cloruro de cobalto en HBMEC diferenciadas con las concentraciones crecientes de  $\text{CoCl}_2$  (0-10.000  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 5C**). La curva obtenida dio como resultado un LD50:  $1997 \pm 228 \mu\text{M}$  ( $R^2: 0,9892$ ,  $p: 0,3200$ ).

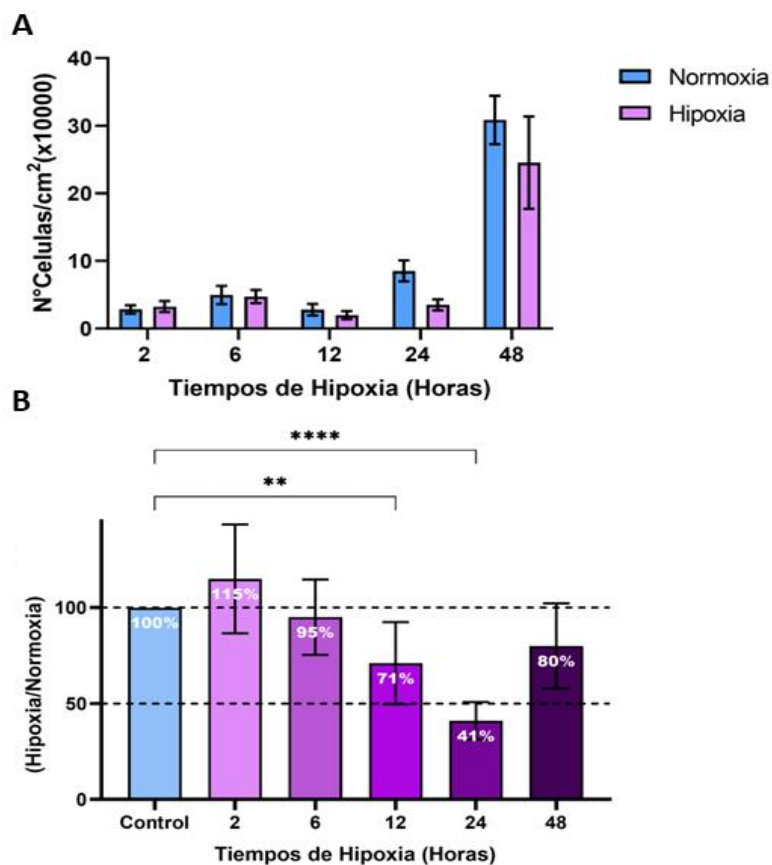


**Figura 5. Efecto del cloruro de cobalto en la viabilidad de HBMEC.**

Con el fin de utilizar un control positivo de hipoxia, evaluamos la viabilidad de HBMEC por ensayo de MTT tratadas con distintas concentraciones y tiempos de incubación con CoCl<sub>2</sub> (hipoxia química), evaluando su viabilidad con ensayos de MTT. **A)** Curvas dosis-respuesta del tratamiento con CoCl<sub>2</sub> (0-1000 μM, incubado por 6, 12 y 24h). Observamos que no hay grandes diferencias en la viabilidad con tratamiento con CoCl<sub>2</sub> de 6 como de 12h, mientras que el tto por 24h comienza a disminuir la viabilidad en función de la concentración (ANOVA p: <0,0001, s). **B)** Comparación del efecto de CoCl<sub>2</sub> (tto por 24h) en la Viabilidad de HBMEC en función de su concentración. A partir de los 500μM disminuye la viabilidad de HBMEC (ANOVA p: <0,0001, s). **C)** Curva de viabilidad en función a concentración de CoCl<sub>2</sub> (tto por 24h) sobre HBMEC diferenciadas para obtener el LD<sub>50</sub> de CoCl<sub>2</sub>, donde se determinó que 1997 ± 228 μM disminuyen la viabilidad al 50% (R<sup>2</sup>: 0,9892, ANOVA p: 0,3200, ns).

#### 7.1.4. Efecto de hipoxia en HBMEC.

Con el modelo de BHE implementado, procedimos a establecer el modelo de isquemia y reperfusión, para esto primero determinamos la cantidad de horas que se debían someter las HBMEC a un estado de hipoxia para obtener un daño comparable con el de una isquemia y reperfusión cerebral. Esta determinación se hizo mediante ensayos de exclusión de azul de tripán, sometimos a las células a un ambiente hipóxico con una cámara de hipoxia y probamos diferentes tiempos de hipoxia (2 - 48h) (**Figura 6**). Pasado cada tiempo de hipoxia determinamos el número de células por cm<sup>2</sup> que comparamos con su control de células en normoxia (**Figura 6A**). De la figura 9A determinamos que a partir de las 24 horas de hipoxia existía una diferencia con respecto a su control en la viabilidad de las HBMEC, pero el resultado no fue significativo (p: 0,0664). Para poder comparar cada hora de hipoxia entre sí, se normalizó cada experimento con su respectivo control de normoxia, obtuvimos el número de células por cm<sup>2</sup> del control como el 100% y a partir de eso calculamos el porcentaje de las células en hipoxia:  $((N^{\circ} \text{ células en hipoxia} / N^{\circ} \text{ células en normoxia}) \times 100)$  (**Figura 6B**). Los resultados indican una disminución en el porcentaje estadísticamente significativa a las 12 y 24 h de tratamiento con hipoxia de un 71% y 41% respectivamente (p: <0,0001) (**Figura 6B**).



**Figura 6. Efecto del tratamiento con distintos tiempos de hipoxia sobre las células HBMEC.**

Para determinar el tiempo adecuado de hipoxia en el modelo de isquemia y reperfusión, evaluamos con el método de exclusión de azul de tripán la diferencia en el número de células entre la condición de hipoxia con respecto a su control normoxia por distintos tiempos. **A)** Comparación del número de células HBMEC tratadas. Los resultados indican que no hay gran diferencia en el número de células (ANOVA p: 0,0664, ns). **B)** Comparación del número de células a distintitos tiempos de hipoxia normalizado con su respectiva condición de normoxia ( $hx/nx \cdot 100$ ). Al normalizar los datos se obtuvo que a las 12 y 24h hay mayor disminución de células vivas, 71% y 41% respectivamente (ANOVA p: <0,0001, s).

### 7.1.5. Expresión de HIF1- $\alpha$ en modelo de HBMEC sometidas a isquemia y reperfusión.

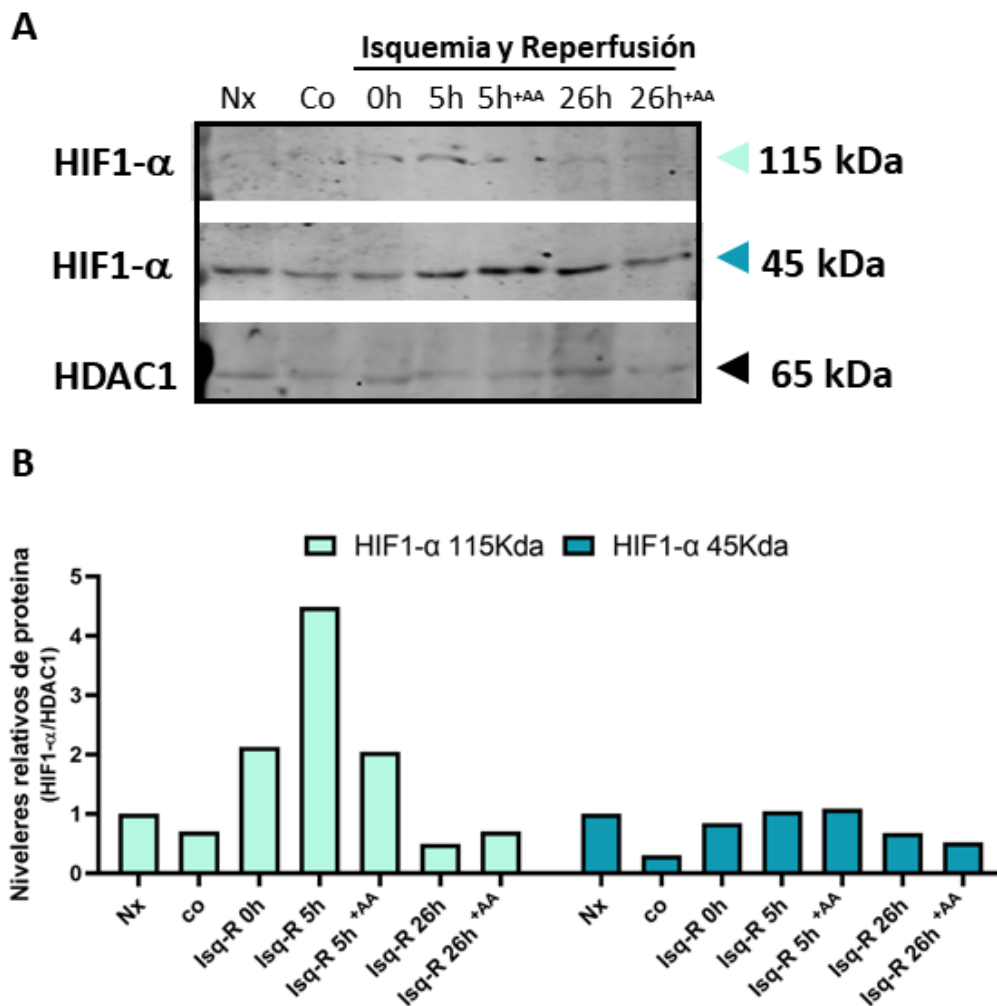
Utilizando el modelo de hipoxia establecido en el punto 7.1.4. se generó el modelo de Isq-R y confirmamos que este induce la estabilización de HIF1- $\alpha$ . Esto se determinó utilizando cultivos celulares de HBMEC de 14DIV, a los cuales se sometió a una isquemia de 24 horas y posterior a esto se efectuó la reperfusión, luego tomamos muestras de 0, 5 y 26 horas post reperfusión. Además, evaluamos a las 5 y 26h post reperfusión el efecto del tratamiento con AA sobre la expresión de HIF1- $\alpha$ , para ello administramos 200 $\mu$ M de AA a las 2 horas post reperfusión, obteniendo muestras tratadas con AA por 3 y 24 horas. A cada muestra se les extrajo proteínas rápidamente y se preparó el extracto proteico nuclear. Las muestras fueron evaluadas mediante western blot, usando como control negativo cultivos en normoxia y como positivo cultivos tratados con 700  $\mu$ M de cloruro de cobalto (**Figura 7**). En el western blot detectamos con la proteína HIF1- $\alpha$  a los  $\sim$ 115 y  $\sim$ 45 kDa (**Figura 7A**), la proteína de mayor peso corresponde a la proteína que transloca al núcleo para unirse a HRE. La proteína HDAC de  $\sim$ 65 kDa se utilizó como control de carga de proteínas nucleares.

La imagen obtenida del western blot fue analizada con el programa Fiji, que nos permitió cuantificar y normalizar las bandas obtenidas de HIF1- $\alpha$  con respecto a la banda correspondiente a el control HDAC. Al comparar la expresión relativa de las muestras con el control (Nx) observamos un aumento de la expresión de HIF1- $\alpha$  de mayor peso molecular (115kDa) a las 0 y 5h de reperfusión, que posteriormente disminuyó su expresión a las 26h de reperfusión (**Figura 7B**), no fue posible detectar un aumento de la expresión de la proteína en el control positivo (Co). Por otro lado, encontramos que la expresión relativa de HIF1- $\alpha$  de  $\sim$ 45 kDa se mantiene casi constante en todas las condiciones estudiadas.



Además, comparamos las muestras de 5h de reperfusión con y sin tratamiento de AA y encontramos una menor expresión relativa de HIF1- $\alpha$  de 115 kDa con el tratamiento de AA (**Figura 7**).





**Figura 7. Expresión de proteína HIF1-a post isquemia y reperfusion.**

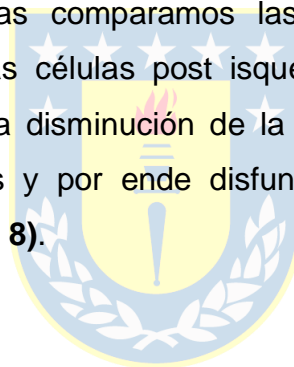
Para corroborar el estado de hipoxia evaluamos la expresión de HIF1- $\alpha$ . **A)** Western blot de extractos de proteínas nucleares de HBMEC post isquemia y reperfusion, la imagen muestra la presencia de una banda a los 45 kDa en todas las condiciones analizadas, también se observa la presencia de una banda de 115 kDa en los tratamientos con 0 y 5h de reperfusion. **B)** El gráfico muestra la cuantificación de las bandas obtenidas en la figura A, normalizada con la señal para HDAC1 (proteína nuclear). Control negativo: normoxia (Nx), control positivo: cobalto (co).

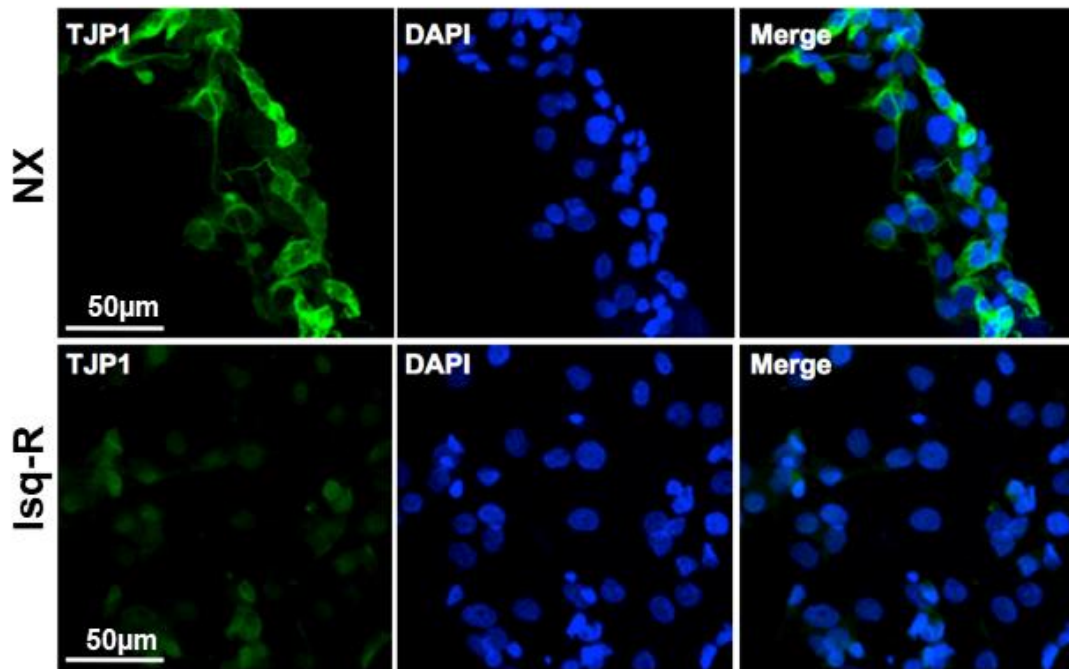
### 7.1.6. Disfunción endotelial posterior a isquemia y reperfusión.

Finalmente, para establecer el daño que generó nuestro modelo de isquemia y reperfusión sobre el modelo de endotelio cerebrovascular, evaluamos mediante inmunofluorescencia la integridad del endotelio o BHE analizando la expresión de la proteína de unión estrecha ZO-1 (**Figura 8**).

Para ello, cultivamos las células por 14 DIV y posterior a esto procedimos a someter las células a un estado de isquemia por 24 horas, posteriormente hicimos la reperfusión e inmediatamente efectuamos una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti ZO-1 (**Figura 8**).

Con las imágenes obtenidas comparamos las células en condiciones de normoxia con respecto a las células post isquemia de 24h y reperfusión a tiempo 0h. Encontramos una disminución de la expresión de ZO1, indicando posible daño en las células y por ende disfunción endotelial en la barrera formada por HBMEC (**Figura 8**).





**Figura 8. Disminucion de la expresion de la proteína de uniones estrechas ZO-1 post ischemia y reperfusion.**

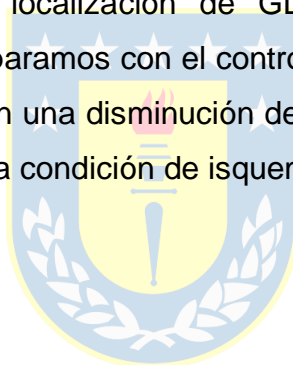
Mediante inmunofluorescencia evaluamos la expresi3n de la TJP ZO-1 en HBMEC postconfluentes y sometidas a ischemia de 24h (0h de reperfusion). En la fila superior se muestra la condicion control (normoxia), y en la fila inferior la condicion post Isq-R. la imagen muestra una marcada disminuci3n de la expresi3n de la prote3na ZO-1 (verde) post Isq-R. N3cleos marcados con dapi (azul). Barra de magnificaci3n de 50 μM

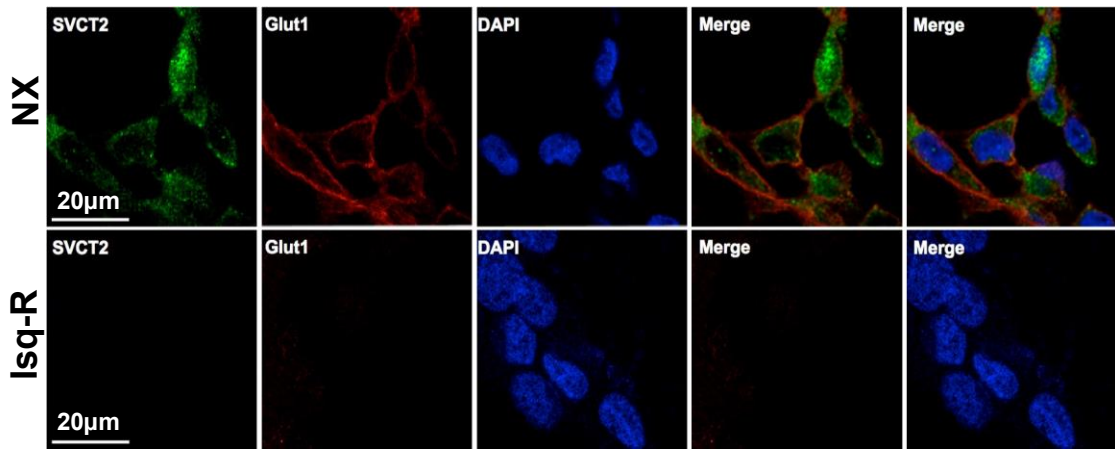
## **7.2. Evaluar niveles de ROS, muerte celular y expresión de transportadores de vitamina C en HBMEC sometidas a isquemia y reperfusión.**

### **7.2.1. Expresión de transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1 posterior a isquemia y reperfusión en HBMEC postconfluentes.**

Para evaluar los efectos de la isquemia y reperfusión sobre la expresión de transportadores de vitamina C en HBMEC se efectuó una inmunofluorescencia **(Figura 9)** de células con 14 DIV sometidas a isquemia por 24 horas, pasado el tiempo se hizo la reperfusión e inmediatamente se fijaron las muestras con PFA 4% (reperfusión tiempo 0h).

Evaluamos la expresión y localización de GLUT1 y SVCT2 en HBMEC sometidas a Isq-R y las comparamos con el control de normoxia **(Figura 9)**. Las imágenes obtenidas muestran una disminución de la expresión tanto de SVCT2 como de GLUT1 posterior a la condición de isquemia de 24 horas **(Figura 9)**.





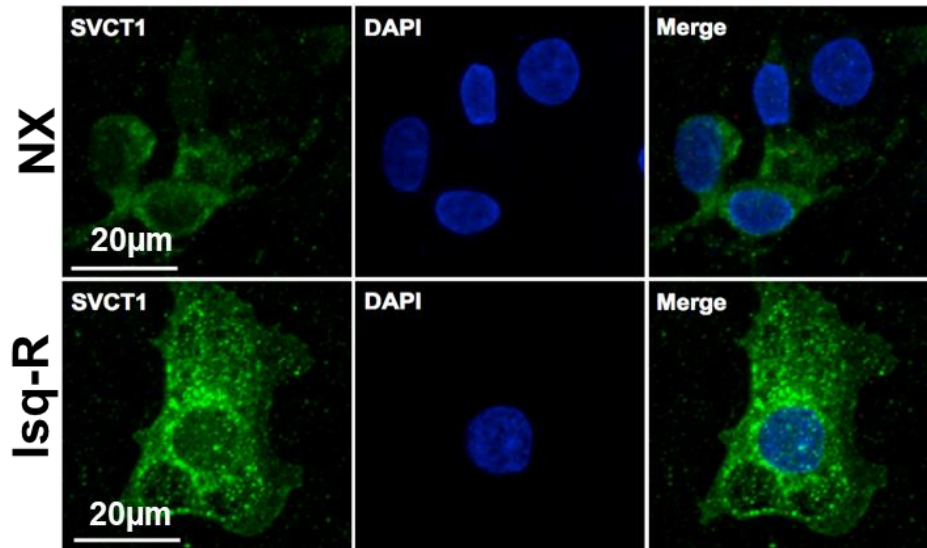
**Figura 9. Efecto de la isquemia y reperfusión en la expresión de los transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1 en HBMEC postconfluentes.**

Determinamos mediante inmunofluorescencia la expresión de los transportadores de vitamina C SVCT2 (verde) y GLUT1 (rojo) post isquemia de 24 horas (0h reperfusión). En la fila superior se muestra la condición control (normoxia) y en la fila inferior la condición post isquemia y reperfusión. En las imágenes podemos observar una disminución en la expresión tanto de SVCT2 como GLUT1 post Isq-R. Núcleos marcados con dapi (azul). Barra de magnificación de 20 μM.

### **7.2.2. Expresión del transportador de vitamina C SVCT1 posterior a isquemia y reperfusión en HBMEC postconfluentes.**

Evaluamos mediante inmunofluorescencia la expresión del transportador SVCT1 (**Figura 10**) en HBMEC con 14 DIV sometidas a una isquemia y reperfusión, donde la isquemia fue de 24 h. Las muestras fueron fijadas a las 0h de reperfusión y luego fueron comparadas con el control de normoxia. En la figura 13 encontramos un aumento de la expresión del transportador SVCT1 posterior a la Isq-R con respecto a su control.





**Figura 10. Efecto de la isquemia y reperfusion en la expresi3n del transportador de vitamina C SVCT1 en HBMEC postconfluentes.**

Evaluamos mediante inmunofluorescencia la expresi3n del transportador SVCT1 (verde) post isquemia de 24 horas (0h de reperfusion). En la fila superior se muestra la condici3n control (normoxia) y en la fila inferior la condici3n post isquemia y reperfusion. Observamos que el transportador SVCT1 aumenta su expresi3n posterior a una isquemia y reperfusion. N3cleos marcados con dapi (azul). Barra de magnificaci3n de 20 µM.



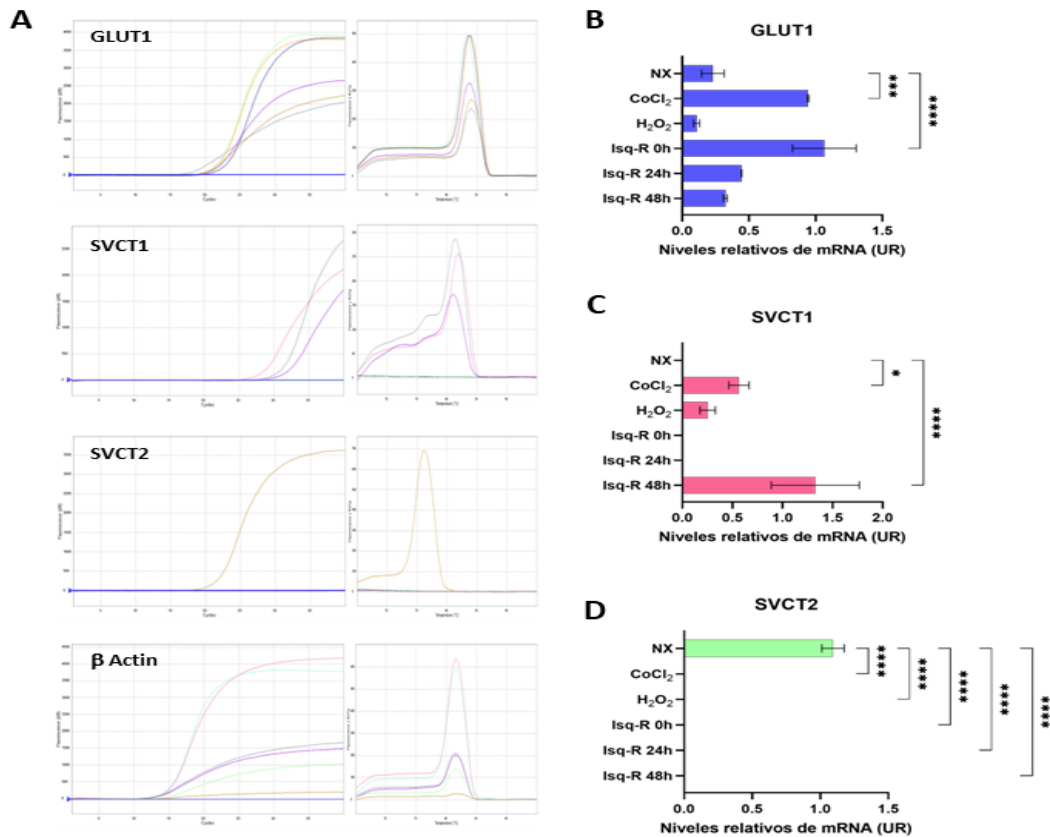
### 7.2.3. Expresión relativa del ARNm de los transportadores de vitamina C posterior a isquemia y reperfusión.

Además de evaluamos la expresión relativa del ARN mensajero de los transportadores de vitamina C mediante RT-qPCR (**Figura 11**).

Para esto las células HBMEC de 14DIV se sometieron a isquemia de 24 horas y reperfusión de 0, 24 y 48 horas. Utilizamos como control negativo células en normoxia, como control positivo de isquemia células tratadas con 700 $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> por 24 horas y control positivo de estrés oxidativo células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM por 15 minuto y 24 horas de incubación en condiciones normales.

Extrajimos ARNm de cada condición para efectuar RT-qPCR y obtener la expresión relativa de ARNm de GLUT1, SVCT1, SVCT2 y  $\beta$  actina como normalizador (**Figura 11A**).

La Figura 13A muestra las curvas de amplificación, curva de melting y expresión relativa de ARNm de GLUT1, SVCT1 y SVCT2. Observamos un aumento de GLUT1 (**Figura 11B**) tanto en el control positivo de Isq-R (Co) como al tiempo 0h post reperfusión, a mayores tiempos de reperfusión (24 y 48h) la expresión relativa del ARNm de GLUT1 disminuye a niveles cercanos al control normoxia (Nx) (p: <0,0001). Por otro lado, SVCT1 aumentó su expresión relativa de ARNm a las 48h de reperfusión (p: <0,0001) (**Figura 11C**) y SVCT2 disminuyó su expresión en todas las condiciones sometidas a estrés oxidativo o Isq-R (p: <0,0001) (**Figura 11D**).

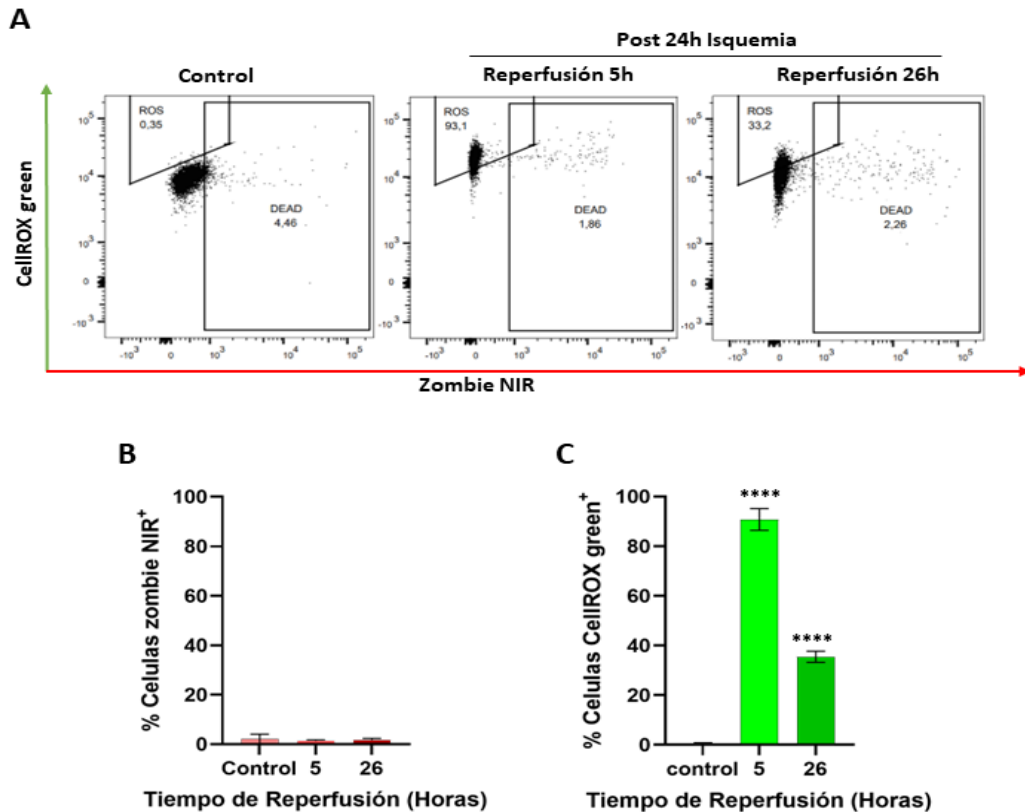


**Figura 11. Expresión relativa del ARNm de los transportadores de vitamina C en HBMEC post ischemia y reperfusion.**

Evaluamos mediante RT-qPCR la expresión de ARNm de GLUT1, SVCT1 y SVCT2 **A)** Curvas de amplificación y melting de los ARNm de los transportadores y el normalizador  $\beta$ -actina. **B)** Expresión relativa del ARNm de GLUT1, observamos que el ARNm de GLUT1 aumentó a las 0h de reperfusion y luego disminuyó a las 24h de reperfusion (ANOVA p: <0,0001, s). **C)** Expresión relativa de ARNm de SVCT1, observamos que el ARNm de SVCT1 aumentó su expresión a las 48h de reperfusion (ANOVA p: <0,0001, s). **D)** Expresión relativa del ARNm de SVCT2, observamos una disminución de la expresión relativa del ARNm de SVCT2 post ischemia y reperfusion, que se mantuvo bajo en todos los tiempos de reperfusion (ANOVA p: <0,0001, s). CoCl<sub>2</sub>: Control positivo de ischemia. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Control positivo de estrés oxidativo.

#### 7.2.4. Efecto de la isquemia y reperfusión sobre los niveles de la muerte celular y los niveles de ROS.

Cultivamos HBMEC por 14 DIV, las sometimos a isquemia de 24 horas y una posterior reperfusión de 5 y 26 horas. Cada condición fue marcada con zombie NIR y CellROX green, luego fueron fijadas con PFA 4% y analizadas en el citómetro de flujo y posteriormente evaluadas con el programa Flowjo (**Figura 122**). Los resultados obtenidos se representaron en el diagrama de puntos, los cuales indican un aumento del porcentaje de células positivas para CellROX green a las 5 horas de reperfusión y una disminución a las 26 horas de reperfusión. Por otra parte, en ninguna de las muestras aumento el porcentaje de células positivas para zombie NIR (**Figura 122A**). Estos datos fueron analizados estadísticamente encontramos que no hubo cambios estadísticamente significativos en la muerte de HBMEC ( $p: 0,8024$ ) (**Figura 12B**). Sin embargo, analizando los resultados de niveles de ROS, encontramos un aumento significativo a las 5 horas de reperfusión (91%) que disminuyó a las 26 horas (36%), pero siguió siendo significativamente mayor ( $p: <0,0001$ ) comparada con el control normoxia (**Figura 12C**).



**Figura 12. Efecto de isquemia y reperfusion sobre la muerte celular y los niveles de ROS en HBMEC postconfluentes.**

Mediante citometría de flujo evaluamos el efecto de isquemia y reperfusion sobre la muerte y producción de ROS de HBMEC. **A)** Diagrama de puntos, marcaje con zombie NIR (eje x) y CellROX green (eje y), respectivamente. **B)** Grafico de los datos obtenidos en A. No se evidencian cambios con respecto al control (normoxia) en los niveles de muerte celular posterior a una isquemia y reperfusion (ANOVA p: 0,8024, ns). **C)** Grafico de los datos obtenidos en A del efecto en los niveles de ROS, se observa un aumento significativo en los niveles de ROS con respecto al control a las 5h de reperfusion, a las 26h disminuye, pero sigue siendo significativamente más elevado que en el control. (ANOVA p: <0,0001, s).

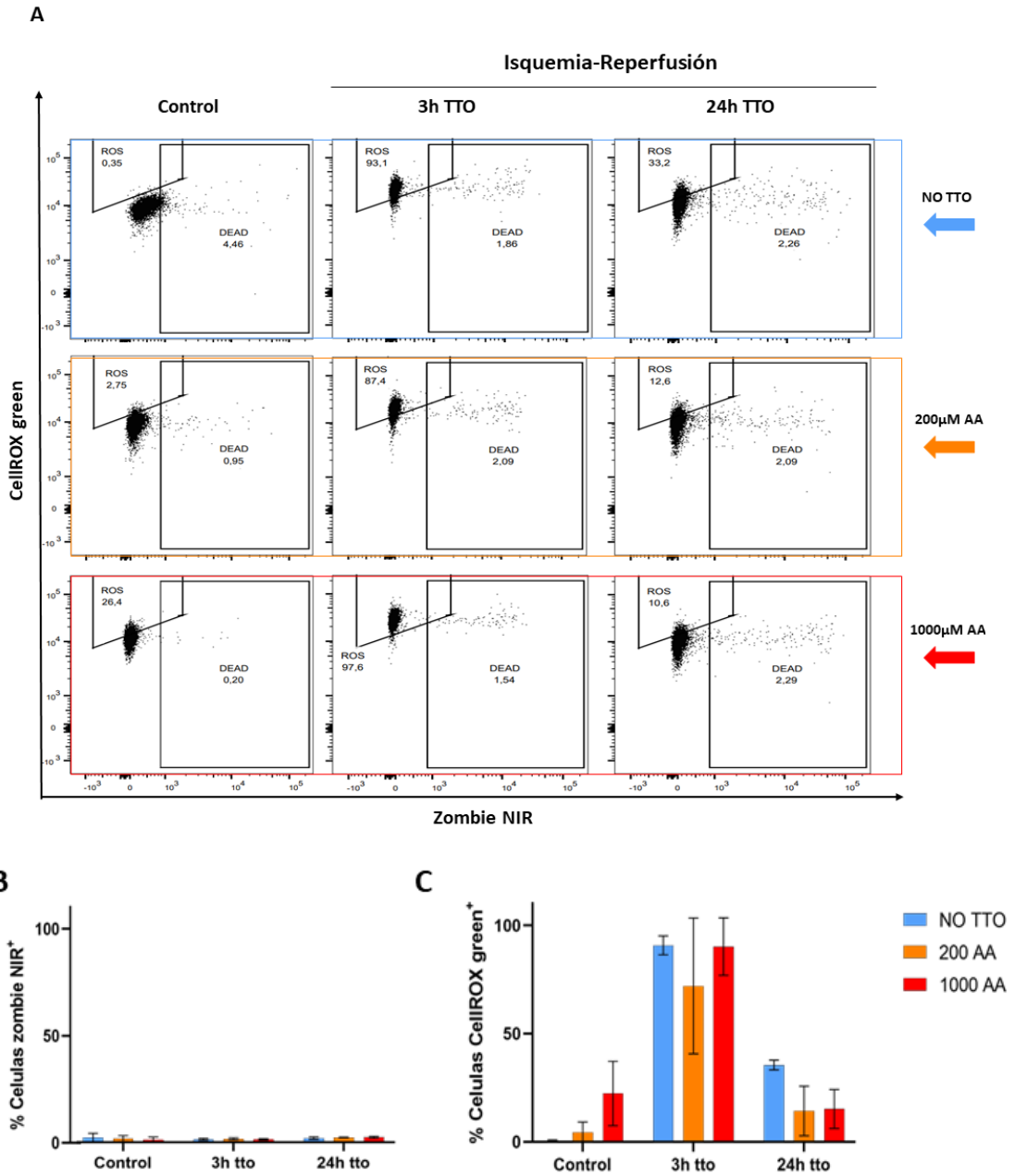
### 7.2.5. Efecto de la vitamina C sobre los niveles de muerte celular y los niveles de ROS posterior a una isquemia y reperfusión.

Finalmente, evaluamos el efecto de la vitamina C sobre la muerte celular y ROS de HBMEC posterior a un estado de isquemia y reperfusión. La evaluación se efectuó con cultivos celulares de 14 DIV, que fueron sometidos a isquemia por 24 horas y posteriormente se les hizo reperfusión. A las 2 horas de reperfusión administramos 200 y 1000  $\mu\text{M}$  de AA, luego se incubó por 3 y 24 horas (5 y 26h de reperfusión), y finalmente las marcamos con zombie NIR y CellROX green, las fijamos con PFA 4%, analizamos en el citómetro de flujo y evaluamos con el programa Flowjo. Se utilizó como control negativo células en normoxia y células sin tratamiento como control negativo del tratamiento con AA.

En la **Figura 13A** se presenta el diagrama de puntos representativo de cada condición. Los datos indican que el tratamiento con AA, tanto en baja como alta concentración no produce un efecto en la muerte de HBMEC en ningún tiempo de tratamiento ( $p: 0,7912$ ) (**Figura 13B**), sin embargo, no es posible observar si el AA posee efecto positivo en disminuir la muerte celular debido al bajo porcentaje de muerte celular basal que posee el control. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que a las 3h de tratamiento tanto en la condición sin AA como en las condiciones con tratamiento de AA 200 y 1000  $\mu\text{M}$ , existen niveles significativamente elevados de ROS, 91%, 72% y 90% respectivamente, con respecto a los controles (normoxia) ( $p: <0,0001$ ) (**Figura 13C**). Por otro lado, a las 24h es posible ver la disminución significativa de los niveles de ROS para las tres condiciones (NO TTO: 36%, 200 $\mu\text{M}$  AA: 14% y 1000 $\mu\text{M}$  AA: 15%) con respecto a las condiciones de 3h de tratamiento ( $p: <0,0001$ ), observamos una mayor disminución en las condiciones con tratamiento de AA. Sin embargo, tanto a las 3h como a las 24h no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ROS entre las muestras tratadas y no tratadas con AA ( $p: 0,0704$ ).

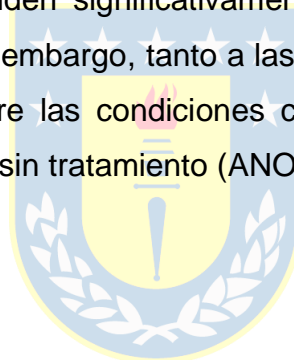
Además, evaluamos si el tratamiento con AA en HBMEC en normoxia aumentaba los niveles de ROS, donde encontramos que no existen diferencias significativas entre la condición control sin tratamiento (0,5%) y las condiciones normoxia con tratamiento de 200 y 1000  $\mu\text{M}$  de AA (4%, p: 0,9340 y 22%, 0,1458; respectivamente). También se compararon los niveles de ROS de cada condición con tratamiento de AA con sus respectivos a sus controles (normoxia), obtuvimos que la condición de 24h sin tratamiento tiene niveles de ROS significativamente mayores que los del control sin tratamiento (p: 0,0068), mientras que los tratamientos de 200  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$  de AA disminuyen los niveles de ROS hasta no ser significativamente diferentes con respecto a sus condiciones control (p: 0,5492 y 0,7234 respectivamente).





**Figura 13.** Efecto de tratamiento con Vitamina C sobre la muerte celular y niveles de ROS de HBMEC postconfluentes sometidas a isquemia y reperfusion.

Mediante citometría de flujo evaluamos el efecto de la vitamina C en la muerte y niveles de ROS de HBMEC post isquemia y reperfusión. Marcaje de muerte celular y ROS con zombie NIR (eje x) y CellROX green (eje y), respectivamente. **A)** Diagrama de puntos del efecto del tratamiento con AA (200 y 1000 $\mu$ M) sobre la muerte y niveles de ROS a las 3 y 24h de tratamiento. **B)** Efecto del tratamiento con AA (200 y 1000 $\mu$ M) sobre la muerte celular post isquemia y reperfusión, el tratamiento con AA tanto en baja como alta concentración no produce un efecto en la muerte de HBMEC (ANOVA p: 0,7912, ns). **C)** Efecto de 3 y 24h de tratamiento con AA (200 y 1000 $\mu$ M) sobre los niveles de ROS post isquemia y reperfusión. A las 3h tto los niveles de ROS se encuentran significativamente elevados con respecto al control, mientras que a las 24h tto los niveles de ROS descienden significativamente con respecto a las 3h tto (ANOVA p: <0,0001, s). Sin embargo, tanto a las 3h como a las 24h no existen diferencias significativas entre las condiciones con tratamiento de AA (200 y 1000  $\mu$ M) con respecto a las sin tratamiento (ANOVA p: 0,0704, ns).





## 8. DISCUSIÓN

En la literatura, son muchas las investigaciones que proponen a la vitamina C para tratar diversas patologías, esto debido al potente poder antioxidante que posee el ascorbato. La captación del AA por las células se hace a través de los co-transportadores de Na-AA, SVCTs (Munoz-Montesino et al., 2021), por lo que es sumamente interesante y relevante determinar que ocurre con estos transportadores tanto en un contexto fisiológico como fisiopatológico.

En Chile, el accidente cerebro vascular es la segunda causa de muerte con 29.542 egresos hospitalarios (año 2021) y la primera causa de específica de años de vida saludables perdidos por discapacidad y muerte prematura en mayores de 74 años (Minsal, 2014) (MINSAL, 2014). De estos casos, más del 60% son de tipo isquémico (MINSAL, 2013), donde la oclusión de un vaso sanguíneo genera una disminución transitoria de los nutrientes y el oxígeno en la zona afectada. La isquemia por oclusión va seguida de una posterior reperusión que restablece el flujo sanguíneo de manera turbulenta, generando daño en la zona afectada. Estos dos factores del ACV producen daño a nivel cerebral, que ocasiona las múltiples secuelas permanentes o la muerte del paciente.

Son muchos los estudios que determinan que un componente importante en la patología y progresión de esta enfermedad es la disfunción de BHE (Blanchette & Daneman, 2015; Daneman, 2012; Daneman & Prat, 2015; Mark & Davis, 2002; Zlokovic, 2008), las células endoteliales que la componen sufren daño debido a los altos niveles de estrés oxidativo, provocando la pérdida de la integridad de la barrera y un aumento en su permeabilidad (Bernardo-Castro et al., 2020). Por lo cual, detener específicamente el daño de las células endoteliales es crucial para impedir el avance de la cadena de daño oxidativo que se va generando en el SNC (An & Xue, 2009; Li et al., 2021).

En el cerebro el AA se encuentra en altas concentraciones (Rivas et al., 2008) y dado su poder antioxidante, determinar cómo actúa sobre la BHE en un ACV podría ser un punto determinante para identificar posibles blancos terapéuticos de la patología. Por todo lo anterior, nos propusimos determinar que ocurre con los transportadores de vitamina C tanto en forma reducida (AA) como oxidada (DHA), en las células endoteliales que forman la BHE posterior a una isquemia y reperfusión.

### **8.1. Modelo de isquemia y reperfusión *in vitro*.**

Generamos un modelo que asemeja el daño que ocurre en un ACV a nivel de endotelio cerebral. Definimos los principales factores que generan daño en esta patología y con los cuales debía cumplir este modelo, siendo estos la isquemia, con una deficiencia de glucosa y oxígeno, y la reperfusión, donde ocurre la reoxigenación y se vuelve a condiciones normales.

El modelo de BHE *in vitro* fue generado a partir de monocultivo de células HBMEC, el cual se ha reportado en literatura es la mejor línea celular endotelial cerebral inmortalizada para generar modelos humano de BHE *in vitro* (Eigenmann et al., 2013), esto debido a que al compararla con otras líneas celulares como hCMEC/D3 o TY10, HBMEC demostró ser mejor en términos de hermeticidad de la barrera y permeabilidad paracelular en un sistema de monocultivo (Eigenmann et al., 2013), expresa proteínas de endotelio vascular y TJP (Buttmann et al., 2007; Eigenmann et al., 2013; Fletcher et al., 2012; Grab et al., 2004; Palmela et al., 2012; Schubert-Unkmeir et al., 2010).

La línea celular HBMEC previamente habían sido caracterizadas en nuestro laboratorio, donde encontramos que estas células endoteliales al ser diferenciadas forman una barrera, son capaces de captar AA y expresan los transportadores funcionales SVCT1 y SVCT2 (Guzmán, 2004; Inostroza et al., 2023)(datos no publicados). Al determinar el comportamiento que poseen estas células en cultivo demostramos que estas células aumentan su proliferación

hasta llegar a un plateau al día 10 que se mantiene posteriormente, donde su confluencia es cercana al 100% y no se ve afectada su viabilidad. Para confirmar si estas células que llegan a un plateau están diferenciadas, se evaluó mediante inmunofluorescencia la proteína ZO-1, la cual es parte de las proteínas de uniones estrechas u ocluyentes que poseen las células endoteliales para formar la barrera hematoencefálica (Li et al., 2021; Wong et al., 2013). Las imágenes obtenidas indicaron un aumento en la expresión de la proteína ZO-1 (verde) en las células HBMEC al aumentar los DIV, observamos que hay una diferencia significativa en la expresión de la proteína a las 12 DIV con respecto a los 4 y 8 DIV ( $p < 0,0001$ ). Lo cual coincide con los datos previos de nuestro equipo de trabajo, donde determinamos que las HBMEC al ser diferenciadas por tiempos mayores a 4 DIV, presentan un aumento de la resistencia eléctrica transendotelial de la monocapa y una disminución de la permeabilidad, que llega a valores constantes desde los 10 DIV en adelante, lo que sugiere la formación de una barrera celular (Guzmán, 2004)(datos no publicados). Por lo tanto, las HBMEC cumplen con la característica primordial para ser considerada célula endotelial de barrera hematoencefálica, expresar las proteínas de uniones estrechas que mantienen la integridad de la BHE (Urich et al., 2012; Weksler et al., 2013; Weksler et al., 2005).

Luego de establecer el modelo de BHE *in vitro* se procedió a determinar el control positivo del modelo de isquemia y reperfusión. Son muchas las opciones que se reportan en literatura para efectuar una hipoxia *in vitro*, siendo las más utilizadas las hipoxias químicas, donde un agente mimético de hipoxia estabiliza a HIF1- $\alpha$  para que pueda translocar al núcleo y unirse a HRE para transcribir múltiples genes dependientes de hipoxia (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009; Davis et al., 2018). Estos reactivos son clasificados dependiendo de su mecanismos para lograr esta estabilización, existiendo los quelantes de hierro como el DFO, los análogos de 2- oxoglutarato como DMOG y los competidores de hierro como el  $\text{CoCl}_2$  (Davis et al., 2018). En este estudio se usó cloruro de

cobalto, debido a que en algunas líneas celulares estabiliza mejor a HIF1- $\alpha$  (Ge et al., 2016). Para usar el CoCl<sub>2</sub> en tratamientos, se tuvo que determinar la concentración y tiempo de incubación óptima para ser utilizado como control positivo de hipoxia e isquemia. Determinamos que tanto con 6 como 12 horas de incubación no hay grandes efectos en la viabilidad de las HBMECi, incluso tratando con concentraciones altas de CoCl<sub>2</sub> (1000 $\mu$ M). Por otro lado, con 24 horas de incubación se evidenció un efecto en la viabilidad a partir de los 500 $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub>, que al compararlo con el control sin CoCl<sub>2</sub> la viabilidad es significativamente menor (p: <0,0001). Por lo tanto, 24 horas es el tiempo de incubación necesario para ver un efecto de la hipoxia química, donde a partir de los 500  $\mu$ M comienza a verse afectada significativamente la viabilidad con respecto al control (p: <0,0001) y a partir de los 800  $\mu$ M la viabilidad desciende a menos del 50%. Sin embargo, cuando calculamos el LD<sub>50</sub> en células HBMEC diferenciadas obtuvimos 1997  $\pm$  228  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> (R<sup>2</sup>: 0,9892; p: 0,3200). Lo cual puede estar indicando que las células endoteliales al formar la barrera endotelial son más resistentes que las HBMECi.

El LD<sub>50</sub> obtenido para HBMEC es una concentración elevada que no se condice con otros estudios reportados, donde habitualmente usan concentraciones desde los 30 a 100  $\mu$ M (Engelhardt et al., 2014; Page et al., 2016). Esta gran diferencia en los rangos de concentraciones creemos que es ocasionada por el fin con que se usa el reactivo, la mayoría de las publicaciones lo usa para generar hipoxia, pero solo tomando en cuenta la activación HIF1- $\alpha$ , mientras que en este estudio lo que se buscó era generar una hipoxia que desencadenara daño igualable al que se genera en la BHE por un ACV. Aun así, faltaron más estudios para determinar efectivamente si la pronunciada disminución de la viabilidad se debe al efecto de la hipoxia o si el CoCl<sub>2</sub> en altas concentraciones gatilla otros mecanismos de daño y muerte celular, ya que este sigue siendo un reactivo que difiere en algunos efectos al compararlo con una hipoxia propia mente tal (Calvo-Anguiano et al., 2018; Munoz-Sanchez &

Chanez-Cardenas, 2019). Sería interesante evaluar la expresión de HIF1- $\alpha$  en estas concentraciones y analizar cómo se ve afectado en estos rangos altos de concentraciones. Por lo anterior, aun cuando los resultados indicaron utilizar concentraciones más elevadas de CoCl<sub>2</sub>, se decidió utilizar para los futuros experimentos una concentración de 700  $\mu$ M, que se consideró que afectaba la viabilidad de HBMECi, pero no de manera tan abrupta como con 800  $\mu$ M.

Al evaluar el efecto del tiempo de hipoxia en HBMECi utilizamos una cámara de hipoxia (Stem Cell Technologies)(Sagrillo-Fagundes et al., 2018), que nos permite incubar las células con un 1%O<sub>2</sub>. Al directamente quitar el oxígeno del ambiente celular, se asemeja más a la hipoxia producida en un accidente cerebrovascular, obteniendo resultados más fidedignos de lo que ocurriría *in vivo* (Calvo-Anguiano et al., 2018; Ortega et al., 2017). Si bien en los tiempos mayores se ve una leve diferencia entre ambas condiciones, los resultados no son estadísticamente significativos (p: 0,0664). Al normalizar cada resultado de hipoxia con su correspondiente normoxia se obtuvo que a las 12 y 24 horas de hipoxia disminuyó significativamente el porcentaje a un 71% y 41% respectivamente (p: <0,0001). Estos resultados se condicen con la literatura, donde se ha reportado que a las 24 horas de hipoxia existen diferencias en la viabilidad y proliferación de las células HBMEC (Mata-Greenwood et al., 2017).

Con los resultados anteriores determinamos los parámetros básicos para implementar nuestro modelo de isquemia y reperfusión *in vitro* con HBMEC, luego procedimos a evaluar los niveles de expresión de HIF1- $\alpha$ . Como HIF1- $\alpha$  siempre está siendo expresado y luego degradado en las células, se detectó mediante western blot la proteína estabilizada que transloca al núcleo para unirse a HRE (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2009; Semenza, 2001). Encontramos una banda a los ~115 kDa y a los ~45 kDa, siendo la banda de 115 kDa la proteína de interés HIF1- $\alpha$  que posee un peso molecular cercano al reportado en literatura (Wang & Semenza, 1995), la proteína detectada de 45

kDa posiblemente es HIF1- $\alpha$  degradado, ya que HIF1- $\alpha$  en condiciones de normoxia posee una vida media de 5 minutos antes de ser llevado a su degradación (Fedele et al., 2002). HIF1- $\alpha$  (115 kDa) aumentó con respecto al control normoxia en las muestras de Isq-R de 0 y 5 horas de reperfusión, sin embargo a las 26 horas la proteína no fue detectada, lo que nos indica que luego de 26 horas de reperfusión HIF1- $\alpha$  vuelve a ser totalmente hidroxilado por PHD y llevado a su degradación proteosomal generando que este no pueda llegar al núcleo (Ke & Costa, 2006). Cuando comparamos las condiciones de Isq-R 5 horas con y sin tratamiento de AA, se evidenció que la muestra tratada con AA posee una menor expresión de HIF1- $\alpha$  en comparación a su control sin tratar, lo que podría estar indicando que el AA al ser un cofactor de la PHD está fomentando su acción y generando la hidroxilación de HIF1- $\alpha$  con mayor eficiencia que en la condición sin tratamiento. Esto es sumamente interesante de evaluar con mayor profundidad, ya que en otros estudios se ha demostrado que la deficiencia de HIF1- $\alpha$  y HIF2- $\alpha$  neuronal mejora la supervivencia neuronal en la fase aguda temprana después del ACV isquémico (Barteczek et al., 2017). Por lo que sería importante evaluar si esto ocurre de la misma manera en CE, ya que estas presentan un aumento mucho más elevado de HIF1- $\alpha$  que otras células de la NVU bajo condiciones de hipoxia (Engelhardt et al., 2015).

Con respecto a la baja marca que se obtuvo de la banda de HIF1- $\alpha$  en el western blot, posiblemente se deba a el tiempo prolongado que se sometieron las células a isquemia, ya que otros estudios han evaluado la expresión de esta proteína en CE de BHE, determinaron que HIF1- $\alpha$  aumenta su expresión a las 2 y 6 h de hipoxia y luego decrece a las 24 (Engelhardt et al., 2015).

Luego evaluamos el daño que nuestro modelo de Isq-R generaba en nuestro modelo de BHE, evidenciamos que luego de una isquemia de 24 horas la expresión de la proteína ZO-1 disminuye, lo cual indicó la presencia de daño endotelial con pérdida de la integridad de la BHE, donde posiblemente aumente

la permeabilidad de la barrera. Lo antes descrito coincide con lo reportado en literatura, donde se ha determinado que después de una isquemia se genera una alteración de las proteínas que componen las uniones estrechas y un aumento de la permeabilidad de la BHE (Jiao et al., 2011; Mark & Davis, 2002). Sería interesante evaluar si efectivamente ocurren cambios en la permeabilidad de la barrera endotelial tras la disminución de ZO-1, tal como se ha reportado en otros estudios con la evaluación de la tensión eléctrica transendotelial (TEER) o la transcitosis de las células endoteliales por ensayo de tinción Evans blue (Okada et al., 2020).

## **8.2. Expresión de transportadores de vitamina C en HBMEC post Isq-R.**

Mediante RT-qPCR e inmunofluorescencias determinamos la expresión y localización de los transportadores GLUT1, SVCT1 y SVCT2 posterior a una isquemia de 24 horas. Encontramos una disminución de la proteína y un aumento del ARNm de GLUT1 al tiempo 0h de reperusión, lo cual difiere con lo descrito en la literatura. GLUT1 es dependiente de HIF1- $\alpha$ , por lo cual a lo largo de los años se ha utilizado este transportador como marcador de hipoxia, si bien el ARNm aumento inmediatamente tras la isquemia al igual como se ha evidenciado en diversos estudios (Alquisiras-Burgos & Aguilera, 2022; Calvo-Anguiano et al., 2018; Singh et al., 2012), la proteína disminuyo su expresión, lo cual no concuerda con lo indicado en estudios anteriores (Mamun et al., 2020). Es posible que debido al daño ocasionado por la isquemia en las CE se haya generado una disminución de los transportadores GLUT1 y por lo mismo, el aumento de HIF1- $\alpha$  entre otras cosas, sea un mecanismo de compensación para generar un aumento en la expresión de esta proteína, lo que se ve reflejado en los altos niveles relativos de su ARNm.

Por otro lado, no esperábamos la disminución del ARNm y la proteína SVCT2 posterior a la isquemia, ya que en estudios con ratones se había visto un aumento de esta proteína posterior a Isq-R (Gess et al., 2011). Sin embargo,

esto sigue siendo un gran hallazgo, ya que no existe información en literatura sobre qué ocurre en modelos humanos con estos transportadores SVCTs en una isquemia. Además, estos resultados indican que el modelo en ratón no responde de la misma forma que un modelo experimental con células humanas, lo cual coincide con la evidencia científica, que ha demostrado que existen diferencias metabólicas entre el ratón y el humano. Una de estas diferencias es la síntesis de la vitamina C, el ratón es capaz de sintetizar vitamina C a partir de la glucosa gracias a la enzima GULO, mientras que los humanos carecen de esta enzima y solo pueden adquirir por la dieta (Munoz-Montesino et al., 2021). Por lo cual, el modelo en ratón no es totalmente homologable con la fisiología y fisiopatología humana.

Finalmente, determinamos un aumento de la proteína SVCT1 posterior a la isquemia, lo cual posiblemente se genera como un mecanismo compensatorio para captar más AA y poder contrarrestar el daño oxidativo que se genera producto de la isquemia, curiosamente, el ARNm de SVCT1 no se ve aumentado inmediatamente tras la isquemia, sino que as 48 horas de reperusión. Posiblemente las CE mientras fueron sometidas al estado de isquemia aumentaron su ARNm lo cual generó el aumento de la expresión de la proteína al tiempo 0h de reperusión.

Queda la duda, de que ocurre con la expresión proteica de cada transportador a las 24 y 48 horas de reperusión, al ver la expresión de sus ARNm intuimos que probablemente aumente GLUT1, SVCT1 se mantendrá elevado y SVCT2 se mantendrá disminuido.

Otro resultado importante de destacar es la expresión relativa del ARNm de GLUT1 con tratamiento de cloruro de cobalto, ya que este induce la translocación de HIF1- $\alpha$  y está demostrado que de esta forma genera el aumento del ARNm de GLUT1 (Alquisiras-Burgos & Aguilera, 2022; Davis et al., 2018). Esto no ocurre con el peróxido de hidrogeno, que se utilizó como control de estrés oxidativo en CE (Lee et al., 2004), por lo que el ARNm de GLUT1



aumenta solo por el efecto de la hipoxia. Este caso se repite con SVCT1, donde también se ve aumentado significativamente su ARNm en la condición  $\text{CoCl}_2$ , no obstante, también hay un leve aumento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aunque este no es significativo. Sería interesante profundizar más la investigación, y evaluar si HIF1- $\alpha$  se relaciona de alguna forma, directa o indirectamente, con los transportadores SVCTs.

### **8.3. Efecto de Isq-R sobre muerte celular y ROS.**

En este estudio evaluamos el daño en las HBMEC generado por la isquemia y reperfusión, donde nos enfocamos en dos grandes factores del daño en la BHE: niveles de ROS y muerte celular. La evaluación de ambos factores se hizo mediante citometría de flujo, en donde obtuvimos que en ninguna condición hubo un aumento del porcentaje de células muertas. Esto puede ser debido a que las células HBMEC diferenciadas por 14 DIV probablemente son mucho más resistentes que las HBMECi, por lo que la condición de Isq-R no alcanzó a gatillar la muerte celular.

Con respecto a los niveles de ROS, a las 5 horas de reperfusión se generó un alza en los niveles de ROS a un 91%, lo cual es estadísticamente significativo con respecto al control, que luego a las 26 horas decreció a un 36%, lo cual sigue siendo significativamente más elevado que el control de células en normoxia. Estos resultados nos indicaron que posterior a una isquemia, alrededor del 91% de las células comienza a elevar sus niveles de ROS. Esta alza en los niveles de ROS coincide con la mayoría de los reportes donde se ha relacionado el ACV con el estrés oxidativo, donde este último sería el causante de la disrupción de la BHE y todas las consecuencias que esto conlleva (Feng et al., 2023; Rodrigo et al., 2013). Por lo cual, este aumento de los niveles de ROS que evidenciamos en HBMEC probablemente sea el que en mayor parte causa el daño oxidativo y disfunción de la barrera que se observó por inmunofluorescencia con la disminución de ZO-1. Como se mencionó

anteriormente, queda para futuros estudios el evaluar que ocurre en estos tiempos de reperfusión con las proteínas de uniones estrechas y los transportadores de vitamina C. es posible que SVCT1 se mantenga elevado para compensar estos niveles de estrés oxidativo, pero queda la duda, ¿Por qué se eleva la expresión de SVCT1 y baja la de SVCT2?, posiblemente se deba al rol que cumple la vitamina C que dependiendo del ambiente redox en el que se encuentre tiene un efecto prooxidante o antioxidante, donde se ha reportado que en ambientes muy oxidantes esta puede favorecer aún más la oxidación debido a la reacción de fenton (Kaźmierczak-Barańska et al., 2020). SVCT2 posee mayor afinidad por el AA con una KM de 20 $\mu$ M, mientras que SVCT1 es menos afín con una KM de 100 $\mu$ M (Munoz-Montesino et al., 2021), por lo que disminuir SVCT2 y aumentar SVCT1 puede ser una medida de las CE para no captar AA en bajas concentraciones y de esta forma detener el rol prooxidante que puede llegar a tener el AA en bajas concentraciones en un ambiente muy oxidativo.

#### **8.4. Efecto de la vitamina C sobre muerte celular y niveles ROS post Isq-R.**

Finalmente, en este estudio se buscaba evaluar los efectos de la vitamina C sobre daño de las CE. Mediante citometría de flujo encontramos que a las 3 horas de tratamiento con AA no se vio diferencias entre las muestras tratadas y no tratadas, lo que posiblemente sea debido a que 3 horas de tratamiento es muy poco tiempo para evidenciar algún cambio sobre el daño oxidativo. Además, observamos que después de 26 horas de reperfusión (24h tto) disminuyen los niveles de ROS tanto en las muestras sin tratamiento como en las con tratamiento de AA. Si bien observamos una disminución mayor de los niveles de ROS con los tratamientos de 200 y 1000  $\mu$ M de AA (14% y 15%, respectivamente), estos no fueron estadísticamente significativos con respecto al sin tratar (36%) ( $p > 0,0704$ ). Sin embargo, al comparar estos niveles de ROS con el control (normoxia sin tratamiento, 0,5%), encontramos que la condición

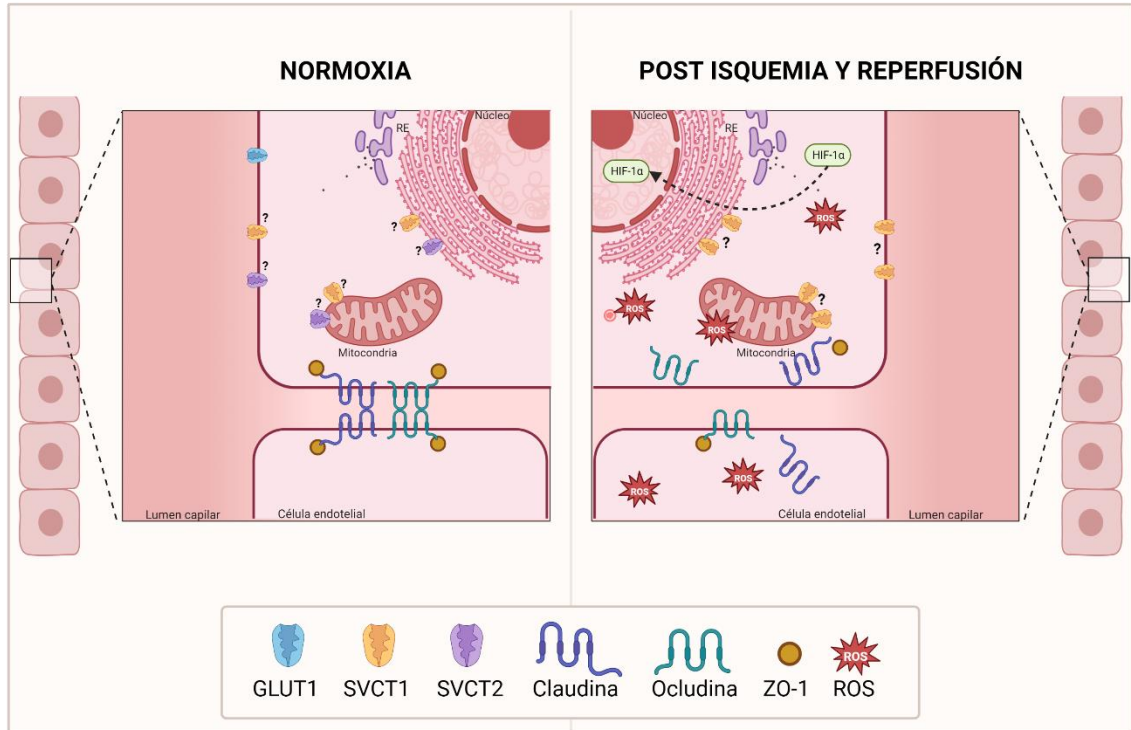
24h sin tratamiento sigue teniendo niveles significativamente mayores que los del control sin tratamiento ( $p > 0,0068$ ), mientras que los tratamientos de 200  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$  de AA disminuyen los niveles de ROS hasta no ser significativamente mayores que los de la condición control ( $p$ : 0,5492 y 0,7234, respectivamente). Lo que sugiere que el tratamiento con AA genera una mejor disminución de los niveles de ROS. La diferencia no significativa entre las condiciones con y sin tratamiento probablemente estén ocasionadas por la cantidad de muestras ( $n$ ) analizadas, creemos que aumentando el  $n$  posiblemente estos resultados se vuelvan estadísticamente significativo.

El tratamiento que se efectuó en este estudio se administró a las 2 horas de reperusión, esto se decidió con la consideración de que el ACV es una patología aguda, donde los procedimientos deben ser efectuados en corto plazo para poder frenar el daño a tiempo. En estudios de años anteriores ya se recomendaba que el tratamiento con vitamina C debe ser en altas dosis y a tiempos tempranos (Spoelstra-De Man et al., 2018). Si bien en literatura aún hay controversia con respecto a tratamientos con vitamina C, varios estudios no ven efectos significativos en algunos casos clínicos (Rabadi & Kristal, 2007) y otros evidencian un rol dañino donde la vitamina C induce muerte celular (Ferrada et al., 2020), existen múltiples estudios donde se afirma que esta cumple un rol beneficioso como lo es reducir las alteraciones de la BHE y la apoptosis neuronal cerebral (Chang et al., 2020) o mejorar la sobrevivencia de pacientes con traumatismo craneoencefálico (Macías Limón et al., 2021). Son muchos los estudios y múltiples los resultados, esto ocasionado por el tipo de modelo de estudio, las dosis y tiempos administrados, entre otros. Lo único claro es que se necesitan más ensayos clínicos prospectivos para confirmar el papel que cumple la vitamina C en el tratamiento del ACV y la eficacia de esta suplementación durante la patología (Tang et al., 2022).

Como se evidenció en esta investigación, ocurren cambios en los transportadores de vitamina C posterior a una isquemia y reperfusión en HBMEC (**Figura 14**), los cuales no han sido reportados en otros estudios, creemos que las investigaciones a futuro deberían focalizarse en esto e ir más allá de solo ver el efecto, darles la real importancia que poseen los transportadores ya que de ellos depende que la vitamina C pueda cumplir un rol en la patología, y quizás este sea el real blanco terapéutico. ¿Con que fin ocurren estos cambios en la expresión de los transportadores? ¿Qué mecanismo de acción está ejerciendo la vitamina C dentro de la célula? ¿El AA solo actúa neutralizando radicales o además interviene en otras vías como la de HIF1- $\alpha$ ? Estas son preguntas que esperamos en un futuro próximo poder contestar.

Solo queda recalcar la relevancia que poseen las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica, las cuales cumplen un rol protector y de ellas depende la integridad y buen funcionamiento de todo el cerebro. Estas reaccionan más fuerte y rápidamente a la privación de O<sub>2</sub> que otras células del cerebro (Engelhardt et al., 2015), por lo que revertir o prevenir el daño específicamente estas células es donde deberían apuntar los tratamientos para el ACV y otras patologías neuronales.

El estudio de estas dos aristas puede abrir las puertas a un nuevo blanco terapéutico para una patología que afecta a la población del país y hasta día de hoy no posee un tratamiento efectivo que mejore las probabilidades de sobrevivencia.



**Figura 14. Modelo propuesto del efecto de la isquemia y reperfusión sobre modelo de BHE *in vitro* y sus transportadores de vitamina C.**

En normoxia, las células HBMEC diferenciadas que conforman el modelo *in vitro* de BHE expresan TJP, transportadores de vitamina C GLUT1 (membrana) y SVCTs (localización indeterminada). Posterior a una isquemia y reperfusión hay un aumento en los niveles de ROS, la translocación de HIF1- $\alpha$  al núcleo, la disminución de la expresión de TJP (perdida de la integridad de la BHE), un aumento en la expresión de SVCT1 y una disminución de la expresión de GLUT1 y SVCT2.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS Barriers: Evolution, Differentiation, and Modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1), 5-23. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1374-y>
- Abbott, N. J., Rönnebeck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature reviews neuroscience*, 7(1), 41-53.
- Agarwal, S., MS Hartz, A., F Elmquist, W., & Bauer, B. (2011). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up. *Current pharmaceutical design*, 17(26), 2793-2802.
- Alizadeh, E., Mammadzada, P., & Andre, H. (2018). The Different Facades of Retinal and Choroidal Endothelial Cells in Response to Hypoxia. *Int J Mol Sci*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123846>
- Alkaitis, M. S., & Crabtree, M. J. (2012). Recoupling the Cardiac Nitric Oxide Synthases: Tetrahydrobiopterin Synthesis and Recycling. *Current Heart Failure Reports*, 9(3), 200-210. <https://doi.org/10.1007/s11897-012-0097-5>
- Allahtavakoli, M., Amin, F., Esmaeeli-Nadimi, A., Shamsizadeh, A., Kazemi-Arababadi, M., & Kennedy, D. (2015). Ascorbic Acid Reduces the Adverse Effects of Delayed Administration of Tissue Plasminogen Activator in a Rat Stroke Model. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 117(5), 335-339. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12413>
- Alquisiras-Burgos, I., & Aguilera, P. (2022). Involvement of glucose transporter overexpression in the protection or damage after ischemic stroke. *Neural Regeneration Research*, 17(4), 783.
- An, P., & Xue, Y. X. (2009). Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 1272, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.031>
- Apostolova, N., & Victor, V. M. (2015). Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal*, 22(8), 686-729. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5952>
- Arango-Dávila, C. A., & Pimienta, H. J. (2004). El cerebro: de la estructura y la función a la psicopatología: Primera parte: Bloques funcionales. *Revista colombiana de psiquiatría*, 33, 102-125.
- Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Transcytosis at the blood–brain barrier. *Current opinion in neurobiology*, 57, 32-38.
- Bartczek, P., Li, L., Ernst, A. S., Bohler, L. I., Marti, H. H., & Kunze, R. (2017). Neuronal HIF-1alpha and HIF-2alpha deficiency improves neuronal survival and sensorimotor function in the early acute phase after ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(1), 291-306. <https://doi.org/10.1177/0271678X15624933>

- Bernardo-Castro, S., Sousa, J. A., Brás, A., Cecília, C., Rodrigues, B., Almendra, L., Machado, C., Santo, G., Silva, F., & Ferreira, L. (2020). Pathophysiology of blood–brain barrier permeability throughout the different stages of ischemic stroke and its implication on hemorrhagic transformation and recovery. *Frontiers in Neurology*, *11*, 1605.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, *5*, 9-19.
- Blanchette, M., & Daneman, R. (2015). Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*, *138 Pt 1*, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.07.007>
- Bolton, S., Anthony, D., & Perry, V. (1998). Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood–brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*, *86*(4), 1245-1257.
- Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci*, *122*(Pt 8), 1055-1057. <https://doi.org/10.1242/jcs.035022>
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2010). NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(5), 687-706.
- Brennan, A. M., Won Suh, S., Joon Won, S., Narasimhan, P., Kauppinen, T. M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P. H., & Swanson, R. A. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature neuroscience*, *12*(7), 857-863.
- Bronger, H., König, J. r., Kopplow, K., Steiner, H.-H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Keppler, D., & Nies, A. T. (2005). ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer research*, *65*(24), 11419-11428.
- Brown, G. C., Murphy, M. P., Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in biochemistry*, *47*, 53-67.
- Buttmann, M., Lorenz, A., Weishaupt, A., & Rieckmann, P. (2007). Atorvastatin partially prevents an inflammatory barrier breakdown of cultured human brain endothelial cells at a pharmacologically relevant concentration. *Journal of neurochemistry*, *102*(4), 1001-1008.
- Calvo-Anguiano, G., Lugo-Trampe, J. J., Camacho, A., Said-Fernandez, S., Mercado-Hernandez, R., Zomosa-Signoret, V., Rojas-Martinez, A., & Ortiz-Lopez, R. (2018). Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models. *Exp Ther Med*, *15*(6), 4777-4784. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6048>
- Capellmann, M., Becka, M., & Bolt, H. (1994). A note on distribution of human plasma levels of ascorbic and dehydroascorbic acid. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *45*(1).
- Cardoso, S., Correia, S., Carvalho, C., Candeias, E., Plácido, A. I., Duarte, A. I., Seíça, R. M., & Moreira, P. I. (2015). Perspectives on mitochondrial

- uncoupling proteins-mediated neuroprotection. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(1-2), 119-131. <https://doi.org/10.1007/s10863-014-9580-x>
- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB journal*, 13(9), 1007-1024.
- Chang, C.-Y., Chen, J.-Y., Chen, S.-H., Cheng, T.-J., Lin, M.-T., & Hu, M.-L. (2016). Therapeutic treatment with ascorbate rescues mice from heat stroke-induced death by attenuating systemic inflammatory response and hypothalamic neuronal damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 93, 84-93.
- Chang, C. Y., Chen, J. Y., Wu, M. H., & Hu, M. L. (2020). Therapeutic treatment with vitamin C reduces focal cerebral ischemia-induced brain infarction in rats by attenuating disruptions of blood brain barrier and cerebral neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 155, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.015>
- Chen, G. C., Lu, D. B., Pang, Z., & Liu, Q. F. (2013). Vitamin C Intake, Circulating Vitamin C and Risk of Stroke: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Journal of the American Heart Association*, 2(6), e000329-e000329. <https://doi.org/10.1161/jaha.113.000329>
- Coronado, H., Vega y Leon, S., Gutierrez, T., Vazquez, F., & Radilla, C. (2015). Antioxidants: present perspective for the human health. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- Corpe, C. P., Eck, P., Wang, J., Al-Hasani, H., & Levine, M. (2013). Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9092-9101.
- Correale, J., & Villa, A. (2007). The blood–brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*, 40(2), 148-160.
- Daneman, R. (2012). The blood–brain barrier in health and disease. *Annals of neurology*, 72(5), 648-672.
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Davis, C. K., Jain, S. A., Bae, O. N., Majid, A., & Rajanikant, G. K. (2018). Hypoxia Mimetic Agents for Ischemic Stroke. *Front Cell Dev Biol*, 6, 175. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00175>
- De Pascali, F., Hemann, C., Samons, K., Chen, C.-A., & Zweier, J. L. (2014). Hypoxia and Reoxygenation Induce Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling in Endothelial Cells through Tetrahydrobiopterin Depletion and S-Glutathionylation. *Biochemistry*, 53(22), 3679-3688. <https://doi.org/10.1021/bi500076r>
- Desai, B. S., Monahan, A. J., Carvey, P. M., & Hendey, B. (2007). Blood–brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell transplantation*, 16(3), 285-299.



- Dhar-Mascreño, M., Cárcamo, J. M., & Golde, D. W. (2005). Hypoxia–reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(10), 1311-1322.
- Dolman, D., Drndarski, S., Abbott, N. J., & Rattray, M. (2005). Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. *Journal of neurochemistry*, 93(4), 825-833.
- Dong, X. (2018). Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*, 8(6), 1481-1493. <https://doi.org/10.7150/thno.21254>
- Dröse, S., & Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Nuclear-Encoded Genes, Enzyme Regulation, and Pathophysiology*, 145-169.
- Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., Moses, A. V., Hamburger, M., & Oufir, M. (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood–brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 1-17.
- Eisenblätter, T., & Galla, H.-J. (2002). A new multidrug resistance protein at the blood–brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(4), 1273-1278.
- Engelhardt, S., Al-Ahmad, A. J., Gassmann, M., & Ogunshola, O. O. (2014). Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J Cell Physiol*, 229(8), 1096-1105. <https://doi.org/10.1002/jcp.24544>
- Engelhardt, S., Huang, S. F., Patkar, S., Gassmann, M., & Ogunshola, O. O. (2015). Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. *Fluids Barriers CNS*, 12, 4. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-12-4>
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., & Dhanda, A. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.
- Fedele, A. O., Whitelaw, M. L., & Peet, D. J. (2002). Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Molecular interventions*, 2(4), 229.
- Feng, S., Yang, M., Liu, S., He, Y., Deng, S., & Gong, Y. (2023). Oxidative stress as a bridge between age and stroke: A narrative review. *Journal of Intensive Medicine*.

- Ferrada, L., Barahona, M. J., Salazar, K., Vandenabeele, P., & Nualart, F. (2020). Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress. *Redox Biol*, 29, 101408. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101408>
- Feuerstein, G., Liu, T., & Barone, F. (1994). Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*, 6(4), 341-360.
- Fletcher, N. F., Wilson, G. K., Murray, J., Hu, K., Lewis, A., Reynolds, G. M., Stamataki, Z., Meredith, L. W., Rowe, I. A., & Luo, G. (2012). Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology*, 142(3), 634-643. e636.
- Flora, G., Mittal, M., & Flora, S. J. (2015). Medical countermeasures—chelation therapy. In *Handbook of arsenic toxicology* (pp. 589-626). Elsevier.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
- Ge, X., Liu, X., Lin, F., Li, P., Liu, K., Geng, R., Dai, C., Lin, Y., Tang, W., & Wu, Z. (2016). MicroRNA-421 regulated by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis, inhibits apoptosis, and induces cisplatin resistance by targeting E-cadherin and caspase-3 in gastric cancer. *Oncotarget*, 7(17), 24466.
- Gess, B., Rohr, D., & Young, P. (2013). Ascorbic acid and sodium-dependent vitamin C transporters in the peripheral nervous system: from basic science to clinical trials. *Antioxid Redox Signal*, 19(17), 2105-2114. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5380>
- Gess, B., Sevimli, S., Strecker, J. K., Young, P., & Schabitz, W. R. (2011). Sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2) expression and activity in brain capillary endothelial cells after transient ischemia in mice. *PLoS One*, 6(2), e17139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017139>
- Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuniga, F. A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., Guzman, C., Villagran, M., Aguayo, L. G., Onate, S. A., Reyes, A. M., Carcamo, J. G., Rivas, C. I., & 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608300200>
- González-Mangado, N., & Morera Prat, J. (2001). Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Archivos de Bronconeumología*, 37(10), 407-409. [https://doi.org/10.1016/s0300-2896\(01\)75109-5](https://doi.org/10.1016/s0300-2896(01)75109-5)
- Grab, D. J., Nikolskaia, O., Kim, Y. V., Lonsdale-Eccles, J. D., Ito, S., Hara, T., Fukuma, T., Nyarko, E., Kim, K. J., & Stins, M. F. (2004). African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Journal of Parasitology*, 90(5), 970-979.
- Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6, 524-551. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>

- Guarnieri, C., Flamigni, F., & Calderera, C. (1980). Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 12(8), 797-808.
- Guzmán, C. G. (2004). *EXPRESION POLARIZADA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y VITAMINA C EN CELULAS INMORTALIZADAS DE MICROVASCULATURA CEREBRAL HUMANA*.
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 21(6), 894-899. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.005>
- Henry, P. T., & Chandy, M. J. (1998). Effect of Ascorbic Acid on Infarct Size in Experimental Focal Cerebral Ischaemia and Reperfusion in a Primate Model. *Acta Neurochirurgica*, 140(9), 977-980. <https://doi.org/10.1007/s007010050201>
- Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical neurology*, 66(3), 232-245.
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Inostroza, E., Guzman, C., Arriagada-Cancino, S., & Rivas, C. I. (2023). *Characterization of vitamin C transporters in an in vitro blood-brain barrier model*.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y.-M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. v., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., & Schofield, C. J. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468-472.
- Jiao, H., Wang, Z., Liu, Y., Wang, P., & Xue, Y. (2011). Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood–brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44, 130-139.
- Jin, J., Fang, F., Gao, W., Chen, H., Wen, J., Wen, X., & Chen, J. (2021). The structure and function of the glycocalyx and its connection with blood-brain barrier. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 739699.
- Jung, J. E., Kim, G. S., Chen, H., Maier, C. M., Narasimhan, P., Song, Y. S., Niizuma, K., Katsu, M., Okami, N., & Yoshioka, H. (2010). Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Molecular neurobiology*, 41, 172-179.
- Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 1-24.
- Kaelin, W. G., Jr., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30(4), 393-402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>

- Kahles, T., & Brandes, R. P. (2013). Which NADPH Oxidase Isoform Is Relevant for Ischemic Stroke? The Case for Nox 2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(12), 1400-1417. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4721>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4). McGraw-hill New York.
- Kaur, C., & Ling, E. (2008). Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Current neurovascular research*, 5(1), 71-81.
- Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszewska, K., Adamus-Grabicka, A., & Karwowski, B. T. (2020). Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*, 12(5), 1501. <https://doi.org/10.3390/nu12051501>
- Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70(5), 1469-1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
- Kidwell, C. S., Saver, J. L., Mattiello, J., Starkman, S., Vinuela, F., Duckwiler, G., Gobin, Y. P., Jahan, R., Vespa, P., & Kalafut, M. (2000). Thrombolytic reversal of acute human cerebral ischemic injury shown by diffusion/perfusion magnetic resonance imaging. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 47(4), 462-469.
- Kietadisorn, R., Juni, R. P., & Moens, A. L. (2012). Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302(5), E481-E495.
- Kleikers, P. W. M., Wingler, K., Hermans, J. J. R., Diebold, I., Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Janssen, B., Görlach, A., & Schmidt, H. H. H. W. (2012). NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular Medicine*, 90(12), 1391-1406. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0963-3>
- Knox, E. G., Aburto, M. R., Clarke, G., Cryan, J. F., & O'Driscoll, C. M. (2022). The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Molecular Psychiatry*, 27(6), 2659-2673. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
- Labbé Atenas, T., Busquets Escuer, J., Venegas Araneda, P., Neira Ojeda, C., Santos Carquin, I., & Paccot Burnens, M. (2018). Ataque cerebrovascular: Salud Pública cuando el tiempo es cerebro. *Revista médica de Chile*, 146(10), 1225-1226. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018001001225>
- Lambeth, J. D., Krause, K.-H., & Clark, R. A. (2008). NOX enzymes as novel targets for drug development. *Seminars in Immunopathology*, 30(3), 339-363. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0123-6>
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic

- switch. *Science*, 295(5556), 858-861.  
<https://doi.org/10.1126/science.1068592>
- Lee, H. S., Namkoong, K., Kim, D. H., Kim, K. J., Cheong, Y. H., Kim, S. S., Lee, W. B., & Kim, K. Y. (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 68(3), 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2004.07.005>
- Lee, Y.-C., Huang, H.-Y., Chang, C.-J., Cheng, C.-H., & Chen, Y.-T. (2010). Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Human molecular genetics*, 19(19), 3721-3733.
- Levine, M., Ebeuwa, I., & Violet, P.-C. (2020). Vitamin C. In *Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health* (pp. 241-262). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805378-2.00018-8>
- Li, C., Zhang, Y., Liu, R., & Mai, Y. (2021). Anagliptin Protected against Hypoxia/Reperfusion-Induced Brain Vascular Endothelial Permeability by Increasing ZO-1. *ACS Omega*, 6(11), 7771-7777. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00242>
- Li, F., Silva, M. D., Liu, K. F., Helmer, K. G., Omae, T., Fenstermacher, J. D., Sotak, C. H., & Fisher, M. (2000). Secondary decline in apparent diffusion coefficient and neurological outcomes after a short period of focal brain ischemia in rats. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 48(2), 236-244.
- Liebner, S., Czupalla, C. J., & Wolburg, H. (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. *International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), 467-476.
- Linowiecka, K., Foksinski, M., & Brozyna, A. A. (2020). Vitamin C Transporters and Their Implications in Carcinogenesis. *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123869>
- Lukyanova, L., Kirova, Y. I., & Germanova, E. (2018). The role of succinate in regulation of immediate HIF-1 $\alpha$  expression in hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 164, 298-303.
- Macías Limón, J. D. d. J., Hernández Plata, A. E., Bravo Santibáñez, E., & Hernández, M. A. (2021). Uso de ácido ascórbico en pacientes con traumatismo craneoencefálico severo y su impacto en el tiempo de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos adultos. *Medicina crítica (Colegio Mexicano de Medicina Crítica)*, 35(3), 136-143.
- Mamun, A. A., Hayashi, H., Yamamura, A., Nayeem, M. J., & Sato, M. (2020). Hypoxia induces the translocation of glucose transporter 1 to the plasma membrane in vascular endothelial cells. *The Journal of Physiological Sciences*, 70(1), 1-15.
- Mandl, J., Szarka, A., & Banhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 157(7), 1097-1110. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x>

- Mardones, L., Ormazabal, V., Romo, X., Jaña, C., Binder, P., Peña, E., Vergara, M., & Zúñiga, F. A. (2011). The glucose transporter-2 (GLUT2) is a low affinity dehydroascorbic acid transporter. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(1), 7-12.
- Mark, K. S., & Davis, T. P. (2002). Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282(4), H1485-H1494.
- Mata-Greenwood, E., Goyal, D., & Goyal, R. (2017). Comparative and Experimental Studies on the Genes Altered by Chronic Hypoxia in Human Brain Microendothelial Cells. *Front Physiol*, 8, 365. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00365>
- Mayor Oxilia, R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista del instituto de medicina tropical*, 5(2), 23-29.
- McGarry, T., Binięcka, M., Veale, D. J., & Fearon, U. (2018). Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med*, 125, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042>
- Michels, A. J., Hagen, T. M., & Frei, B. (2013). Human genetic variation influences vitamin C homeostasis by altering vitamin C transport and antioxidant enzyme function. *Annual review of nutrition*, 33, 45-70.
- Mies, G., Ishimaru, S., Xie, Y., Seo, K., & Hossmann, K.-A. (1991). Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 11(5), 753-761.
- MINSAL. (2013). *Guia Clinica Auge, Accidente Cerebro Vascular*.
- Minsal. (2014). *Minuta Ataque Cerebro Vascular*.
- Munoz-Montesino, C., Pena, E., Roa, F. J., Sotomayor, K., Escobar, E., & Rivas, C. I. (2021). Transport of Vitamin C in Cancer. *Antioxid Redox Signal*, 35(1), 61-74. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8166>
- Munoz-Sanchez, J., & Chanez-Cardenas, M. E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*, 39(4), 556-570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>
- Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 73, 26-33.
- Okada, T., Suzuki, H., Travis, Z. D., & Zhang, J. H. (2020). The stroke-induced blood-brain barrier disruption: current progress of inspection technique, mechanism, and therapeutic target. *Current Neuropharmacology*, 18(12), 1187-1212.
- Ortega, O., Ondo-Mendez, A., & Garzon, R. (2017). [STAT3 activation by hypoxia in in vitro models of cervix cancer and endothelial cells]. *Biomedica*, 37(1), 119-130. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3225>
- Page, S., Munsell, A., & Al-Ahmad, A. J. (2016). Cerebral hypoxia/ischemia selectively disrupts tight junctions complexes in stem cell-derived human

- brain microvascular endothelial cells. *Fluids Barriers CNS*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12987-016-0042-1>
- Palmela, I., Sasaki, H., Cardoso, F. L., Moutinho, M., Kim, K. S., Brites, D., & Brito, M. A. (2012). Time-dependent dual effects of high levels of unconjugated bilirubin on the human blood-brain barrier lining. *Frontiers in cellular neuroscience*, 6, 22.
- Pardridge, W. M. (2015). Blood–brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert opinion on therapeutic targets*, 19(8), 1059-1072.
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J., & Yang, J. (1985). Human blood—brain barrier insulin receptor. *Journal of neurochemistry*, 44(6), 1771-1778.
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., & Kanmogne, G. D. (2006). Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1, 223-236.
- Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A., & Brand, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*, 287(32), 27255-27264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>
- Rabadi, M. H., & Kristal, B. S. (2007). Effect of vitamin C supplementation on stroke recovery: a case-control study. *Clinical interventions in aging*, 2(1), 147-151.
- Rahme, R., Curry, R., Kleindorfer, D., Khoury, J. C., Ringer, A. J., Kissela, B. M., Alwell, K., Moomaw, C. J., Flaherty, M. L., Khatri, P., Woo, D., Ferioli, S., Broderick, J., & Adeoye, O. (2012). How often are patients with ischemic stroke eligible for decompressive hemicraniectomy? *Stroke*, 43(2), 550-552. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.635185>
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Remy, S., & Beck, H. (2006). Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*, 129(1), 18-35.
- Ridder, D. A., Wenzel, J., Muller, K., Tollner, K., Tong, X. K., Assmann, J. C., Stroobants, S., Weber, T., Niturad, C., Fischer, L., Lembrich, B., Wolburg, H., Grand'Maison, M., Papadopoulos, P., Korpos, E., Truchetet, F., Rades, D., Sorokin, L. M., Schmidt-Supprian, M., . . . Schwaninger, M. (2015). Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *J Exp Med*, 212(10), 1529-1549. <https://doi.org/10.1084/jem.20150165>
- Rivas, C., Zuniga, F., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., & Vera, J. (2008). Vitamin C transporters. *Journal of physiology and biochemistry*, 64, 357-375.

- Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Manuel Matamala, J., Carrasco, R., Miranda-Merchak, A., & Feuerhake, W. (2013). Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 12(5), 698-714.
- Rowe, G. T., Eaton, L. R., & Hess, M. L. (1984). Neutrophil-derived, oxygen free radical-mediated cardiovascular dysfunction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 16(11), 1075-1079.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28246-28253.
- Saeed, S. A., Shad, K. F., Saleem, T., Javed, F., & Khan, M. U. (2007). Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *Experimental brain research*, 182, 1-10.
- Sagrillo-Fagundes, L., Laurent, L., Bienvenue-Pariseault, J., & Vaillancourt, C. (2018). In Vitro Induction of Hypoxia/Reoxygenation on Placental Cells: A Suitable Model for Understanding Placental Diseases. *Methods Mol Biol*, 1710, 277-283. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_21)
- Salazar, K., Martinez, F., Perez-Martin, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., Espinoza, F., Saldivia, N., Bertinat, R., Forman, K., Oviedo, M. J., Lopez-Gambero, A. J., Bonansco, C., Bongarzone, E. R., & Nualart, F. (2018). SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Mol Neurobiol*, 55(7), 5439-5452. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0762-5>
- Sanderson, T. H., Reynolds, C. A., Kumar, R., Przyklenk, K., & Hüttemann, M. (2013). Molecular Mechanisms of Ischemia–Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation. *Molecular neurobiology*, 47(1), 9-23. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8344-z>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0555-7>
- Schubert-Unkmeir, A., Konrad, C., Slanina, H., Czapek, F., Hebling, S., & Frosch, M. (2010). Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS pathogens*, 6(4), e1000874.
- Semenza, G. L. (2001). HIF1 and mechanisms of hypoxia sensing.
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., & Friedman, A. (2015). Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*, 38, 2-6. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.002>
- Sethi, K., Rao, K., Bolton, D., Patel, O., & Ischia, J. (2018). Targeting HIF-1alpha to Prevent Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Does It Work? *Int J Cell Biol*, 2018, 9852791. <https://doi.org/10.1155/2018/9852791>



- Shi, Y., Jiang, X., Zhang, L., Pu, H., Hu, X., Zhang, W., Cai, W., Gao, Y., Leak, R. K., Keep, R. F., Bennett, M. V., & Chen, J. (2017). Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(7), E1243-E1252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621174114>
- Singh, N., Sharma, G., & Mishra, V. (2012). Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol*, 32(4), 491-507. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9803-9>
- Siu, K. L., Lotz, C., Ping, P., & Cai, H. (2015). Netrin-1 abrogates ischemia/reperfusion-induced cardiac mitochondrial dysfunction via nitric oxide-dependent attenuation of NOX4 activation and recoupling of NOS. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 78, 174-185. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.07.005>
- Soares, R. O. S., Losada, D. M., Jordani, M. C., Évora, P., & Castro-E-Silva, O. (2019). Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5034. <https://doi.org/10.3390/ijms20205034>
- Spoelstra-De Man, A. M. E., Elbers, P. W. G., & Oudemans-Van Straaten, H. M. (2018). Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury. *Critical Care*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-018-1996-y>
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- Tang, X., Liu, H., Xiao, Y., Wu, L., & Shu, P. (2022). Vitamin C Intake and Ischemic Stroke. *Frontiers in Nutrition*, 9.
- Tu, H., Wang, Y., Li, H., Brinster, L. R., & Levine, M. (2017). Chemical Transport Knockout for Oxidized Vitamin C, Dehydroascorbic Acid, Reveals Its Functions in vivo. *EBioMedicine*, 23, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.08.017>
- Urich, E., Lazic, S. E., Molnos, J., Wells, I., & Freskgård, P.-O. (2012). Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One*, 7(5), e38149.
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 68, 403-429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>
- Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischbarg, J., & Golde, D. W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*, 364, 79-82.

- Vickers, S., Schiller, H. J., Hildreth, J. E., & Bulkley, G. B. (1998). Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of the endothelial cell plasma membrane. *Surgery*, *124*(3), 551-560.
- Villagrán, M., Muñoz, M., Díaz, F., Troncoso, C., Celis-Morales, C., & Mardones, L. (2019). Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad. *Revista chilena de nutrición*, *46*(6), 800-808. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182019000600800>
- Wahlgren, N. G., & Ahmed, N. (2003). Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies—the need for new approaches. *Cerebrovascular diseases*, *17*(Suppl. 1), 153-166.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(3), 1230-1237. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1230>
- Weksler, B., Romero, I. A., & Couraud, P.-O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, *10*(1), 1-10.
- Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., & Couraud, P. O. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*, *19*(13), 1872-1874. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3458fie>
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., & Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng*, *6*, 7. <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>
- Xiang, J., Andjelkovic, A. V., Zhou, N., Hua, Y., Xi, G., Wang, M. M., & Keep, R. F. (2018). Is there a central role for the cerebral endothelium and the vasculature in the brain response to conditioning stimuli? *Conditioning medicine*, *1*(5), 220.
- Yang, C. S., Guo, A., Li, Y., Shi, K., Shi, F. D., & Li, M. (2019). DI-3-n-butylphthalide Reduces Neurovascular Inflammation and Ischemic Brain Injury in Mice. *Aging Dis*, *10*(5), 964-976. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0608>
- Yang, H. (2013). Conserved or lost: molecular evolution of the key gene GULO in vertebrate vitamin C biosynthesis. *Biochemical genetics*, *51*, 413-425.
- Zhang, R., Chopp, M., Zhang, Z., Jiang, N., & Powers, C. (1998). The expression of P-and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain research*, *785*(2), 207-214.
- Zhang, W., Smith, C., Howlett, C., & Stanimirovic, D. (2000). Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1 $\beta$ . *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *20*(6), 967-978.

- Zhang, Y., & Pardridge, W. M. (2001). Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood–brain barrier. *Journal of neurochemistry*, 76(5), 1597-1600.
- Zhu, P., Ning, Y., Yao, L., Chen, M., & Xu, C. (2010). The proliferation, apoptosis, invasion of endothelial-like epithelial ovarian cancer cells induced by hypoxia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 124. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-124>
- Zlokovic, B. V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.

