



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Magíster en Neurobiología

Rol de SVCT2 mitocondrial en el contexto de la enfermedad de Alzheimer

Tesis para optar al grado de Magíster en Neurobiología

KATHLEEN PAULA VERÓNICA ESCOBAR ACUÑA

CONCEPCIÓN, CHILE

MARZO DEL 2021

Profesor Guía: Carola Muñoz Montesino

Departamento de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en los Departamentos de Fisiología y Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Carola Muñoz M.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía



Dr. Gustavo Moraga C.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora:

Dr. Jorge Fuentealba A.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Francisco Roa C.
Evaluador Externo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Gonzalo Yévenes C.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
LISTA ABREVIACIONES	IX
RESUMEN.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedades neurodegenerativas	1
1.2 Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer	8
1.3.1 Proteínas asociadas a ovillos y placas seniles.....	8
1.4. Disfunción mitocondrial.....	10
1.4.1 Estrés oxidativo en la Enfermedad de Alzheimer	12
1.5 Vitamina C	15
1.5.1 Formas de la vitamina C.....	16
1.5.2 Transporte de la vitamina C	19
1.5.3 Vitamina C en el cerebro.....	24
1.5.4 Transporte de vitamina C en el cerebro	25

1.5.5 Transporte intracelular de vitamina C.....	26
1.5.6 Vitamina C y estrés oxidativo	31
1.5.7 Vitamina C y enfermedad de Alzheimer	32
2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1 Cultivo celular	39
5.1.1 Cultivo celular de HEK 293.....	39
5.1.2 Cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón	39
5.2 Vectores.....	40
5.2.1 Vector pUC-SVCT2-373.....	40
5.2.2 Vector pEGFP-C2.....	40
5.3 Generación del vector pEGFP-C2-SCVT2 373.....	41
5.4 Purificación de plásmido	41
5.5 Tratamientos celulares.....	42
5.5.1 Transfección celular	42
5.6 Agregación de oligómeros solubles del péptido A β ₁₋₄₀	42
5.7 Inmufluorescencia.....	42

5.8 Bioinformática	43
5.8.1 Predicción estructural de SVCT2 <i>in silico</i>	43
5.9 Análisis estadísticos.....	44
6. RESULTADOS	45
6.1 Identificar el transportador de AA mitocondrial y expresarlo en células HEK para analizar su capacidad de transporte	45
6.1.1 Análisis <i>in silico</i> de secuencias que codifiquen para el transportador mitocondrial de ácido ascórbico	45
6.1.2 Subclonamiento de SVCT 272 en el plásmido pEGFP-C2.....	48
6.1.3 Expresión de SVCT2-373 en la línea celular HEK 293.....	53
6.1.4 Modelamiento <i>in silico</i> por homología de SVCT2-373.....	56
6.2 Caracterizar la expresión endógena del transportador mitocondrial en neuronas hipocampales y determinar cambios en los niveles de expresión y localización en respuesta a A β oligomérico.	63
6.2.1 Caracterización del modelo a utilizar y medios de detección	63
6.2.2 Caracterización de la expresión de transportadores de ácido ascórbico en neuronas hipocampales sometidas a tratamiento con a β oligomérico	68
7. DISCUSIÓN.....	76
7.1 Expresión exógena de SVCT2-373 en la línea celular HEK 293	76
7.2 Caracterización de la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en	

neuronas hipocampales de ratón..... 82

8. BIBLIOGRAFÍA..... 88



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas de la vitamina C.....	17
Figura 2. Biosíntesis del ácido ascórbico en mamíferos.....	18
Figura 3. Transportadores de vitamina C.	22
Figura 4. Distribución de vitamina C en tejidos.....	23
Figura 5. La expresión de mitSVCT2 aumenta en respuesta a un ambiente pro-oxidante.	29
Figura 6. Respuesta fisiológica a concentraciones fisiológicas de AA.	30
Figura 7. El modelo animal de AD expresa SVCT2.....	36
Figura 8. Esquema topológico del transportador de ácido ascórbico SVCT2.....	47
Figura 9. Esquema de subclonamiento de SVCT2-373 en el plásmido pEGFP-C2.....	50
Figura 10. Ensayo de restricción del plásmido pUC57-SVCT2-373 con las enzimas EcoRI y SacII.....	51
Figura 11. Ensayo de restricción del plásmido pEGFP-SVCT2-373 con las enzimas EcoRI y SacII.....	52
Figura 12. Expresión de SVCT2-373 en células HEK transfectadas con el plásmido pEGFP-SVCT2-373.....	54
Figura 13. Colocalización de SVCT2-373 con los marcadores SVCT2, TOM20 y LAMP2.	55
Figura 14. Modelo in silico de SVCT2-373.	59
Figura 15. Alineamiento estructural de las predicciones de SVCT2 full length y SVCT2- 373 y los modelos generados.....	61
Figura 16. Energía total, docking score y deltaG de unión de modelos in silico.	62
Figura 17. Colocalización de la expresión de TOM20 y SVCT2 en células HEK 293....	65
Figura 18. Colocalización de la expresión de COXIV y SVCT2 en células HEK 293... ..	66
Figura 19. Expresión de MAP2 y GFAP en cultivos primarios de neuronas hipocampales.	67
Figura 20. Colocalización SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales.	70
Figura 21. Análisis de colocalización de SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales.	71
Figura 22. Colocalización SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales-superresolución.	73
Figura 23. Análisis de colocalización de SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales- superresolución.	74
Figura 24. Modelo propuesto de la expresión de SVCT2-373 como homodímero.	81
Figura 25. Modelo propuesto de la expresión de SVCT2 mitocondrial en neuronas hipocampales.	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....7



LISTA DE ABREVIACIONES

AA: ácido ascórbico

A β : beta amiloide

A β O: oligómeros de A β

AD: enfermedad de Alzheimer

AKR: aldo-keto reductasa

APOE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora amiloide

ATP: adenosina trifosfato

BACE: β -secretasa

BSA: albúmina de suero bovino

CMV: citomegalovirus

CO₂: dióxido de carbono

COXIV: citocromo c oxidasa IV

Cy: cianina

DHA: ácido deshidroascórbico

DIV: días in vitro

DMEM: Medio Águila Modificada de Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico



EGFP: proteína verde fluorescente

ETC: cadena transportadora de electrones

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

GLUT: transportador de glucosa

GSH: glutatión

GSTO: glutatión-S-transferasa omega

° C: grados Celsius

GULO: gulonolactona oxidasa

h: hora

HD: enfermedad de Huntington

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

KDHC: complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

Kb: kilo base

kDa: kilo Dalton

Km: constante de Michaelis

KO: knock out

LAMP2: proteína 2 de membrana asociada al lisosoma

LB: Caldo de Lisogenia

LCR: líquido cefalorraquídeo

LOO: peroxilo

MAP: proteína asociada a microtúbulos

MEM: medio esencial mínimo



µg: microgramo

µM: micromolar

mg: milígramo

mL: mililitro

mM: milimolar

min: minuto

mitSVCT2: SVCT2 mitocondrial

nm: nanómetro

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ND: enfermedades neurodegenerativas

nm: nanómetro

NO: óxido nítrico

NTFs: ovillos neurofibrilares

ns: diferencia no significativa

O₂: oxígeno molecular

OH: hidroxilo

pb: pares de bases

PDHC: complejo piruvato deshidrogenasa

PDI: proteína disulfuro isomerasa

PFA: paraformaldehído

PSEN1: presinilina 1

PSEN2: presinilina 2

RAGE: receptor de productos finales de glicosilación avanzada



ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

s: diferencia significativa

SLC: transportador de soluto

SOD: superóxido dismutasa

SVCT: transportador de vitamina C (AA) dependiente de sodio

TOM20: translocasa de membrana externa mitocondrial

Tris: trisaminometano

TrxR: tioredoxina reductasa

UDP: uridina difosfato

V: volt

WT: tipo silvestre



RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por el deterioro de la memoria y disfunción cognitiva. El fenómeno más característico en la AD es la presencia de agregados del péptido β -amiloide ($A\beta$), que deriva de la proteína precursora amiloidea (APP). Existe evidencia sobre la toxicidad que puede ejercer $A\beta$ mediante mecanismos como disfunción sináptica, alteraciones mitocondriales, alteración de la homeostasis del calcio y estrés oxidativo. Estudios *in vitro* han mostrado que las formas oligoméricas de $A\beta$ producen especies reactivas de oxígeno (ROS).

La vitamina C, micronutriente que posee un gran efecto antioxidante y que los humanos deben consumir a través de la dieta ya que no tienen la capacidad de generarla, ha demostrado tener funciones protectoras frente a la AD, tanto en estudios de pacientes como en modelos animales. En el cerebro, el sistema de transporte más importante de vitamina C es SVCT2 (cotransportador de ácido ascórbico y sodio), que incorpora la forma reducida de vitamina C, el ácido ascórbico (AA), que es la prevalente *in vivo*. Estudios recientes con respecto al rol de SVCT2 en AD mostraron que la inhibición de su expresión produjo disminución de la capacidad antioxidante, aumento de acumulación amiloide y deterioro cognitivo en los animales. Resultados previos de nuestro grupo de investigación sugieren que SVCT2 a nivel mitocondrial es una proteína diferente a la descrita en literatura y que podría desempeñar un papel en la supervivencia del cáncer en ambientes pro-oxidantes. Con respecto a AD, resultados previos mostraron que un modelo de AD (ratón J20) que acumula $A\beta$ en la región hipocampal muestra alta reactividad hacia el anticuerpo contra SVCT2.

Considerando los antecedentes previos, esta tesis se enfocó dos objetivos: el primero consistió en identificar el transportador de AA. Los resultados entregaron la secuencia SVCT2-373 que genera una proteína que presenta localización mitocondrial y es reconocida por el anticuerpo anti-SVCT2. Nuestros resultados *in silico* muestran que SVCT2-373 tiene una estructura proteica energéticamente posible, presenta dominios transmembrana, podría funcionar como homodímero y además sería capaz de unir ácido ascórbico, lo que permite proponer que podría ser responsable del transporte de ácido ascórbico a nivel mitocondrial.

Nuestro segundo objetivo fue caracterizar la expresión endógena y localización de SVCT2 en neuronas hipocampales y determinar cambios en los niveles de expresión y localización en respuesta a A β oligomérico. Nuestros resultados mostraron que el transportador SVCT2 se encuentra a nivel mitocondrial en neuronas hipocampales y que hay variaciones de esta expresión mitocondrial en respuesta al tratamiento con A β oligomérico. En conjunto, los resultados de ambos objetivos apoyan la existencia de un nuevo transportador de AA a nivel mitocondrial, y sugieren que su expresión puede ser alterada en la Enfermedad de Alzheimer. Más estudios son necesarios para confirmar estas observaciones.

SUMMARY

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by memory injury and cognitive dysfunction. The major phenomena in AD is the presence of β -amyloid aggregates ($A\beta$), derived from amyloid precursor protein (APP). There exists evidence about the toxicity that $A\beta$ can play by mechanisms like synaptic dysfunction, mitochondrial alterations, calcium homeostasis changes and oxidative stress. In vitro studies have shown that oligomeric forms of $A\beta$ produce reactive oxygen species (ROS).

Vitamin C, micronutrient that has a great antioxidant effect and must be consumed by humans through the diet because they can't generate it, have shown to have protective functions against AD, in patients and in animal models. In brain, the most important transport system of vitamin C is SVCT2 (sodium/ascorbic acid cotransporter), which incorporates the reduced form of vitamin C, the ascorbic acid (AA), which is the prevalent in vivo. Recent studies about SVCT2 role in AD showed that its expression inhibition produced diminution in antioxidant capacity, increase of amyloid accumulation and cognitive impairment in animals. Previous results from our investigation group suggest that SVCT2 at a mitochondrial level is a different protein to the described in literature and that could play a role in cancer survival in prooxidant environments. Respect to AD, previous results have shown that in a model of AD (J20 mice) that accumulate $A\beta$ in hippocampal region shows a high reactivity to the antibody against SVCT2.

Considering the previous antecedents, this thesis focused on two objectives: the first consisted in identifying the AA transporter. The results are delivered in the SVCT2-373

sequence that generates a protein that presents mitochondrial localization and is recognized by the anti-SVCT2 antibody. Our results in silico show that SVCT2-373 has an energetically possible protein structure, presents transmembrane domains, could function as a homodimer and would also be capable of binding ascorbic acid, which allows us to propose that it could be responsible for the transport of ascorbic acid at the mitochondrial level.

Our second objective was to characterize the endogenous expression and localization of SVCT2 in hippocampal neurons and to determine changes in the expression levels and localization in response to oligomeric A β . Our results show that the SVCT2 transporter is found at the mitochondrial level in hippocampal neurons and that there are variations in this mitochondrial expression in response to treatment with oligomeric A β .

Together, the results of both objectives support the existence of a new AA transporter at the mitochondrial level, and suggest that its expression may be altered in Alzheimer's disease. More studies are needed to confirm these observations.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades neurodegenerativas

Entre las enfermedades relacionadas con la edad, las enfermedades neurodegenerativas llaman mucho la atención por su irreversibilidad, falta de tratamiento eficaz y el hecho de que están acompañadas de cargas sociales y económicas. El envejecimiento es el mayor factor de riesgo de las enfermedades neurodegenerativas (ND). Junto con el envejecimiento, productos secundarios del metabolismo y la acumulación de daño celular llevan al desarrollo de enfermedades (Hung *et al.*, 2019).

Muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la acumulación de proteínas mal plegadas, específicas de cada enfermedad, en el sistema nervioso central (van Ham *et al.*, 2009). Estos procesos neurodegenerativos se denominan proteopatías o proteinopatías, como la enfermedad de Parkinson, en donde la proteína involucrada en su etiología es la α -sinucleína, la esclerosis amiotrófica lateral en que presenta la proteína superóxido dismutasa alterada (Durham *et al.*, 1997), la enfermedad de Huntington (HD) con la huntingtina alterada (Scherzinger *et al.*, 1997) y la enfermedad de Alzheimer (AD) con presencia de péptidos amiloides agregados y con la alteración de la fosforilación de la proteína tau.

1.2 Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia, siendo esta una de

las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas de tercera edad (OMS, 2017). Actualmente hay más de 50 millones de personas que viven con demencia en todo el mundo. Este número casi se duplicará cada 20 años, llegando a 82 millones en 2030 y 152 millones en 2050 (Alzheimer's Disease International, 2020).

Normalmente las personas con AD presentan pérdida gradual de la memoria episódica. Además, también pueden presentar dificultades para reconocer a familiares y amigos, ubicarse espacialmente y sufren alteraciones en su comportamiento (Mucke, 2009). Esta enfermedad ha sido categorizada como un desorden neurodegenerativo caracterizado por deterioro de la memoria y disfunción cognitiva (Musiek *et al.*, 2013). La enfermedad de Alzheimer esporádica es el tipo más común, en donde la causa exacta es desconocida y tiene una edad media de aparición de 80 años (Masters *et al.*, 201). Los cerebros de pacientes con AD muestran pérdida neuronal en varias áreas cerebrales como los lóbulos temporal y parietal, corteza frontal y giro cingulado (Musiek *et al.*, 2013).

Los marcadores más comunes y distintivos de la AD a nivel cerebral son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (NTFs) (Terry *et al.*, 1983). Las placas seniles consisten de fibras compuestas de péptido β -amiloide ($A\beta$) (Hillen, 2019; Masters *et al.*, 1985), y los NFTs se componen de haces de filamentos helicoidales de proteína tau asociada a microtúbulos (Masters *et al.*, 2015; Ihara *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1988).

Las lesiones patológicas en la AD se encuentran con mayor frecuencia dentro de las regiones de la corteza cerebral y de los lóbulos temporales mediales, es decir, el hipocampo, núcleos amigdaloides y circunvoluciones parahipocampales. Las lesiones patológicas más tempranas se localizan en las regiones hipocampal y amigdaloides, lo cual se comprobó mediante inmunohistoquímica de rebanadas de cerebro *postmortem*

de pacientes con AD (Ball, 1977).

Las regiones hipocampal-amigdaloides parecen ser especialmente susceptibles a los cambios patológicos que caracterizan la enfermedad de Alzheimer, de tal manera que esta región contiene más placas seniles que otras regiones del cerebro. Además, los ovillos neurofibrilares suelen estar presentes en las regiones hipocampal-amigdaloides-entorrinal cuando están ausente de otras regiones corticales (Mann *et al.*, 1989). Cabe destacar que el daño experimental bilateral del hipocampo da como resultado deficiencias en el aprendizaje y la memoria similares a las experimentadas por los pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Mahut *et al.*, 1982; Zola-Morgan *et al.*, 1986). En apoyo al postulado sobre la participación temprana de la región hipocampal-amigdaloides en la patogénesis de la enfermedad, se ha observado que en primates normales envejecidos que presentan la patología muestran lesiones limitadas dentro de las regiones hipocampal-amigdaloides (Mann *et al.*, 1989).

En la AD tardía, con pacientes de 65 o más años, el patrón hereditario no parece ser tan claro, sugiriendo que una mezcla de factores ambientales y genéticos puede llevar a la enfermedad.

Se han identificado tres genes relacionados con la AD temprana: el gen precursor de la proteína amiloide (APP) (Goate *et al.*, 1991), y los genes de presinilina 1 (PSEN1) (Sherrington *et al.*, 1995) y presinilina 2 (PSEN2) (Levy-Lagad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995). Además, el alelo E4 del gen de la apolipoproteína E (APOE) ha sido identificado como un factor de riesgo tanto para la AD temprana como tardía (van Duijn *et al.*, 1994). El progreso de la investigación en las últimas dos décadas, incluida la elucidación de la susceptibilidad a la AD y los genes causantes, así como otras proteínas involucradas en

el proceso patógeno, ha facilitado el desarrollo de modelos de ratón alterados genéticamente.

Los roedores no desarrollan naturalmente las neuropatologías asociadas con la AD, aunque pueden diseñarse modelos para expresar las proteínas como la beta amiloide, un contribuyente a las placas seniles, o tau, una proteína que causa ovillos neurofibrilares en el cerebro humano (Neff *et al.*, 2019). Estos modelos han permitido estudiar y evaluar nuevos enfoques terapéuticos, de los cuales muchos tratamientos actualmente se encuentran en ensayos clínicos, (La Ferla *et al.*, 2007).

La gran mayoría de los casos de AD son esporádicos y las causas subyacentes a estos casos siguen siendo desconocidas. Neuropatológicamente, la AD se caracteriza por la acumulación de placas amiloides β ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares, sumado a la pérdida sináptica generalizada, inflamación, daño oxidativo y muerte neuronal. En particular, la neuropatología y el fenotipo clínico de la AD temprana y tardía son indistinguibles, siendo la mayor diferencia la edad de inicio (Selkoe, 2002).

El péptido $A\beta$ se produce debido al clivaje de la proteína precursora amiloide, que es una proteína transmembrana asociada con el desarrollo neuronal, crecimiento de neuritas y transporte axonal (Kang *et al.*, 1987). APP es escindida de forma secuencial por tres tipos de proteasas, que se denominan secretasas α , β y γ . El procesamiento por β - y γ -secretasa escinde en los extremos N- y C-terminales de la región $A\beta$ respectivamente, liberando $A\beta$, mientras que la α -secretasa escinde dentro de la secuencia $A\beta$. La γ -secretasa escinde en varios sitios adyacentes para producir especies de $A\beta$ que contienen entre 39 y 43 residuos de aminoácidos, siendo las formas principales observadas los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ (Mills *et al.*, 1999).

Debido a que la etiología de la AD tardía es desconocida, los modelos animales se han basado en la utilización de mutaciones genéticas asociadas con la AD familiar, con la justificación de que los eventos posteriores de la AD tardía y la AD familiar son similares. Los modelos genéticos animales han sido invaluable para determinar los mecanismos moleculares de la progresión de la enfermedad y para probar potenciales terapias. Aunque ningún modelo de ratón recapitula todos los aspectos del espectro de la enfermedad, cada uno permite un análisis en profundidad de uno o dos componentes de la enfermedad, que no es fácilmente posible o ético con pacientes humanos o muestras. Ratones transgénicos que sobreexpresan APP mutante desarrollan una patología similar a la encontrada en el cerebro humano; la acumulación de A β en placas extracelulares ocurre de manera dependiente de la edad, es decir, a pesar de la producción constante de A β , las placas solo se forman en animales de adultez media o tardía (Fukumoto *et al.*, 2003). En particular, se acelera la formación de placa cuando el A β ₄₂, que es más largo, es el preferentemente clivado desde APP, debido a que este péptido es más propenso a agregarse que el A β ₄₀ y lleva más rápido a daños cognitivos severos (Findeis, 2007). Las placas de A β encontradas en los cerebros de ratones transgénicos con AD son estructuralmente similares a las encontradas en el cerebro humano; inician como placas difusas que consisten principalmente en A β ₄₂, desarrollando un núcleo de A β ₄₂ denso, y luego incorporan A β ₄₀, así como numerosos otros componentes como ubiquitina y α -sinucleína (Yang *et al.*, 2000). Tal como en humanos, estas placas marcan positivo con thioflavina y Rojo Congo, marcadores de A β , mostrando estructuras fibrilares similares (Hsiao *et al.*, 1996).

Las presinilinas son componentes cruciales de la γ -secretasa y su presencia es necesaria

para la producción de A β (Brunkan *et al.*, 2005). En 1997 fue generado un modelo de ratón *knock out* para presinilina 1, el cual demostró que la ausencia en ambos alelos de PSEN1 era letal, causando defectos en el sistema nervioso central y en el sistema esquelético (Shen *et al.*, 1997). Posteriormente, los estudios se enfocaron en desarrollar inhibidores de γ -secretasa, y se han testeado en fase clínica 3 mostrando resultados consistentes con el modelo de ratón *knock out*, causando daño cognitivo elevado (Schor, 2011).

BACE es la única enzima β -secretasa y su actividad es crucial para la producción de A β . Los ratones del modelo animal *knock out* para BACE1 resultaron ser saludables, viables y no producían A β (Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001), lo cual propuso a BACE1 como un blanco terapéutico. Otro modelo animal, producto de la cruce de ratones KO para BACE1 con el modelo animal de AD Tg2576, mostró la ausencia de BACE1, lo cual previno el daño cognitivo y redujo significativamente los niveles de A β (Ohno *et al.* 2004). Los modelos animales más comunes de AD presentan mutaciones en los genes APP, PSEN1, BACE1 y tau, combinando algunos de ellos más de una mutación. La **Tabla 1** muestra algunos de estos modelos más utilizados, señalando el nombre del modelo, los transgenes relevantes, las mutaciones que contiene, el promotor bajo el cual se expresan los transgenes y las referencias de cada modelo mencionado (Cavanaugh *et al.*, 2014).

Model	Transgene(s)	Mutation(s)	Promoter	Reference
PDAPP	hAPP	V717F	PDGF	Games et al., 1995
H6	hAPP	N/A	PDGF	Wyss-Coray et al., 1997
J9	hAPP	N/A	PDGF	Chin et al., 2005
J20	hAPP	N/A	PDGF	Chin et al., 2005
Tg2576	hAPP	K670N, M671L	Hamster prion protein	Hsiao et al., 1996
APP23	hAPP	K670N, M671L	Thy-1.2	Sturchler-Pierrat et al., 1997
C3-3	Chimeric human/ murine APP	K670N, M671L	Mouse prion promoter	Borchelt et al., 2007
CRND8	hAPP	K670N, M671L, V717F	Hamster prion promoter	Chishti et al., 2001
APPDutch	hAPP	E693Q	Thy-1.2	Herzig et al., 2004
ARC6/ARC48	hAPP	E22G	PDGF	Cheng et al., 2004
C3-3 x PSEN1	Chimeric human/ murine APP, hPSEN1	APP K670N, M671L; PSEN A246E	Mouse prion promoter (APP, PSEN1)	Borchelt et al., 2007
PSAPP	hAPP, hPSEN1	APP K670N, M671L; PSEN M146L	Hamster prion protein (APP), HMG-CoA reductase (PSEN)	McGowan et al., 1999
APP _{SL} PS1 _{M146L}	hAPP, hPSEN1	APP K670N, M671L, V717I; PSEN M146L	Thy-1 (APP), HMG-CoA reductase (PSEN)	Langui et al., 2004
APP _{SL} PS1 _{KI}	hAPP, hPSEN1	APP M233T, L235P; PSEN1 M233T, L235P	Thy1 (APP)	Casas et al., 2004
5XFAD	hAPP, hPSEN1	APP K670N, M671L, I716V, V717I; PSEN1 M146L, L286V	Thy1	Oakley et al., 2006
hBACE1/hAPP	hAPP, hBACE1	N/A	Thy1 (BACE1, APP)	Bodendorf et al., 2002
Htau	hTau	mTauKO	Tau, Thy1	Andorfer et al., 2003
TauP301L	hTau	P301L	Thy1.2	Gotz et al., 2001
Tau V337M	hTau	V337M	PDGF	Tanemura et al., 2002
Tau P301S	hTau	P301S	Thy1.2	Allen et al., 2002
Tau G272V, P301S	hTau	G272V, P301S	Thy1.2	Schindowski et al., 2006
3xTg-AD	hAPP, hPSEN1, hTau	APP K670N, M671L; PSEN1 M146V; tau P301L	Thy1.2 (APP, Tau)	Oddo et al., 2003

Tabla 1. Modelos animales de AD. (Cavanaugh *et al.*, 2014)

Los roedores no desarrollan naturalmente la AD, por lo que es posible diseñar modelos que expresen proteínas como A β y tau para estudiar la enfermedad. Los modelos animales más comunes de AD, los transgenes relevantes, mutaciones y el promotor bajo el cual se expresan los transgenes se presentan en esta tabla.

1.3. Etiología de la enfermedad de Alzheimer

En el comienzo y desarrollo de la AD son identificables ciertos cambios o fenómenos celulares y moleculares, característicos para esta enfermedad.

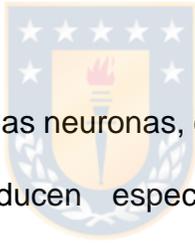
El principal marcador de la AD, como ya se ha mencionado, es la agregación y deposición de péptidos A β en la superficie extracelular de neuronas, llevando a la formación de oligómeros y fibras en el cerebro (Jin *et al.*, 2011). Otro fenómeno observado en pacientes con AD es la hiperfosforilación de la proteína tau en el cerebro, la cual se acumula en los microtúbulos de las neuronas y forma ovillos neurofibrilares (Schoonenboom *et al.*, 2004; Sobow *et al.*, 2004). Ha sido demostrado que tanto las placas de A β como los NTFs ejercen actividad citotóxica sobre las neuronas, induciendo finalmente la destrucción de la estructura del cerebro y deterioro en la memoria (Gong *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2008). La aparición de estrés oxidativo es un indicador innegable en el comienzo y desarrollo de la enfermedad (Kim, Rhie, Kim, & Yoon, 2015), específicamente se ha demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno contribuye a la patología (Zhu *et al.*, 2004; Nunomura *et al.*, 2006). Además, los efectos de la generación de ROS y los cambios provocados por A β en la señalización de calcio en la AD están involucrados en el daño mitocondrial (Zhu *et al.*, 2004).

1.3.1 Proteínas asociadas a ovillos y placas seniles

El tejido cerebral con AD se caracteriza por presentar dos tipos de estructuras anormales: placas seniles y ovillos neurofibrilares. En los años 80 se demostró que las placas seniles

consistían de fibras amiloides compuestas de péptido β -amiloide (Hillen, 2019; Masters *et al.*, 1985), mientras que los NFTs contienen haces de filamentos helicoidales de proteína tau asociada a microbútilos (Masters *et al.*, 2015; Ihara *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1988).

Las placas seniles están compuestas de axones y dendritas deteriorándose, intercalados con amiloide (Terry *et al.*, 1964; Terry *et al.*, 1970) y sus concentraciones están correlacionadas con la severidad de la demencia (Blessed *et al.*, 1968). Se ha demostrado que la distribución de las placas en el cerebro no es aleatoria. Por ejemplo, en el cerebelo prácticamente no se detectan, mientras que en las cortezas de asociación frontal y temporal se encuentran en elevadas concentraciones (Terry *et al.*, 1983; Rogers *et al.*, 1985).



Con respecto a los efectos de $A\beta$ en las neuronas, estudios *in vitro* han mostrado que las formas oligoméricas de $A\beta$ producen especies reactivas de oxígeno (ROS) principalmente a través de la activación de la NADPH oxidasa, e inducen depolarización mitocondrial a través de una sobrecarga de calcio y producción de radicales libres (Angelova *et al.*, 2017). Estos eventos finalmente conducen a la apertura de un poro permeable que genera la muerte celular. Además, uno de los antioxidantes más importantes en el cerebro, GSH, se reduce en los astrocitos después de la exposición de estas células a $A\beta$ (Angelova *et al.*, 2017).

Por otro lado, la proteína tau, involucrada en la formación de ovillos neurofibrilares en la AD, es la principal proteína asociada a microtúbulos de neuronas maduras (MAPs). En humanos se han identificado seis secuencias de tau que dan origen a isoformas diferentes de entre 352 y 441 aminoácidos de longitud (Goedert *et al.*, 1989). La función

de tau, como fosfoproteína, es promover el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos y estabilizar la estructura (Weingarten *et al.*, 1975).

En la AD y enfermedades neurodegenerativas relacionadas, llamadas tautopatías, la proteína tau está anormalmente hiperfosforilada y agregada en haces o filamentos (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

La proteína tau citosólica hiperfosforilada anormalmente en la AD no se une a la tubulina ni promueve el ensamblaje de microtúbulos, sino que inhibe el ensamblaje y altera los microtúbulos (Alonso *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Esta propiedad de la proteína tau patológica implica el secuestro de la tau normal por la proteína hiperfosforilada (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 1996).

En un modelo de ratón transgénico con expresión inducible de tau se observó mejora cognitiva cuando se suprimió la expresión de tau humana que se volvió anormalmente hiperfosforilada, aunque continuaran formándose ovillos neurofibrilares, lo que sugiere que es la acumulación de la tau citosólica anormalmente hiperfosforilada, y no su agregación, el fenómeno involucrado en el deterioro del comportamiento en estos animales (Santacruz *et al.*, 2005). La desfosforilación *in vitro* de los ovillos neurofibrilares desagrega los filamentos y, como resultado, la proteína tau liberada se comporta como una proteína normal al promover el ensamblaje de microtúbulos (Wang *et al.*, 2005).

1.4. Disfunción mitocondrial

Se ha postulado que los efectos de la generación de ROS y los cambios en la señalización de calcio inducida por A β en la AD están involucrados en el daño

mitocondrial (Zhu *et al.*, 2004).

Las mitocondrias son la principal fuente de generación de energía en la célula, que se manifiesta en forma de la molécula adenosina trifosfato (ATP) (Nelson *et al.*, 2008; Scheffler, 2007; Nicholls, 2013). En enfermedades como la AD la estructura y función de la mitocondria sufren alteraciones (Scheffler, 2007). Algunas de las funciones alteradas por la AD incluyen una disminución en el metabolismo de glucosa, falla enzimática mitocondrial y aumento en la producción de ROS (antes de la formación de placas de A β y ovillos neurofibrilares de tau) (Esteves *et al.*, 2010). La dinámica mitocondrial también es disfuncional en etapas tempranas de AD (Lin *et al.*, 2006), incluyendo la disrupción del balance entre la fusión y fisión mitocondrial, representada por mitocondrias dividiéndose y uniéndose entre sí, disminución del transporte axonal de mitocondrias, un menor porcentaje de mitocondrias dentro de una célula, y un cambio de tamaño, con mitocondrias mucho más cortas y más anchas (Esteves *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013). También hay interrupción de los procesos glucolíticos, deficiencias en la actividad enzimática de los complejos proteicos de la cadena transportadora de electrones (ETC) y alteraciones negativas en la actividad enzimática antioxidante (Esteves *et al.*, 2010). Efectos adicionales sobre la energía en la AD se centran en la disminución de actividad en los procesos catabólicos en glucólisis y ciclo de Krebs, en particular el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDHC), y enzimas en la ETC como la succinato deshidrogenasa (en el complejo II) (Schoffner, 1997).

La disfunción mitocondrial podría ser el resultado de un desbalance redox en neurodegeneración (Wang *et al.*, 2014), sin embargo, si el aumento en el estrés oxidativo

lleva a la disfunción mitocondrial o la disfunción mitocondrial al estrés oxidativo, aún no está claramente definido.

La AD también afecta la integridad mitocondrial mediante el péptido A β , el cual altera la depolarización mediante dos vías diferentes: una rápida y transiente que es dependiente de calcio, y una segunda que es lenta, progresiva y relacionada con la producción de superóxido por la NADPH oxidasa (Angalova *et al.*, 2017). Es importante destacar que la inhibición de la NADPH oxidasa puede proteger las neuronas y astrocitos afectados bloqueando ambos tipos de depolarización mitocondrial. Así también, la inhibición de ciclofilina D protege a las neuronas, lo cual se demostró realizando estudios en un modelo de ratón *knockout* para ciclofilina D (enzima involucrada en la permeabilidad del poro mitocondrial), donde se observó retraso en la apertura del poro permeable, protección mitocondrial, menor desbalance neuronal y mejoras en la memoria en el contexto de un modelo de ratón con AD (Du *et al.*, 2011).

1.4.1 Estrés oxidativo en la Enfermedad de Alzheimer

A pesar de las diferentes hipótesis sobre la etiología de la neurodegeneración ligada al plegamiento y agregación, la característica unificadora e innegable entre ellas es la aparición de estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2015).

Siendo uno de los eventos más tempranos de la enfermedad de Alzheimer, el estrés oxidativo tiene implicaciones tanto como un mediador importante en el inicio, como en la progresión y patogénesis de la enfermedad. La generación de especies reactivas de oxígeno y su consiguiente daño y la respuesta celular normal a estas contribuye a gran

parte de la patología característica de la AD que se observa en las neuronas susceptibles (Zhu *et al.*, 2004; Nunomura *et al.*, 2006).

En condiciones normales, el daño de los radicales de oxígeno se mantiene bajo control mediante una eficiente serie de sistemas antioxidantes (por ejemplo, el metabolismo simultáneo del H₂O₂ por la catalasa y la glutatión peroxidasa). Sin embargo, en condiciones patológicas se altera el equilibrio oxidante versus antioxidante. El daño oxidativo ocurre cuando el equilibrio redox se altera de tal manera que la producción de ROS excede las defensas antioxidantes celulares. El daño oxidativo que se encuentra en la AD incluye productos finales de glicosilación avanzada (Smith *et al.*, 1994), nitración (Good *et al.*, 1969), productos de aducción de peroxidación lipídica (Montine *et al.*, 1996) y proteínas de neurofilamentos modificadas con carbonilo y carbonilos libres (Smith *et al.*, 1995).

En la AD hay una serie de fuentes contribuyentes que podrían ser relevantes en la producción de radicales libres. El hierro, en un estado redox-activo, aumenta tanto en los NFTs como en depósitos de A β (Smith *et al.*, 1995; Good *et al.*, 1996; Good *et al.*, 1992). El hierro cataliza la formación del radical •OH a partir de H₂O₂, así como la formación de productos finales de glicación avanzada. Además, el aluminio, que también se acumula en neuronas que contienen NFTs (Good *et al.*, 1992), estimula la peroxidación lipídica inducida por hierro (Oteiza, 1997). La microglía activada, que rodea las placas seniles (Cras *et al.*, 1990), es una fuente de radicales NO (óxido nítrico) y •O₂ (oxígeno molecular) (Colton *et al.*, 1987) que pueden reaccionar para formar peroxinitrito, dejando a la nitrotirosina como un marcador identificable (Good *et al.*, 1992). El propio

péptido A β también está implicado directamente en la formación de oxígeno reactivo a través de un mecanismo propuesto en que los péptidos A β tienen una estructura anfipática inusual que penetra en la membrana y que, presumiblemente como consecuencia de la presencia de una metionina oxidable en un sitio crucial en la secuencia (Met-35), el péptido en sí mismo genera radicales en presencia de O₂ (Butterfield et al., 1994; Hensley et al., 1994).

Los productos finales de glicación avanzada en presencia de metales de transición pueden experimentar ciclos redox con la consiguiente producción de oxígeno reactivo (Du et al., 1996). Además, los productos finales de glicación avanzada, al igual que el A β , activan receptores específicos como el receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) y el receptor captador de clase A, para aumentar la producción de oxígeno reactivo (Du et al., 1996; Khoury et al., 1996).

Nuestro organismo es capaz de eliminar ROS antes que causen daño a las diversas biomoléculas o evitar la propagación del daño oxidativo, gracias a los antioxidantes (Krinsky, 1988; Stocker, 1991). Una parte importante de los sistemas de defensa antioxidante intracelulares son enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasas. Además de estas enzimas antioxidantes, hay varias moléculas pequeñas antioxidantes que también juegan un papel importante en los sistemas de defensa antioxidantes, particularmente en el espacio extracelular, donde las enzimas están ausentes o presentes solo en pequeñas cantidades (Stocker, 1991).

El alfa-tocoferol es la forma biológica y químicamente más activa de vitamina E y es el antioxidante liposoluble más abundante en humanos (Halliwell et al., 1985). Otro antioxidante soluble en lípidos es el betacaroteno (un precursor de la vitamina A), que

puede eliminar los radicales libres, pero actúa principalmente como un desactivador de $\bullet\text{O}_2$ (Burton *et al.*, 1984). Por otro lado, dentro de los antioxidantes solubles en agua, la vitamina C no solo tiene un gran número de actividades biológicas (como ser cosustrato en la biosíntesis de procolágeno, catecolamina y carnitina), sino que también elimina eficazmente una amplia gama de ROS y otros oxidantes (Frei *et al.*, 1988; Retsky *et al.*, 1993; Levine, 1986; Frei, 1991).

1.5 Vitamina C

Uno de los nutrientes más importantes y que posee un gran efecto antioxidante es la vitamina C (Mandi *et al.*, 2009). La mayoría de las especies, incluyendo los mamíferos, son capaces de sintetizar la vitamina C a partir de glucosa a través de una vía hexurónica que termina con la oxidación de gulonolactona en L-ascorbato, por la enzima gulonolactona oxidasa (GULO). Sin embargo, los humanos han perdido esta capacidad debido a mutaciones en el gen GULO, lo cual implica que deben obtener la vitamina C a través de la dieta (Mandi *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2019).

La vitamina C posee variadas funciones biológicas, entre las cuales se encuentra su rol como agente reductor y antioxidante (Frei *et al.*, 1988; Retsky *et al.*, 1993; Levine, 1986; Frei, 1991). Además, es esencial para la síntesis de colágeno y de proteoglicanos (Bird *et al.*, 1986; Bird *et al.*, 1986). También ayuda a mantener reducidas diversas enzimas como monoxigenasas y dioxigenasas. Por otro lado, participa en la síntesis de péptidos neuroendocrinos, donde es requerida como cofactor enzimático (Eipper *et al.*, 1991). Además, participa en la desmetilación de histonas y en la regulación de factores de

transcripción inducibles por hipoxia (Du *et al.*, 2012; Mandi *et al.*, 2009).

Sumado a todas las funciones descritas, la ausencia de vitamina C en la dieta del humano lleva al desarrollo de escorbuto, enfermedad que puede ser letal si no es tratada apropiadamente (Yang, 2013).

1.5.1 Formas de la vitamina C

La vitamina C existe principalmente en dos formas moleculares con diferente estabilidad química, vida media *in vivo* y mecanismo de transporte: la forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (DHA) y la forma reducida, el ácido ascórbico (AA) (**Figura 1**). La biosíntesis del ácido ascórbico en mamíferos fue establecida en los años 60 y el punto inicial puede ser considerado la UDP-D-glucosa (uridina difosfato glucosa), derivada de la glucosa-1-fosfato o de la UDP-D-galactosa. La UDP-D-glucosa es oxidada, formando UDP-glucuronato. El grupo UDP es removido y el producto es reducido para generar gulonato, el cual por acción de la lactonasa se transforma en L-gulonolactona. La L-gulonolactona es oxidada por la L-gulonolactona oxidasa (GULO) y el producto final de la vía es el L-ascorbato o ácido ascórbico (**Figura 2**) (Smirnoff, 2001). A su vez, el ácido ascórbico puede interconvertirse en ácido deshidroascórbico mediante la oxidación.

Es importante mencionar que ambas formas de la vitamina C son transportadas por vías diferentes hacia el interior de la célula, siendo transportado el ácido ascórbico por cotransportadores de sodio-vitamina C y el ácido deshidroascórbico mediante transportadores de glucosa (GLUTs) (Vera *et al.*, 1993; Tsukaguchi *et al.*, 1999).

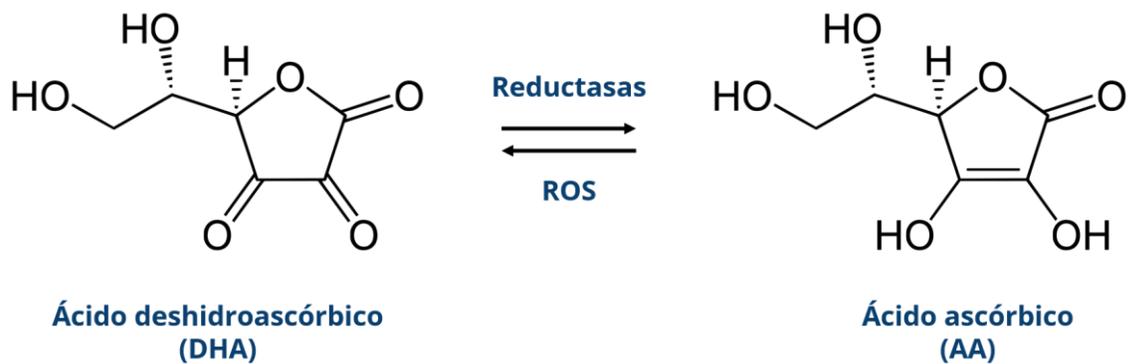


Figura 1. Formas de la vitamina C. La vitamina C existe en dos formas moleculares, que utilizan diferentes mecanismos de transporte: la forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (DHA) y la forma reducida, el ácido ascórbico (AA). La forma reducida es la prevalente *in vivo* y puede interconvertirse en ácido deshidroascórbico mediante la oxidación.

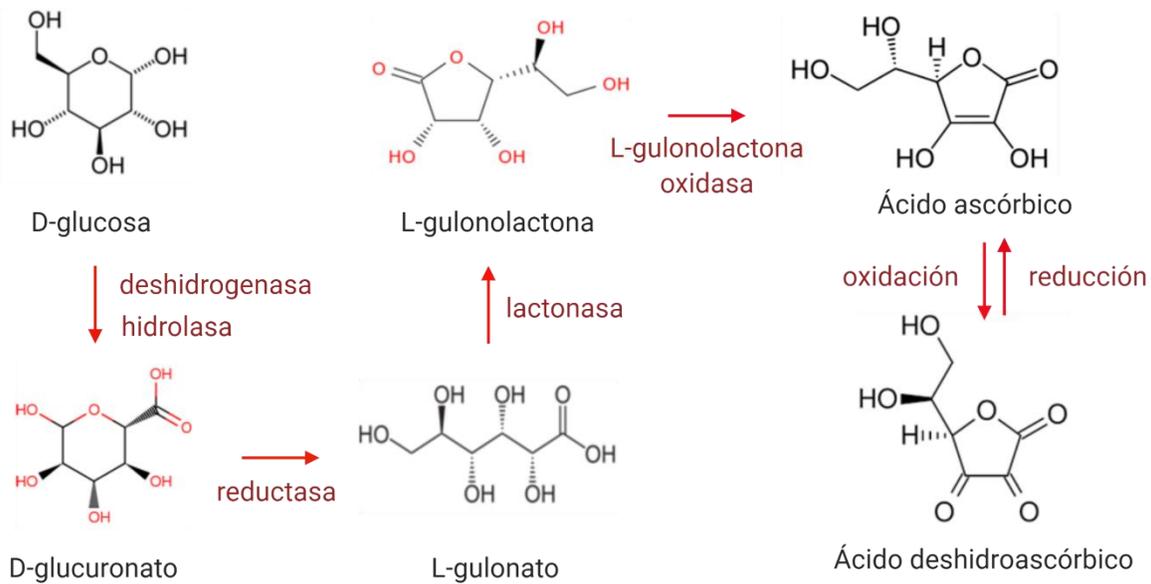


Figura 2. Biosíntesis del ácido ascórbico en mamíferos.

La UDP-D-glucosa, que deriva de glucosa-1-fosfato o de la UDP-D-galactosa, es oxidada, formando UDP-glucuronato. El grupo UDP es removido y el producto es reducido para generar gulonato, el cual por acción de la lactonasa se transforma en L-gulonolactona. La L-gulonolactona es oxidada por la L-gulonolactona oxidasa (GULO) y el producto final de la vía es el L-ascorbato o ácido ascórbico. A su vez, el ácido ascórbico puede interconvertirse en ácido deshidroascórbico mediante la oxidación. (Smirnoff, 2001).

1.5.2 Transporte de la vitamina C

Las células de todos los organismos requieren adquirir vitamina C desde fluidos extracelulares a través de sistemas de transporte, independientemente de la especie (Michels *et al.*, 2013; Rivas *et al.*, 2008; Savini *et al.*, 2008). Cada tejido puede acumular concentraciones específicas de vitamina C dependiendo de sus capacidades de transporte, siendo el cerebro y las glándulas adrenales aquellos que tienen las mayores concentraciones (Michels *et al.*, 2013).

En 1993 Vera y colaboradores describieron el primer transportador de vitamina C: el transportador de soluto SLC2A1 transportador de glucosa (GLUT1), el cual incorpora la forma oxidada de vitamina C, DHA (Vera *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 1995). Posteriormente se ha demostrado que varios miembros GLUT pertenecientes a la familia SLC2A transportan DHA (Rivas *et al.*, 2008). La familia SLC2A tiene descritos 14 miembros, los cuales se clasifican en tres clases distintivas filogenéticamente: clase 1 los GLUTs 1, 2, 3, 4, y 14, clase 2 los GLUTs 5, 7, 9 y 11, y clase 3 los GLUTs 6, 8, 10, 12 y 13 (Holman, 2018; Joost *et al.*, 2002; Joost *et al.*, 2001; Mueckler *et al.*, 2013).

Hasta la fecha se ha descrito que GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 y GLUT10 son capaces de captar DHA (**Figura 3 A**) (Corpe *et al.*, 2013; Joost *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010; Mardones *et al.*, 2011; Michels *et al.*, 2013; Rumsey *et al.*, 2000; Rumsey *et al.*, 1997; Vera *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2007). Una vez dentro de la célula, el DHA es metabolizado eficientemente a AA por reductasas de DHA. Las reductasas de DHA necesitan un cofactor como agente reductor para DHA. Este cofactor puede ser NADPH o glutatión (GSH), dependiendo de la enzima. Así, las reductasas de DHA puede ser

clasificadas como NADPH dependientes: la tioredoxina reductasa TrxR 1 y 2 (May *et al.*, 1997), y la familia 1 aldo-keto reductasa AKR1 (Burczynski *et al.*, 2001); y como glutatión dependientes, las cuales incluyen a la glutaredoxina reductasa (Grx) 1 y 2, la proteína disulfuro isomerasa (PDI), y las glutatión-S-transferasas omega 1 y 2 (GSTO) (Wells *et al.*, 1990).

Estudios de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) en líneas celulares inmortalizadas han demostrado que independientemente de la forma de vitamina C que es incorporada por la célula, la única forma presente en el interior es AA (Ren *et al.*, 2019). Así, a pesar de que la captación de DHA mediante GLUTs es transporte facilitativo, las células son capaces de acumular intracelularmente altas concentraciones de vitamina C gracias a una rápida reducción del DHA a AA una vez dentro de la célula.

La forma reducida y prevalente de vitamina C *in vivo*, el AA, es transportado por la familia de transportadores de soluto SCL23 (cotransportadores Na⁺/ácido ascórbico). Fueron descritos por primera vez el año 1999 en ratas (Tsukaguchi *et al.*, 1999) y en humanos (Daruwala *et al.*, 1999). Los dos transportadores principales que han sido descritos son: SVCT1 y SVCT2 (**Figura 3 B**) (Daruwala *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2008; Savini *et al.*, 2008; Tsukaguchi *et al.*, 1999). Estas proteínas se expresan de forma diferenciada: SVCT1 se expresa principalmente en tejidos epiteliales, mientras que SVCT2 se expresa más ampliamente. Se ha determinado que SVCT1 tiene una Km de 50-200 uM y SVCT2 de 20 uM. SVCT2 media el transporte de AA en respuesta a la presencia de sodio en el medio extracelular, el cual no es reemplazable por otros cationes (Godoy *et al.*, 2007).

En humanos los genes SLC23a1 y SLC23a2 codifican proteínas de distintos tamaños: SVCT1 contiene 598 aminoácidos, mientras que SVCT2 tiene 650 (Du *et al.*, 2012; Wang

et al., 1999; Wang *et al.*, 2000). La familia de transportadores de soluto SLC23 pertenece a la superfamilia de transportadores de nucleobases, donde al menos dos miembros, incluyendo el simportador de uracilo/H⁺ de *Escherichia coli*, han sido cristalizados exhibiendo 14 dominios transmembrana que forman el poro (Lu *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017). Es importante mencionar que los transportadores de AA y su expresión diferencial determinan la cantidad de AA que ingresa a la circulación o a los distintos tejidos (**Figura 4**) (Lykkesfeldt *et al.*, 2019).



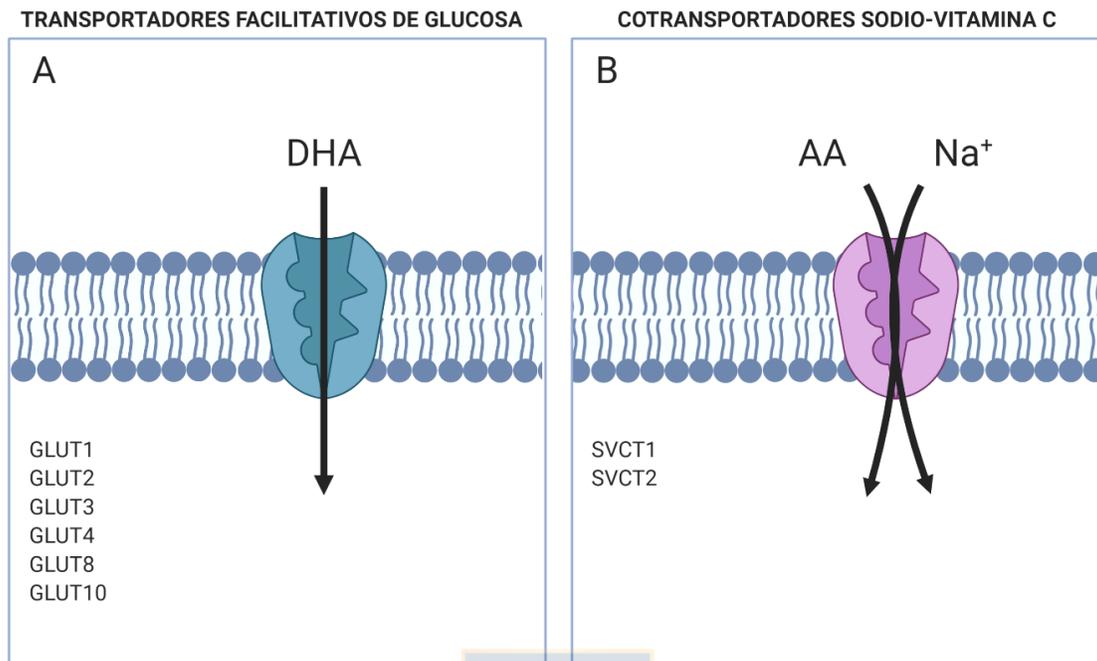


Figura 3. Transportadores de vitamina C.

A) Se ha demostrado que 6 de los 14 miembros de la familia de transportadores de glucosa GLUTs son capaces de captar la forma oxidada de la vitamina C (DHA): GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 y GLUT10 (Corpe *et al.*, 2013; Joost *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010; Mardones *et al.*, 2011; Michels *et al.*, 2013; Rumsey *et al.*, 2000; Rumsey *et al.*, 1997; Vera *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2007). **B)** Los dos transportadores principales de la forma reducida de vitamina C (AA) son SVCT1 y SVCT2 (Daruwala *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2008; Savini *et al.*, 2008; Tsukaguchi *et al.*, 1999). SVCT1 se expresa principalmente en tejidos epiteliales, mientras que SVCT2 se expresa más ampliamente. SVCT1 tiene una Km de 50-200 μM y SVCT2 una Km de 20 μM . (Muñoz-Montesino *et al.*, 2021).

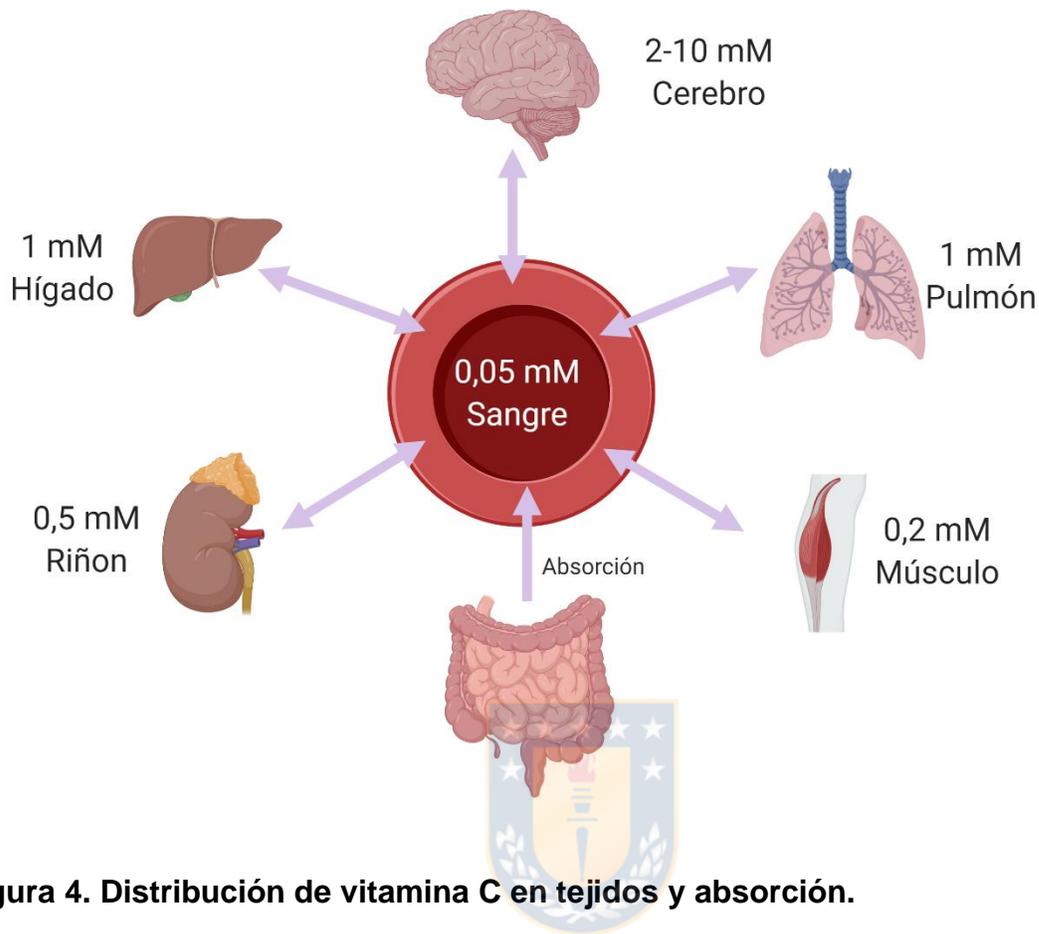


Figura 4. Distribución de vitamina C en tejidos y absorción.

Las células de todos los organismos requieren adquirir vitamina C desde fluidos extracelulares a través de sistemas de transporte; cada tejido puede acumular concentraciones específicas de vitamina C dependiendo de sus capacidades de transporte. Por ejemplo, en cerebro el AA alcanza una concentración de 10 mM, mientras que en sangre solo es de 0,05 mM, por lo que en estos tejidos que presentan mayor concentración hay mayor expresión de transportadores de vitamina C. (Modificado de Lykkesfeldt *et al.*, 2019).

1.5.3 Vitamina C en el cerebro

La vitamina C se encuentra en altos niveles en neuronas, pero no así en células gliales, por lo que los niveles de vitamina C deben ser más altos en áreas con altas concentraciones de cuerpos neuronales, en lugar de células de soporte y sustancia blanca (Rice, 2000).

La vitamina C en su forma reducida, AA, posee numerosas funciones a nivel cerebral que se pueden dividir entre funciones antioxidantes y no antioxidantes. De estas últimas, muchas implican la reducción monovalente de Fe^{3+} o Cu^{2+} en los sitios activos de enzimas dioxigenasas, en reacciones de hidroxilación. Respecto a sus funciones antioxidantes, la vitamina C actúa directamente eliminando radicales a base de oxígeno o nitrógeno generados por el metabolismo celular normal (Harrison *et al.*, 2009). Se ha calculado a nivel cerebral que la concentración neuronal de vitamina C es mucho más alta que en el resto del cerebro (May, 2012). El AA en neuronas es capaz de eliminar eficazmente el superóxido, un subproducto importante del metabolismo mitocondrial neuronal (Jackson *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el AA recicla el α -tocoferol (vitamina E) en bicapas lipídicas, reduciendo el radical α -tocoferxilo a α -tocoferol (Niki *et al.*, 1995). Experimentos realizados con cultivos celulares y rebanadas de cerebro de rata, donde se adicionó AA, mostraron que previene la peroxidación lipídica inducida por diversos agentes oxidantes (Seregi *et al.*, 1978; Kovachich *et al.*, 1983).

La vitamina C también puede tener un rol neuromodulador, con interacciones propuestas con una serie de sistemas de neurotransmisores que incluyen acetilcolina, dopamina y

glutamato (Harrison *et al.*, 2009; Rice, 2000). Además, existe un mecanismo que mantiene alta la concentración de vitamina C en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (May, 2012).

1.5.4 Transporte de vitamina C en el cerebro

Una vez en el LCR, la vitamina C es transportada hacia las neuronas mediante SVCT2 (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Esto permite la acumulación de AA en células neurales en concentraciones mucho mayores que en las demás células, excepto la glándula suprarrenal. La importancia de la vitamina C en el cerebro es sugerida por observaciones en un modelo animal *knock out* (KO) para SVCT2, donde los ratones mueren pronto después de nacer por falla respiratoria y hemorragia intracerebral (Sotiriou *et al.*, 2002).

La distribución de SVCT2 varía a través de las áreas cerebrales, siendo mayor su localización áreas neurodensas del cerebro como la corteza, hipocampo y cerebelo (Mun *et al.*, 2006) que corresponden aproximadamente a las distribuciones regionales de AA en el cerebro (Mefford *et al.*, 1981; Harrison *et al.*, 2008).

SVCT2 se expresa en neuronas corticales y cerebelares en cultivos primarios (Caprile *et al.*, 2009), y en ratones postnatales de 1-15 días se expresa en neuronas corticales, donde su función puede ser regulada por una isoforma corta del transportador (Salazar *et al.*, 2014).

Cultivos neuronales derivados de ratones *wild type* y *knock down* para la expresión de SVCT2 mostraron que la tasa de transporte de AA es proporcional a la expresión de SVCT2, lo que implicaría un efecto gen-dosis (Qiu *et al.*, 2007).

En la mayoría de los tipos de células no neuronales, SVCT2 tiene una alta afinidad por el AA (K_m de 20–40 μM). Esta afinidad se corresponde bien con la concentración plasmática de AA de 30 a 60 μM . Sin embargo, la K_m aparente para el transporte de AA en células cultivadas de neuroblastoma es de 100-110 μM , lo cual se corresponde a las concentraciones mayores de AA que posee el LCR (200-400 μM) (Castro *et al.*, 2001; May *et al.*, 2006). Esto sugiere que la captación y el contenido de AA en las neuronas están limitados por el número de proteínas SVCT2 expresadas y que la afinidad por el AA se vuelve relevante solo cuando hay deficiencia de AA.

1.5.5 Transporte intracelular de vitamina C

En animales, la síntesis del AA ocurre gracias a enzimas que están presentes en microsomas hepáticos que convierten la L-gulonolactona en ácido ascórbico (Burns *et al.*, 1956; Hassan *et al.*, 1956; Chatterjee *et al.*, 1958; Puskás *et al.*, 1998; Smirnov, 2001), en plantas la síntesis se lleva a cabo por la enzima galactono-lactona-deshidrogenasa, de localización mitocondrial (Oba *et al.*, 1995) y en levaduras es mediada por la enzima arabino-lactona-oxidasa, que también presenta ubicación mitocondrial (Huh *et al.*, 1994; Huh *et al.*, 1998). Las células necesitan incorporar AA a nivel intracelular para cumplir con los requerimientos específicos en cada organelo, lo cual se evidencia por ejemplo en células cromafines para la producción de catecolaminas (Daniel *et al.*, 1982; Friedman *et al.*, 1965) o en los fibroblastos para la síntesis de colágeno (Al-Adnani *et al.*, 1974). Pese a que tanto la síntesis como la acumulación de AA ocurre a nivel de organelos, los mecanismos de captación de vitamina C han sido descritos principalmente a nivel de

membrana, tanto en modelos animales, como en plantas y levaduras (Rivas *et al.*, 2008; Szarka *et al.*, 2004; Wilson, 2005). Los transportadores de vitamina C conocidos de localización intracelular se han descrito relacionados con funciones de redistribución de transportadores, más que con funciones intracelulares (Joost *et al.*, 2002; Zorzano *et al.*, 2005).

Se ha demostrado en células vegetales que los cloroplastos son capaces de captar vitamina C, al igual que la mitocondria (Beck *et al.*, 1983; Weber *et al.*, 2000; Szarka *et al.*, 2004). En modelos animales, específicamente estudiando microsomas provenientes de hígado de rata, se demostró que el retículo endoplasmático tiene la capacidad de incorporar tanto AA como DHA (Banhegyi *et al.*, 1998). Li y colaboradores demostraron que mitocondrias y mitoplastos de células de hígado o músculo de rata eran capaces de captar DHA, el cual una vez incorporado es rápidamente reducido a AA mediante GSH o tioredoxina reductasa (Li *et al.*, 2001). Posteriormente, se estableció que en la línea celular HEK293T humana y en fibroblastos murinos se transportaría DHA mediante GLUT1 (Sagun *et al.*, 2005).

En líneas celulares derivadas de humano se ha demostrado la expresión de un transportador de ácido ascórbico a nivel mitocondrial que corresponde con la forma de baja afinidad del transportador de ácido ascórbico- Na^+ 2 (SVCT2) (Muñoz-Montesino *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2019). Se ha demostrado la expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial en el contexto de cáncer de mama, lo cual sugiere que SVCT2 podría tener un rol en la patología. El transportador no está restringido a localización mitocondrial, pero mitocondrias aisladas de líneas celulares de cáncer de mamá son capaces de adquirir perfectamente vitamina C en su forma reducida (Peña *et al.*, 2019; Roa *et al.*,

2019). En la mitocondria, la localización específica de SVCT2 corresponde a la membrana interna (Lemasters, 2007; (Muñoz-Montesino *et al.*, 2014). El hecho de que tejidos y células no cancerígenas no expresen SVCT2 a nivel mitocondrial sugiere que su expresión podría estar ligada a la supervivencia del cáncer, otorgando al AA mitocondrial un rol en el control de los niveles de oxidantes en la matriz mitocondrial.

En los estudios realizados en líneas celulares y tejido cancerígenos el tamaño de la proteína expresada no coincide con el SVCT2 *full length* descrito por literatura, sino que tiene un tamaño menor. Sin embargo, presenta las mismas propiedades cinéticas de transporte descritas para SVCT2 (Muñoz-Montesino *et al.*, 2014).

Experimentos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que la expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial aumenta después de condiciones pro-oxidantes en células cancerosas (**Figura 5**) (Trabajos preliminares del laboratorio). En conjunto, la evidencia permite sugerir un vínculo entre el aumento en el nivel de expresión SVCT2 a nivel mitocondrial y la respuesta celular al estrés oxidativo (**Figura 6**) (Roa *et al.*, 2020).

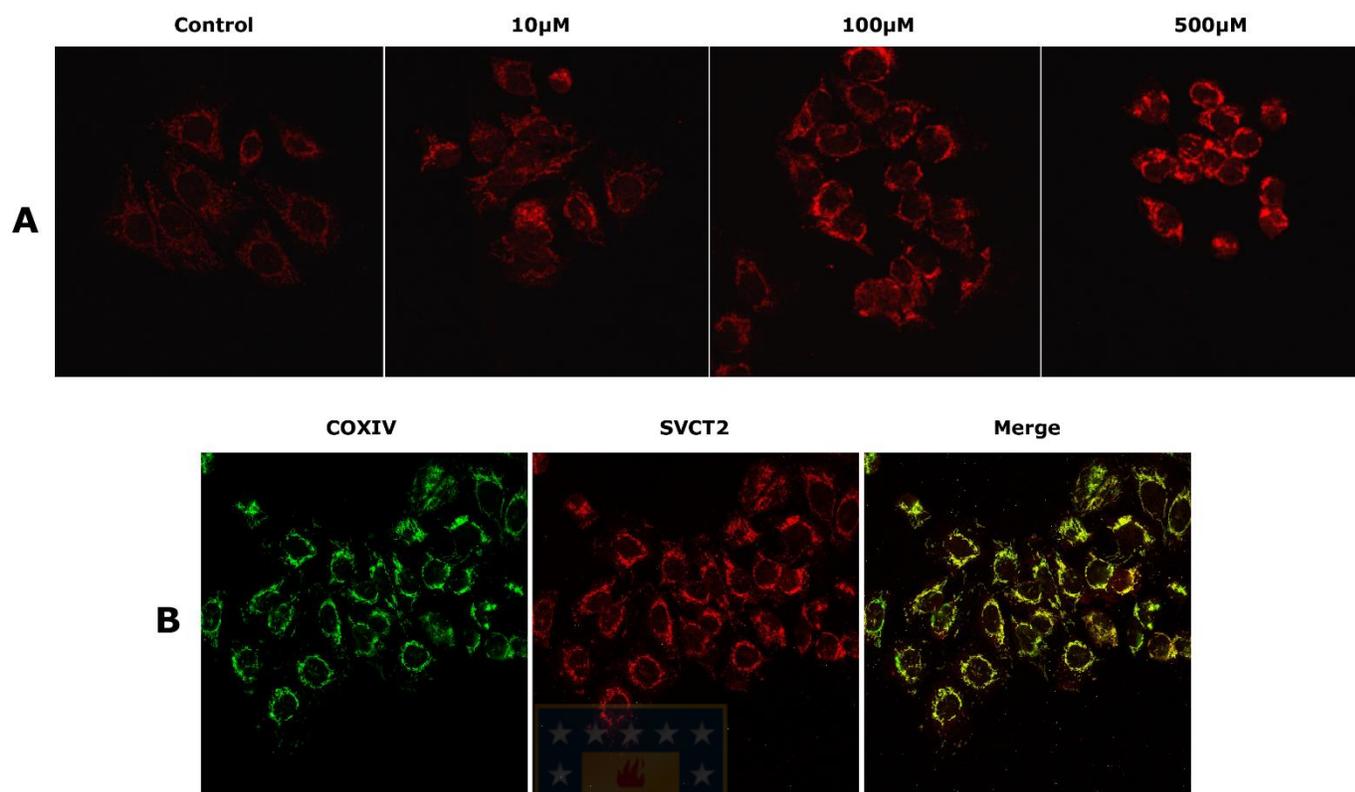


Figura 5. La expresión de mitSVCT2 aumenta en respuesta a un ambiente oxidante.

A) Inmunoreactividad contra el anticuerpo SVCT2 en la línea celular ZR-75 tratadas con concentraciones crecientes de H₂O₂. Se observa que el tratamiento con concentraciones crecientes de H₂O₂ provoca un aumento en la expresión de SVCT2. **B)** Colocalización del transportador mitocondrial COXIV (en verde) y SVCT2 (en rojo) en células ZR-75 expuestas a 500 µM de H₂O₂ (Trabajos preliminares del laboratorio).

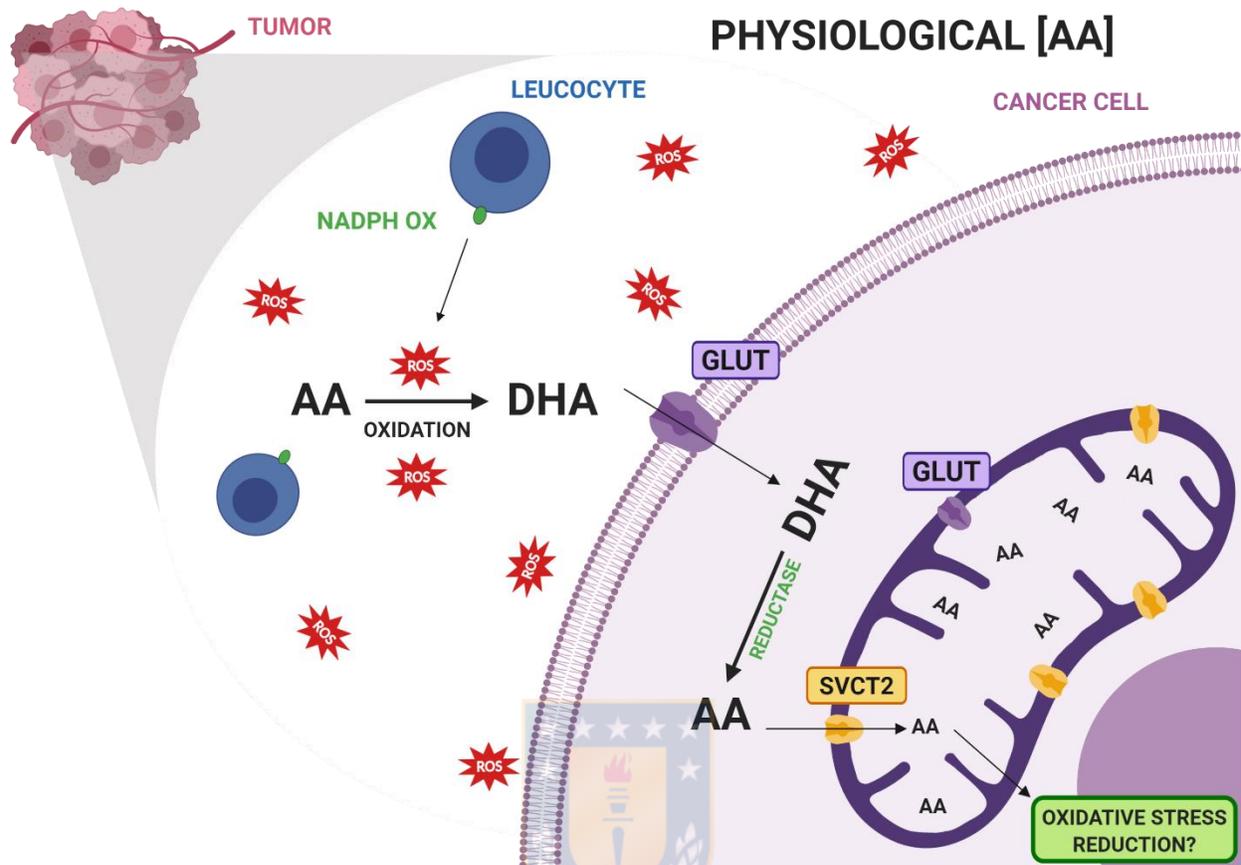


Figura 6. Modelo de adquisición de vitamina C en células cancerosas.

Este modelo muestra cómo una célula patológica específica (cancerosa) adquiere y compartimentaliza la vitamina C. Al carecer de transportadores de ácido ascórbico en la membrana plasmática, el ácido ascórbico se oxida con la ayuda de leucocitos activados que se infiltran en el tumor, produciendo ácido deshidroascórbico (DHA). Una vez dentro de la célula, el DHA se reduce rápidamente a AA, donde puede ingresar a las mitocondrias a través de SVCT2, lo que reduciría el estrés oxidativo en este organelo. (Roa *et al.*, 2020).

1.5.6 Vitamina C y estrés oxidativo

La acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial le otorga 4 electrones al oxígeno, que finalmente es reducido a agua en la producción de la energía necesaria para los diferentes procesos celulares. El oxígeno molecular (O_2) posee dos electrones no apareados con espines paralelos, esto hace difícil que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones que interviene y explica la facilidad con que participa en reacciones univalentes. De forma normal, el 2% del oxígeno es reducido en forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, dando origen a compuestos intermedios inestables, llamados especies reactivas de oxígeno. Estas son capaces de escapar de la mitocondria y producir daño sobre estructuras celulares, particularmente sobre membranas, proteínas, lípidos y DNA (Andersen *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la mitocondria representa una fuente importante de ROS en los tejidos envejecidos (Cadenas *et al.*, 2000; Lenaz *et al.*, 2002). Frente a esta problemática, la vitamina C ha demostrado eliminar eficazmente tanto las ROS como el superóxido y el oxígeno simple (Hemila *et al.*, 1984; Nishikimi, 1975; Bodannes *et al.*, 1979). La vitamina C es más abundante en los tejidos en los cuales la producción es ROS es más importante, fenómeno definido como adaptación al estrés oxidativo (Palmer *et al.*, 2003).

Junto con el glutatión, las vitaminas antioxidantes forman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando su potencial oxidativo destructor (Chao *et al.*, 2002). Gracias a su configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, la vitamina C es capaz de participar

en la reducción directa del oxígeno, funcionando como un sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas (Mayes, 1997). También es capaz de inhibir la formación de radicales superóxido o de nitrosaminas durante la digestión (Epperly *et al.*, 2004)

Aunque el ácido ascórbico es soluble en agua, puede proteger la membrana celular contra la peroxidación lipídica interceptando directamente los radicales libres generados en la fase acuosa, evitando así su ataque a los lípidos de membranas (McCay, 1985). Además, se ha demostrado que la vitamina C protege la capacidad antioxidante de la vitamina E, el antioxidante liposoluble que se encuentra en las membranas celulares (Packer *et al.*, 1979).

En fluidos, la vitamina C tiene la habilidad de neutralizar $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, ácidos grasos, radicales peroxilos ($\text{LOO}\cdot$) y radicales alcoxikoxilos (Bigard, 2001). Al interior de las células la vitamina C refuerza la acción de la vitamina E y de la GSH regenerando sus formas activas después de haber reaccionado con ROS (Evans, 2000; Ashton *et al.*, 1999).

1.5.7 Vitamina C y enfermedad de Alzheimer

El estrés oxidativo es la característica unificadora e innegable entre las EN (Kim *et al.*, 2015), siendo uno de los eventos más tempranos de la enfermedad de Alzheimer. La generación de ROS y su consiguiente daño y la respuesta celular normal a estas contribuye a gran parte de la patología característica de la AD (Zhu *et al.*, 2004; Nunomura *et al.*, 2006). El daño oxidativo ocurre cuando el equilibrio redox se altera de tal manera que la producción de ROS excede las defensas antioxidantes celulares, por

lo cual el tratamiento con antioxidantes podría ser una buena alternativa para combatir este fenómeno.

La administración de vitamina C ha tenido inesperados resultados positivos en modelos animales de AD y algunos estudios en humanos. Morris y su grupo de investigación (Morris *et al.*, 1998), luego del seguimiento de pacientes de 65 años suplementados con vitamina C, reportaron que ninguno de los sujetos suplementados desarrolló AD.

Otro estudio publicado por Engelhart y colaboradores (Engelhart *et al.*, 2002) mostró que una mayor ingesta de vitamina C estaba asociada con una reducción en el riesgo de AD, siendo mayor esta reducción en fumadores, sugiriendo un efecto mayor en pacientes con menor vitamina C basal. Sin embargo, los estudios basados en grandes poblaciones no han definido un efecto claro a largo plazo de la vitamina C en la AD.

Respecto a la AD, una observación interesante viene de modelos de ratón tratados con altas dosis de vitamina C, que mostraron una reducción directa de las placas amiloides (Cheng *et al.*, 2011; Kook *et al.*, 2014). Kook y su grupo de investigación (Kook *et al.*, 2014) diseñaron un modelo de ratón que lleva la mutación familiar 5XFD de AD y al mismo tiempo fue *knockout* (KO) para GULO, por lo tanto, tal como los humanos, este modelo de ratón no era capaz de sintetizar vitamina C y dependía de su adquisición por la dieta. En este modelo, luego de la suplementación con vitamina C, fue posible observar no solo una mejora general de la estructura de la barrera hematoencefálica y protección contra alteraciones mitocondriales en neuronas, sino también una reducción en la carga de placa amiloide en la corteza y el hipocampo de estos ratones (Kook *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que ciertas cantidades de vitamina C podrían ser protectoras frente a enfermedades como AD, y por lo tanto la vitamina C podría tener un posible rol

terapéutico en estas enfermedades.

Respecto al transportador de vitamina C en su forma reducida, SVCT2, en AD, dos trabajos (Dixit *et al.*, 2015; Warner *et al.*, 2015) han mostrado la relevancia del AA en contra la progresión de AD, en modelos de ratón mediante la inhibición de la expresión de SVCT2. En estos trabajos se generó un ratón SVCT2 +/- en el contexto APP/PSEN1 para producir un modelo de AD con capacidad reducida de absorción de ácido ascórbico. Estos ratones exhibieron no solo una disminución de su capacidad antioxidante por los bajos niveles de glutatión a nivel cerebral, sino que también mostraron aumento de acumulación amiloide, susceptibilidad a convulsiones y deterioro cognitivo (Dixit *et al.*, 2015; Warner *et al.*, 2015).



2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

Experimentos realizados por nuestro laboratorio hasta ahora determinaron la existencia de un transportador mitocondrial de ácido ascórbico que presenta un comportamiento cinético similar al de SVCT2 full length, y que tiene un claro rol en eventos patológicos como cáncer y estrés oxidativo. Sin embargo, la identidad de este transportador no es clara, y su relevancia en enfermedades neurodegenerativas, las que también se encuentran asociadas a estrés oxidativo, no ha sido estudiada.

En la actualidad no existen estudios que hayan determinado los cambios en la capacidad de captación de vitamina C en neuronas y glía en respuesta a los fenómenos moleculares asociados a la enfermedad de Alzheimer, mucho menos la compartimentalización de este nutriente en la mitocondria y su rol en la homeostasis redox a nivel de este organelo.

Estudios preliminares de nuestro laboratorio muestran un posible rol de SVCT2 en AD utilizando un modelo de ratón, J20, que acumula A β en la región hipocampal. Mediante inmunohistoquímica se observó alta reactividad hacia el anticuerpo anti-SVCT2 (**Figura 7**) que colocaliza con un marcador mitocondrial, sugiriendo que podría haber expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial en este modelo animal de AD. Debido a la relevancia del estrés oxidativo en mitocondria en la patogénesis de la AD, surge la pregunta **¿hay expresión de SVCT2 en neuronas?** y si es así, **¿esta aumenta en un contexto celular de la Enfermedad de Alzheimer?**

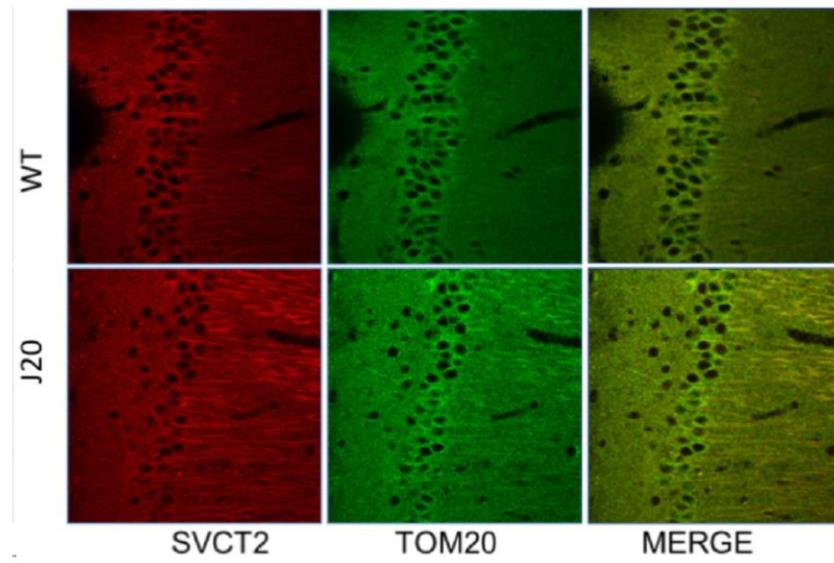


Figura 7. El modelo animal de AD expresa SVCT2.

El ratón J20 sobreexpresa APP, presenta mutaciones familiares de la AD y es usado como un modelo animal para estudiar la enfermedad. Se realizó, mediante inmunohistoquímica, un análisis de colocalización entre SVCT2 y el marcador mitocondrial TOM20 (translocasa de membrana externa mitocondrial), en cortes de la región hipocampal de ratones envejecidos. Tanto en el grupo control (WT) como el modelo de AD (J20) se observa expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial, la cual es mayor en el grupo J20 en comparación con el grupo control.

3. HIPÓTESIS

Basado en los antecedentes presentados de nuestro laboratorio, junto con la evidencia existente en literatura, proponemos que:

Los eventos moleculares asociados a estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer llevan a un aumento de la expresión del transportador mitocondrial de AA, el que corresponde a una isoforma del transportador SVCT2.



4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar al transportador mitocondrial de AA y su expresión en un modelo celular de Alzheimer.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1

Identificar el transportador de AA mitocondrial y expresarlo en células HEK293 para analizar su capacidad de transporte.

OBJETIVO 2

Caracterizar la expresión endógena del transportador de AA en neuronas hipocámpales y determinar cambios en los niveles de expresión y localización en respuesta a A β oligomérico.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular

Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora de células a 37 ° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica clase II.

5.1.1 Cultivo celular de HEK 293

Las células HEK293 corresponden a una línea celular derivada de riñón embrionario humano. Las células fueron mantenidas con medio de cultivo DMEM alta glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 mg/mL, para posteriormente ser transfectadas. Fueron sembradas en placas de Petri de 24 pocillos con 1 mL de medio de cultivo por pocillo y se realizó cambio de medio de cultivo cada dos días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 60% de confluencia, fueron transfectadas y luego de 24 horas, fijadas para ser usadas en inmunocitoquímica.

5.1.2 Cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón

Se obtuvieron cultivos primarios de ratones C57BL/6 en el 18 de gestación bajo lupa estereoscópica. La región hipocampal de los embriones fue microdisecionada, disociada y sembrada en placas tratadas con poli-lisina a una densidad de 320.000 células/mL. Las células obtenidas fueron sembradas y mantenidas en medio de cultivo utilizando medio

esencial mínimo (MEM) suplementado con suero de caballo al 10%, con DNasa (4ug/mL) y L-glutamina (2mM) durante las primeras 24 horas, luego, se cambió el medio por uno de alimentación que contiene MEM suplementado con 2% de suero de caballo, 2% de suero fetal bovino y 0,5% de N3 (suplemento que contiene BSA, putrescina, insulina, selenito de sodio, TH3, progesterona y corticosterona). Las neuronas se utilizaron a los 11 días de incubación *in vitro*.

5.2 Vectores

5.2.1 Vector pUC-SVCT2-373

Vector de ~3,8 kb diseñado previamente en nuestro laboratorio a base de una secuencia de *splicing* alternativo de SVCT2 humano de 1122 pb, que codifica para una proteína de 373 aminoácidos, contenida en el vector pUC. Este vector, en el que fue clonada la secuencia SVCT2-373, es comúnmente usado para clonamiento y tiene resistencia a Ampicilina. Es una molécula circular de 2686 pb y contiene un sitio de múltiple clonamiento con 13 sitios de corte únicos para enzimas de restricción.

5.2.2 Vector pEGFP-C2

El vector pEGFP-C2 es un plásmido comercial de ~4,7 kb que expresa la proteína fluorescente verde (EGFP) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Tiene resistencia a Kanamicina y presenta 53 sitios de corte únicos para enzimas de restricción.

5.3 Generación del vector pEGFP-C2-SCVT2 373

Para el subclonamiento, ambos plásmidos (pUC-SVCT2-373 y pEGFP-C2) fueron sometidos a digestión enzimática doble con las enzimas EcoRI y SacII (New England Biolabs) a 37 ° C durante 4 horas y sembrados en un gel de agarosa al 1%. Las bandas de los tamaños esperados fueron purificadas utilizando kit de extracción de plásmido desde gel, E.Z.N.A® Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek Inc). Para la reacción de ligación se usó una razón vector:inserto de 1:5, utilizando la enzima T4 ligasa (New England Biolabs), durante 8h a 37°C. Luego, mediante un shock térmico, bacterias XL1 Blue quimiocompetentes fueron transformadas con 5 µL de la muestra y se incubaron en 500 µL de medio LB en agitación constante a 37°C durante 1h. Luego, las bacterias fueron plaqueadas en placas LB/kanamicina (60ug/µL) e incubadas a 37°C por 16 h. Las colonias crecidas en las placas fueron seleccionadas usando un asa redonda y se sembraron en 2 mL de medio LB con kanamicina, dejándolas en agitación durante 12 h a 37°C.

5.4 Purificación de plásmido

Desde los cultivos de LB/kanamicina crecidos, fue purificado el plásmido utilizando el Kit comercial de extracción de plásmido desde inóculos bacterianos, E.Z.N.A. PlasmidMiniprep Kit II (Omega Bio-Tek Inc, Norcross, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.5 Tratamientos celulares

5.5.1 Transfección celular

Se sembraron células HEK 293 en placas de 24 pocillos con vidrios tratados previamente con poli-lisina. Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células por pocillo y fueron mantenidas durante 72 h en cultivo en DMEM alta glucosa 10% SBF. 0,5 ug de DNA fue transfectado por pocillo de células, utilizando medio OptiMEM. La transfección se realizó con el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante, cuando las células alcanzaron ~60% de confluencia. Pasadas 6 h después de la transfección, se realizó un cambio de medio a DMEM alta glucosa 5% SBF y se mantuvieron en cultivo por 24 horas hasta ser fijadas.

5.6 Agregación de oligómeros solubles del péptido A β ₁₋₄₀

El péptido A β ₁₋₄₀ (rPeptide, Bogart, GA, USA) fue reconstituido en DMSO a una concentración de 2,3 mM. De ese stock se tomó una alícuota de 2 μ L y se disolvió en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración de 80 μ M. Esta solución fue sometida a agitación vertical (500 rpm, 4 h, temperatura ambiente). El péptido fue utilizado a una concentraciones de 0,25 μ M, 0,5 μ M y 1 μ M.

5.7 Inmufluorescencia

La inmunocitoquímica tanto de células HEK 293 como de neuronas hipocampales se

realizó fijando las células con PFA 4%, realizando los lavados con Tris-PO₄, permeabilizando con Tris-BSA-Tritón 0,1% y diluyendo los anticuerpos en Tris-BSA 1%. La inmunocitoquímica se realizó con los anticuerpos primarios anti- SVCT2 (anti- goat, dilución 1:200, Santa Cruz), TOM20 (anti- rabbit, dilución 1:500, Santa Cruz), MAP2 (anti- mouse, dilución 1:200, Santa Cruz) y COXIV (anti- rabbit, dilución 1:500, Abcam). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Cy3 anti- goat, Alexa Fluor 488 anti- rabbit y Cy5 anti- mouse de Thermo Fisher Scientific, a una dilución 1:400. En el mix de anticuerpos se agregó el marcador nuclear DAPI en una dilución 1:300. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche y los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara oscura. Las imágenes se obtuvieron en el microscopio Confocal Espectral LSM780 NLO, Zeiss y en el microscopio láser de superresolución, ELYRA – SIM Zeiss.

5.8 Bioinformática

5.8.1 Predicción estructural de SVCT2 *in silico*

El modelo de SVCT2 humano completo fue generado usando la estructura cristalográfica del transportador de uracilo UraA de E. coli (código PDB: 3qe7) [REF Lu F. Nature 2011 doi: 10.1038/nature09885], mientras que el modelo de SVCT2-373 (mitocondrial) fue creado usando dos repeticiones idénticas de la secuencia SVCT2-373, alineada con dos segmentos incluyendo los residuos 99 – 326, 374 – 575 del modelo SVCT2 como templado. Para generar estos modelos se utilizó *Modeller* 9.18, y la minimización

energética se realizó usando el algoritmo gradiente conjugado en *MacroModel*. Para evaluar la habilidad de SVCT2 mitocondrial de interactuar con el ácido ascórbico, se realizó un ensayo de *docking* proteína-ligando usando ambos modelos de SVCT2 y la estructura de ácido ascórbico disponible en la base de datos PubChem (CID: 54670067). El análisis y comparación de los modelos y complejos, incluyendo los parámetros estructurales y energéticos se llevó a cabo utilizando el programa *Psi-Pred*, y el cálculo de la energía mediante *Prime* para predecir el ΔG_{bind} teórico. Todas las imágenes de los modelos fueron creadas con PyMol (versión 1.5, DeLano Scientific LLC).

5.9 Análisis estadísticos

Los resultados fueron graficados como promedio \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y Test no pareado y se consideraron valores estadísticamente significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ versus control. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism* (GraphPad Prism, Ca, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Identificar el transportador de AA mitocondrial y expresarlo en células HEK para analizar su capacidad de transporte

6.1.1 Análisis in silico de secuencias que codifiquen para el transportador mitocondrial de ácido ascórbico

La evidencia estudiada permite sugerir un vínculo entre el aumento del nivel de expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial y la respuesta celular al estrés oxidativo, mostrando la relevancia de la vitamina C y del transportador SVCT2. Con respecto a SVCT2, en estudios realizados por nuestro grupo de investigación en líneas celulares y tejidos cancerígenos la proteína expresada presenta las propiedades cinéticas de transporte de SVCT2 (Muñoz-Montesino, y otros, 2014), pero su tamaño no coincide con el de SVCT2 *full length* descrito por literatura (Peña, y otros, 2019), sino que tiene un tamaño menor. Nuestro grupo de investigación realizó bioinformáticamente la búsqueda de secuencias de *splicing* alternativo para el gen de SVCT2 humano *full length*, y se encontró una secuencia putativa que es idéntica a la primera mitad de la secuencia del transportador SVCT2 *full length* descrito en literatura: NCBI Reference Sequence: XM_017028181; contiene 2242 pb y da origen a una isoforma más corta correspondiente aproximadamente a la mitad de la proteína *full length*: NCBI Reference Sequence: XP_016883670.1 de 45 kDa, 373 aminoácidos, que es reconocida por anticuerpos policlonales dirigidos contra el N-terminal de SVCT2. Además, posee una firma de *sorting*

mitocondrial. Nuestro grupo diseñó partidores de clonamiento y obtuvo la secuencia desde la línea celular de cáncer de mama ZR-75 (que expresa el transportador mitocondrial de ácido ascórbico). Paralelamente, utilizando esta secuencia putativa se generó el esquema topológico del transportador (**Figura 8**) que muestra a SVCT2 *full length*, correspondiendo los primeros 373 aminoácidos marcados en celeste a esta isoforma corta de SVCT2, y los aminoácidos marcados en verde a los dominios transmembrana que conforman el poro. Se denominó como SVCT2-373a esta secuencia para SVCT2 corto mitocondrial, que sería usada posteriormente para clonamiento, subclonamiento y expresión en células.



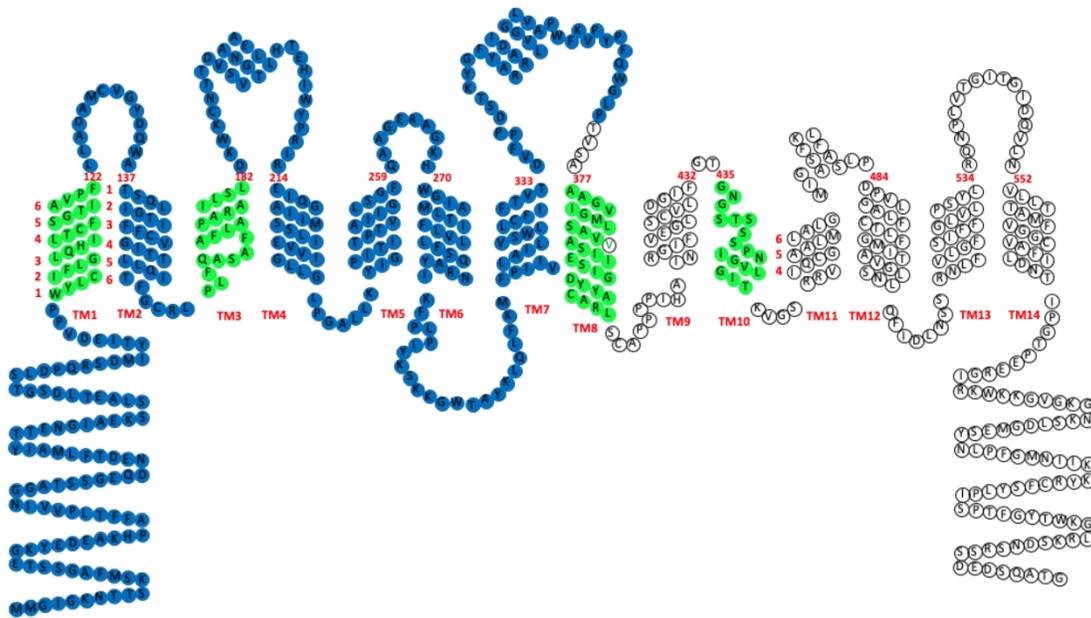


Figura 8. Esquema topológico del transportador de ácido ascórbico SVCT2.

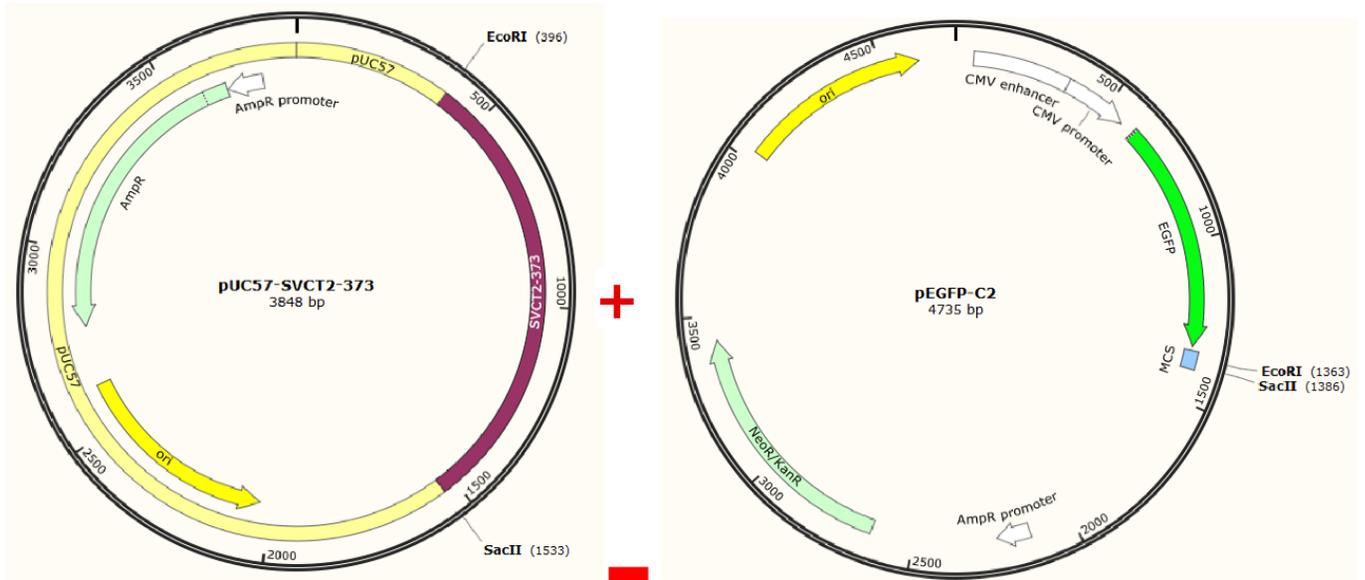
Esquema topológico generado para la secuencia putativa (aminoácidos en celeste), que es idéntica en la primera parte al SVCT2 *full length* descrito en literatura, del cotransportador Na⁺/ácido ascórbico 2 mitocondrial. Esta isoforma más corta corresponde aproximadamente a la mitad de la proteína *full length* (45 kDa, 373 aminoácidos), y es reconocida por anticuerpos policlonales dirigidos contra el N-terminal de SVCT2. Además, posee una firma de *sorting* mitocondrial. Debido a que presenta 373 aminoácidos, fue denominada como SVCT2-373.

6.1.2 Subclonamiento de SVCT2-373 en el plásmido pEGFP-C2

Para expresar la secuencia SVCT2-373 en proteína se decidió realizar el subclonamiento de esta en un vector de expresión que codifica para la proteína fluorescente verde (EGFP), desde el plásmido pUC57-SVCT2-373 que contenía la secuencia (sintetizado previamente por el grupo de investigación) (**Figura 9**).

Para llevar esto a cabo, se realizó un ensayo de restricción para liberar el inserto de interés (SVCT2-373). El ensayo de restricción, utilizando las enzimas EcoRI y SacII, permitió la liberación de un fragmento de ~1116 pb, además de la liberación de un fragmento de ~2732 pb, correspondiente al vector pUC57 (**Figura 10**). De forma paralela, el plásmido pEGFP-C2 fue digerido con las enzimas EcoRI y SacII. Finalmente, ambos fragmentos, productos de la doble digestión, fueron ligados utilizando la enzima T4 ligasa.

Para corroborar la correcta inserción de SVCT2-373 en el plásmido pEGFP-C2 se realizó un ensayo de restricción doble al vector resultado de la ligación, usando las enzimas ya mencionadas para el subclonamiento. Los resultados muestran que la digestión libera dos fragmentos de ~1116 pb y ~4734pb, correspondientes al inserto SVCT2-373 y el plásmido pEGFP-C2 respectivamente (**Figura 11**). Por lo tanto, el plásmido generado contiene la secuencia SVCT2-373 y está inserta en un plásmido pEGFP-C2 que codifica la proteína fluorescente verde usada como reportero, generando una proteína de fusión.



**Digestión con EcoRI y SacII
Ligación con Ligasa T4**

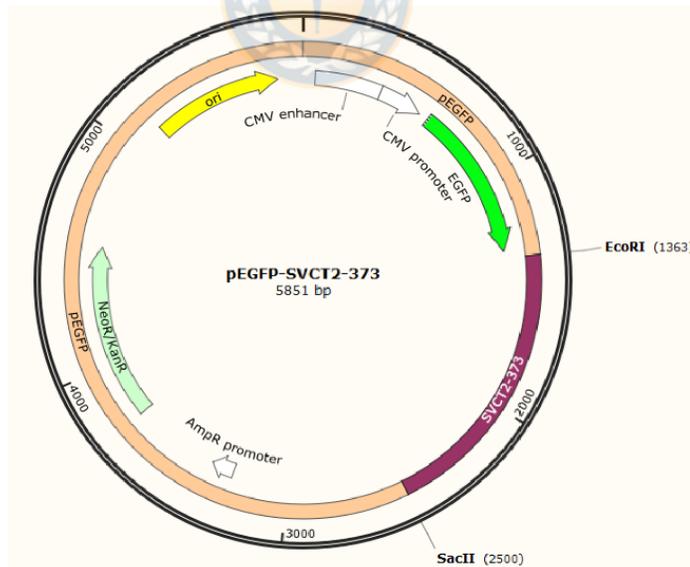


Figura 9. Esquema de subclonamiento de SVCT2-373 en el plásmido pEGFP-C2.

Estrategia experimental utilizada para el subclonamiento del inserto SVCT2-373 desde el plásmido pUC57 hacia el plásmido pEGFP-C2, mediante digestión doble con las enzimas EcoRI y SacII de los plásmidos pUC57-SVCT2-373 y pEGFP-C2, y posterior ligación con la enzima T4 de los fragmentos SVCT2-373 y el plásmido pEGFP-C2 digerido, generando el vector pEGFP-SVCT2-373. El plásmido pUC57 presenta resistencia a ampicilina y el plásmido pEGFP-C2 a kanamicina. Este último expresa una proteína reportera, la EGFP, bajo el control del promotor CMV. Por lo que el producto de este subclonamiento expresa la proteína SVCT2-373 y EGFP como reportera.



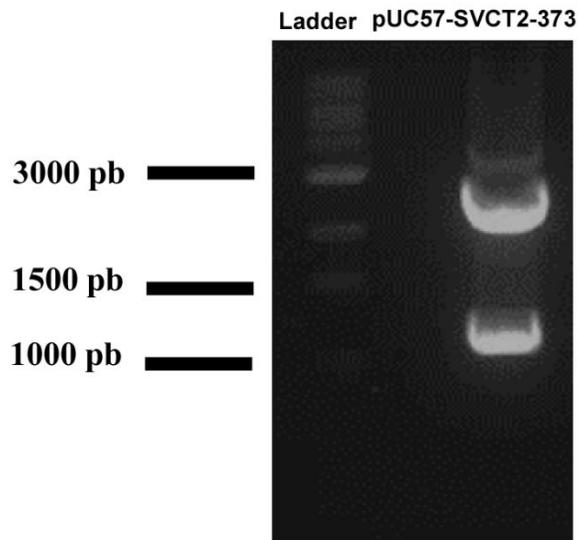


Figura 10. Ensayo de restricción del plásmido pUC57-SVCT2-373 con las enzimas EcoRI y SacII.

Se realizó un ensayo de restricción doble del plásmido pUC57-SVCT2-373 con las enzimas EcoRI y SacII. La doble digestión permitió la liberación de dos fragmentos, de ~1116 pb y ~2732 pb, correspondientes al inserto de interés SVCT2-373 y al vector pUC57, respectivamente. Se utilizó un gel al 1% de agarosa y las condiciones electroforéticas fueron 60V por 45 minutos.

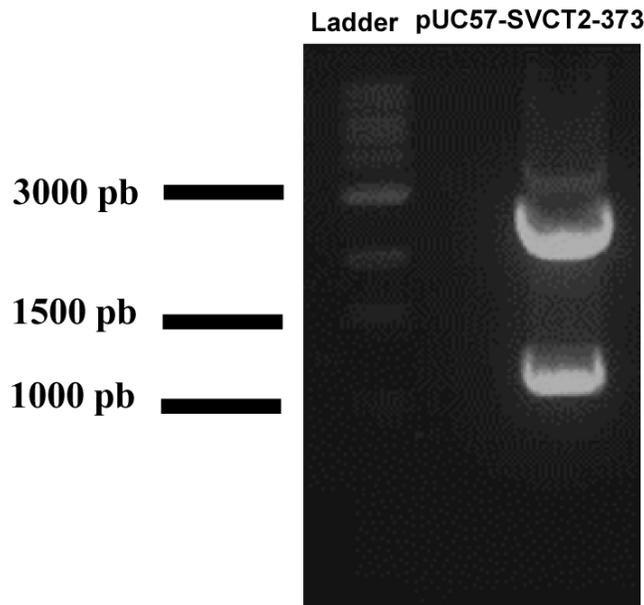


Figura 11. Ensayo de restricción del plásmido pEGFP-SVCT2-373 con las enzimas EcoRI y SacII.

Para analizar el correcto subclonamiento de SVCT2-373 en el plásmido pEGFP-C2, se realizó un análisis de la ligación utilizando las enzimas EcoRI y SacII para la doble digestión del plásmido pEGFP-SVCT2-373. Este ensayo de restricción liberó dos fragmentos, de ~1116 pb y ~4734pb, correspondientes al inserto SVCT2-373 y el plásmido pEGFP-C2, por lo tanto, el plásmido generado contiene la secuencia SVCT2-373 y está inserta en un plásmido pEGFP-C2. Se utilizó un gel al 1% de agarosa y las condiciones electroforéticas fueron 60V por 45 minutos.

6.1.3 Expresión de SVCT2-373 en la línea celular HEK 293

Una vez realizado el subclonamiento de SVCT2-373 en el vector pEGFP-C2, se evaluó su capacidad de expresar la proteína SVCT2-373, en fusión con la proteína fluorescente verde. Con este fin se realizó la transfección del vector en células HEK 293 durante 6 horas y luego se incubaron las células por 24 horas en cultivo. Pasado el tiempo de incubación las células fueron fijadas y sometidas a ensayos de inmunofluorescencia con los marcadores de organelos LAMP2 (proteína 2 de membrana asociada al lisosoma), TOM20 (translocasa de membrana externa mitocondrial) y el anticuerpo contra SVCT2. Las imágenes obtenidas mediante microscopía motorizada invertida muestran la colocalización entre la fluorescencia de GFP y el anticuerpo contra SVCT2, así como también la superposición de las marcas de TOM20 con SVCT2 y LAMP2 con SVCT2 (**Figura 12**). Los análisis de colocalización, usando los test de Manders y Pearson mostraron que Tanto el parámetro Manders (**Figura 13A**) como Pearson (**Figura 13B**) muestran que la expresión del plásmido pEGFP-SVCT2-373 colocaliza con la expresión de SVCT2 detectada por el anticuerpo ($>0,7$). También destaca el alto nivel de colocalización de la expresión del plásmido pEGFP-SVCT2-373 y el anticuerpo contra el marcador mitocondrial TOM20, por lo cual estos resultados sugieren que la proteína SVCT2-373 se encuentra a nivel mitocondrial y es detectada por el anticuerpo contra SVCT2.

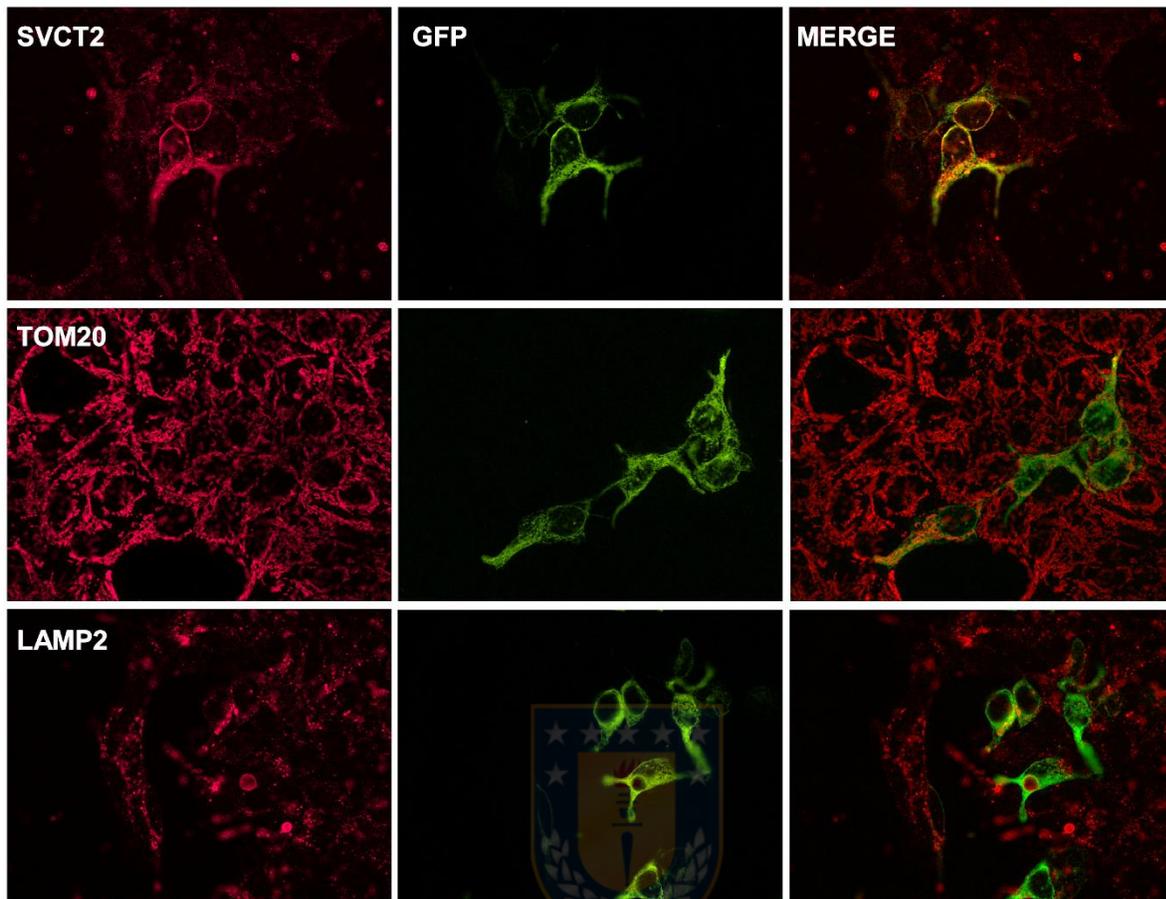


Figura 12. Expresión de SVCT2-373 en células HEK transfectadas con el plásmido pEGFP-SVCT2-373.

Para determinar si la proteína SVCT2-373 era reconocida por el anticuerpo SVCT2 y para estudiar la localización subcelular de SVCT2 373, el plásmido pEGFP-SVCT2-373 fue transfectado en células HEK 293 y posteriormente se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos contra SVCT2 (en rojo), TOM20 (marcador mitocondrial, en rojo) y LAMP2 (marcador lisosomal, en rojo). La expresión de SVCT2-373 se observó mediante la fluorescencia de EGFP (en verde) y se realizó la colocalización con los anticuerpos SVCT2, TOM20 y LAMP2. N=3.

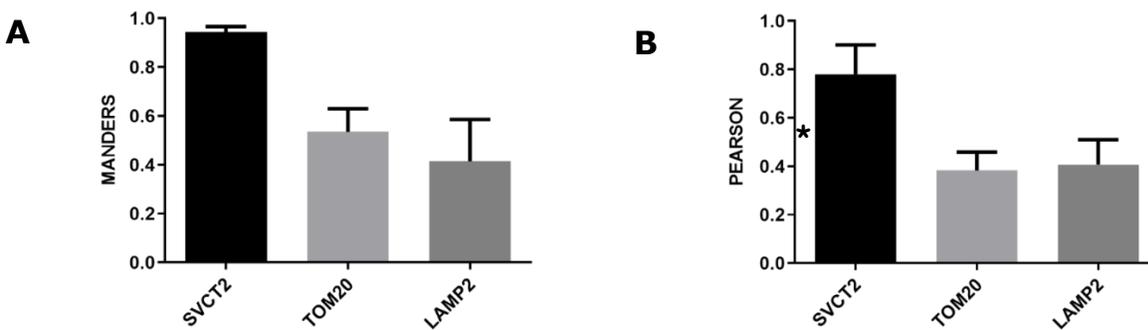


Figura 13. Colocalización de SVCT2-373 con los marcadores SVCT2, TOM20 y LAMP2.

A) Parámetro de Manders de colocalización de EGFP con SVCT2, TOM20 y LAMP2, $p: 0,314$, ns. **B)** Parámetro de Pearson de colocalización de GFP con SVCT2, TOM20 y LAMP2, $p: 0,005$, s. Los parámetros Manders y Pearson sugieren que la proteína expresada por pEGFP-SVCT2-373 es reconocida por anti- SVCT2 y que tiene localización mitocondrial.



6.1.4 Modelamiento *in silico* por homología de SVCT2-373

Una vez definida la localización de la expresión de la proteína SVCT2-373, surge la interrogante sobre si esta es capaz o no de adoptar la estructura tridimensional acorde a un transportador SVCT2 y unir su ligando, el ácido ascórbico.

Con el fin de responder a esta pregunta se construyó un modelo de SVCT2 *full length* mediante modelamiento por homología, usando como templado la estructura del transportador de uracilo (Chang *et al.*, 2017). Una vez obtenidos los modelos iniciales para la secuencia SVCT2 *full length* utilizando el programa *Modeller*, se escogió el mejor de ellos en base a su menor valor de puntuación molpdf, que corresponde a un indicador de calidad del modelamiento. Luego, el modelo escogido fue sometido a una minimización de energía en un gradiente conjugado de energía mediante el programa *MacroModel*. Con esto se obtuvo el modelo minimizado final que fue utilizado para comparación con el modelo generado para SVCT2-373. Para este caso, se realizó una estrategia similar de modelamiento utilizando la secuencia de SVCT2-373 duplicada y como templado el transportador de uracilo. El alineamiento de cada copia de la secuencia de SVCT2-373 con la porción N-terminal y C-terminal del transportador de uracilo, respectivamente, se realizó de manera automática con el propio programa *Modeller*. Luego de minimizado energéticamente, el modelo final obtenido corresponde a un homodímero que presentó 12 dominios transmembrana, reconstruyendo una estructura análoga a SVCT2 *full length*. De forma paralela se obtuvo un modelo por homología y con minimización de energía a partir de la secuencia de SVCT2 *full length*, como se aprecia en las vistas lateral (**Figura 14A**) y superior del modelo (**Figura 14B**).

Por otro lado, las secuencias SVCT2-373 y SVCT2 *full length* fueron sometidas a predicciones de estructura secundaria, utilizando los servidores Jpred y Psi-Pred para evaluar la mantención de elementos estructurales y su localización independientes a la estrategia de modelamiento empleada. De forma interesante, tanto el modelamiento con Modeller como los servidores Jpred y Psi-Pred mostraron que la secuencia SVCT2-373 generaría hélices, en las mismas regiones observadas en el modelo de SVCT2 *full length* (**Figura 15**), lo que refuerza el potencial ensamblaje de SVCT2-373 para generar un transportador funcional. Específicamente, la repetición de la estructura del modelo generado para SVCT2-373 alinea con la segunda mitad de SVCT2 *full length*, lo cual sugiere que SVCT2-373 podría estar funcionando como homodímero.

Para evaluar la capacidad de SVCT2-373 de interactuar con el ácido ascórbico se realizó un ensayo de *docking* proteína-ligando, utilizando ambos modelos de SVCT2 y la estructura del ácido ascórbico disponible en la base de datos *PubChem*. Los complejos fueron creados mediante el programa Glide y se midieron parámetros energéticos como la energía total (**Figura 16A**), el parámetro *docking score* (**Figura 16B**), que describe la capacidad de unión de un con la proteína blanco y el deltaG de unión teórico (**Figura 16C**). Tanto el valor de la energía total y la energía libre de unión como *docking score* son favorables en ambos modelos, lo cual indica que los modelos generados son estructural y energéticamente posibles, y además SVCT2-373 sería capaz de unir al ácido ascórbico.

En conjunto, los resultados presentados permiten sugerir que la secuencia SVCT2-373 genera una proteína de localización mitocondrial que es reconocida por el anticuerpo anti

SVCT2, tiene una estructura proteica energéticamente posible, posee dominios transmembrana, podría funcionar como homodímero y además sería capaz de unir su ligando, el ácido ascórbico.



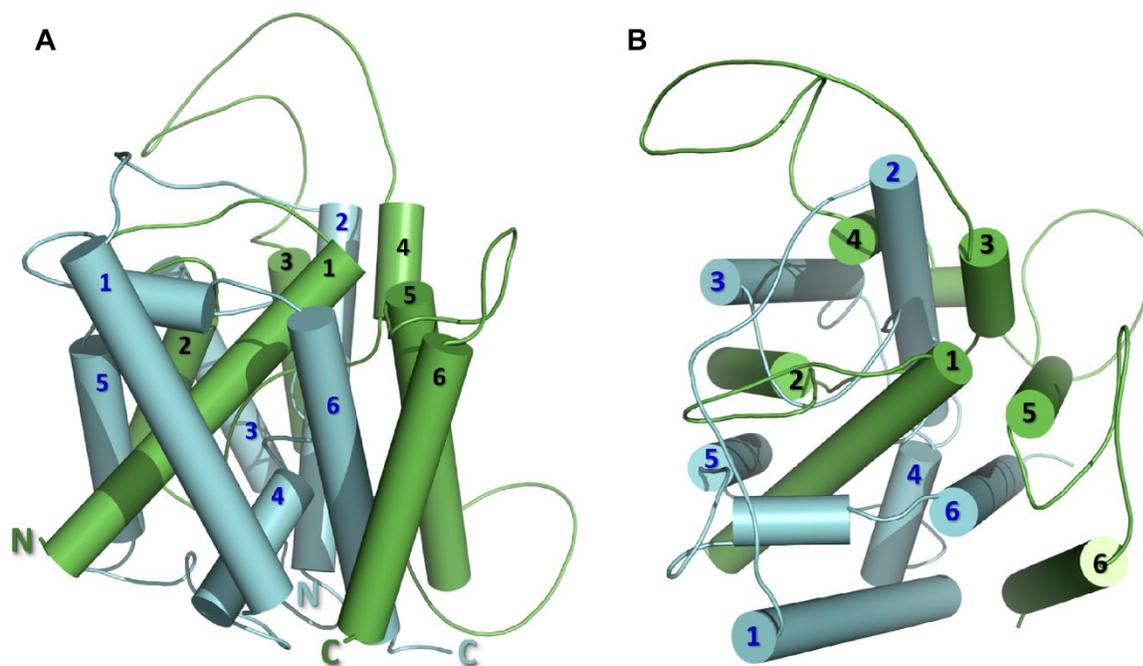
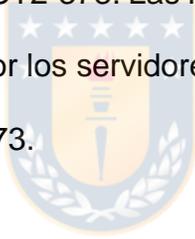


Figura 14. Modelo in silico de SVCT2-373.

A) Vista lateral del modelo obtenido por Modeller y MacroModel de la proteína codificada por la secuencia SVCT2-373. En colores cian y verde se muestran las cadenas idénticas que conforman el homodímero. **B)** Vista superior del homodímero de 12 dominios transmembrana.

Figura 15. Alineamiento estructural de las predicciones de SVCT2 full length y SVCT2-373 y los modelos generados.

Las secuencias de SVCT2 *full length* y SVCT2-373 fueron sometidas a predicción de su estructura secundaria mediante los servidores *Jpred* y *Psi-Pred*. Se incluyen además estos elementos estructurales observados en los modelos creados. El alineamiento de estos 3 resultados muestra que ambas proteínas tendrían 12 dominios transmembrana, funcionando SVCT2-373 como homodímero. Los cilindros azules corresponden a los dominios transmembrana presentes en el modelo *in silico* de SVCT2 *full length*, los cilindros amarillos y rosados corresponden a la primera y segunda repetición de la secuencia del modelo *in silico* de SVCT2-373. Las H en azul y rosado corresponden a las predicciones de hélices realizadas por los servidores *Jpred* y *Psi-pred*, respectivamente, a partir de la secuencia de SVCT2-373.



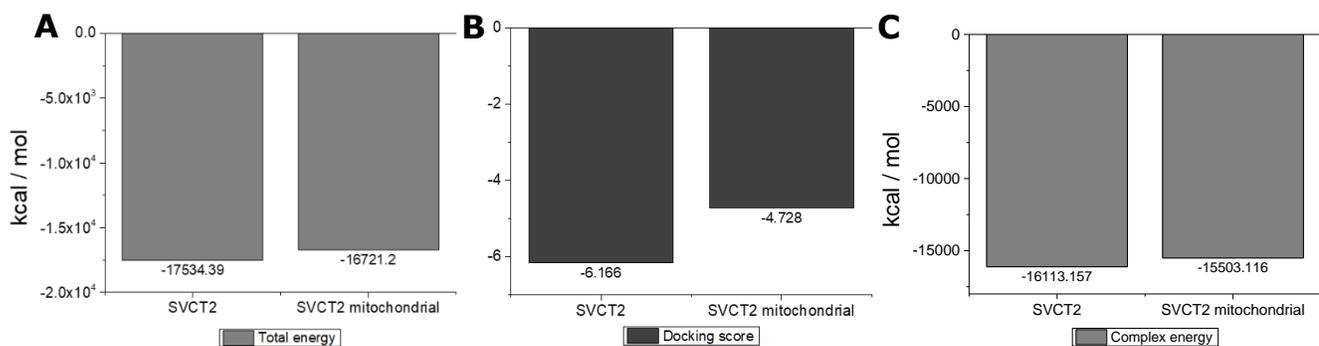


Figura 16. Energía total, docking score y deltaG de unión de modelos in silico.

A) Medición de energía total de los modelos *in silico* de SVCT2 y SVCT2-373 (mitocondrial) en kcal/mol, que indica qué tan estable es la proteína. Tanto el modelo de SVCT2 como el de SVCT2 mitocondrial presentan energías favorables, lo cual significa que estas estructuras generadas en el modelamiento sí son energéticamente posibles.

B) Medición del *docking score* de los modelos *in silico* de SVCT2 y SVCT2-373 (mitocondrial), el cual indica qué tan bien se une el ligando a la proteína. Tanto el modelo de SVCT2 como el de SVCT2 mitocondrial presentan *docking score* favorable, por lo que ambos serían capaces de unir el ligando, ácido ascórbico.

C) Medición del deltaG de unión de los modelos *in silico* de SVCT2 y SVCT2-373 (mitocondrial) en kcal/mol, que indica qué tan bien energéticamente se une el ligando al receptor, mostrando que el complejo proteína-ligando es favorable debido a que la energía del complejo es menor a la suma de las energías de la proteína y el ligando por separado.

6.2 Caracterizar la expresión endógena del transportador mitocondrial en neuronas hipocampales y determinar cambios en los niveles de expresión y localización en respuesta a A β oligomérico.

6.2.1 Caracterización del modelo a utilizar y medios de detección

Debido a la relevancia del estrés oxidativo en la patogénesis de la AD, la relación entre la agregación de oligómeros de A β (A β O_s) y la etiología de la enfermedad, la disfunción mitocondrial presente en la AD, los efectos positivos observados a raíz de la administración de vitamina C en pacientes susceptibles a desarrollar AD y la importancia que ha mostrado tener SVTC2 a nivel cerebral, es que en esta tesis se decidió realizar experimentos en un modelo celular de la AD para estudiar SVCT2. Este modelo consiste de cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón incubadas con A β O_s. Estos experimentos se desarrollaron con el fin de determinar si existe expresión de SVCT2 en estas células, con especial enfoque en su expresión a nivel mitocondrial y cómo se altera esta expresión en respuesta a A β O_s 40, debido a que existen reportes sobre que este afecta la morfología mitocondrial de las neuronas en este modelo celular (Tesis doctoral J. Panes, en desarrollo).

Con el fin de identificar la expresión del transportador SVCT2 en neuronas hipocampales, se realizó previamente una caracterización de los anticuerpos a utilizar, en la línea celular HEK 293. Para llevar a cabo esta caracterización se cultivaron las células hasta que tuvieran un 60% de confluencia, y posteriormente se realizó inmunocitoquímica utilizando

los anticuerpos mitocondriales contra TOM20 (**Figura 17A**) y COXIV (**Figura 18A**). Las imágenes se obtuvieron con microscopía motorizada invertida y fueron analizadas con el programa *Fiji* para medir la colocalización mediante parámetros específicos: Pearson y Manders. TOM20 tuvo una colocalización de $0,856 \pm 0,084$ según el parámetro de Manders (**Figura 17B**) y de $0,886 \pm 0,043$ con SVCT2 según el parámetro de Pearson (**Figura 17C**), mientras que COXIV tuvo una colocalización de $0,813 \pm 0,136$ según el parámetro de Manders (**Figura 18B**) y de $0,805 \pm 0,105$ según el parámetro de Pearson (**Figura 18C**), lo cual corrobora que la expresión es principalmente mitocondrial en esta línea celular y que los anticuerpos reconocen esta isoforma de manera específica.

Posteriormente, y con el propósito de verificar la proporción glia-neurona de los cultivos de neuronas hipocampales a utilizar, se realizó un ensayo de caracterización del cultivo de neuronas hipocampales de ratón 11DIV mediante inmunocitoquímica, utilizando marcadores para neurona y glia: anti- MAP2 (Proteína asociada a microtúbulo 2) y anti- GFAP (Proteína ácida fibrilar glial), respectivamente. Las imágenes obtenidas mediante microscopía motorizada invertida muestran que efectivamente el cultivo contiene tanto neuronas como glia, y que ambos tipos celulares son reconocidos por los anticuerpos utilizados (**Figura 19**).

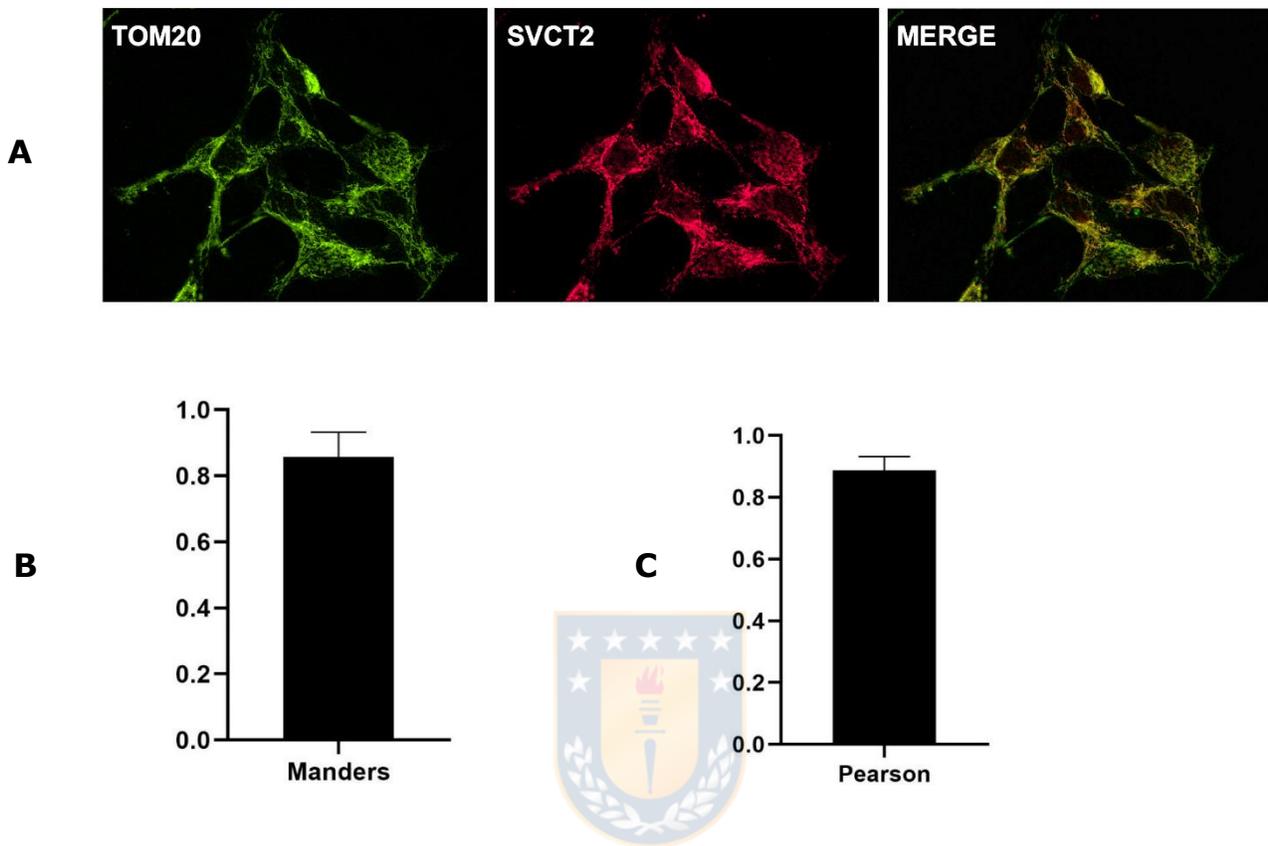


Figura 17. Colocalización de la expresión de TOM20 y SVCT2 en células HEK 293.

A) Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje con un anticuerpo anti- SVCT2 y un anticuerpo contra el marcador mitocondrial de membrana externa, TOM20, para corroborar que la localización de SVCT2 era mitocondrial en las células HEK 293. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía motorizada invertida a un aumento de 60x. **B)** Parámetro de Manders de colocalización: 0,856 ± 0,084. **C)** Parámetro de Pearson de colocalización: 0,886 ± 0,043. Este resultado comprueba que la expresión de SVCT2 en células HEK 293 es a nivel mitocondrial. N=3.

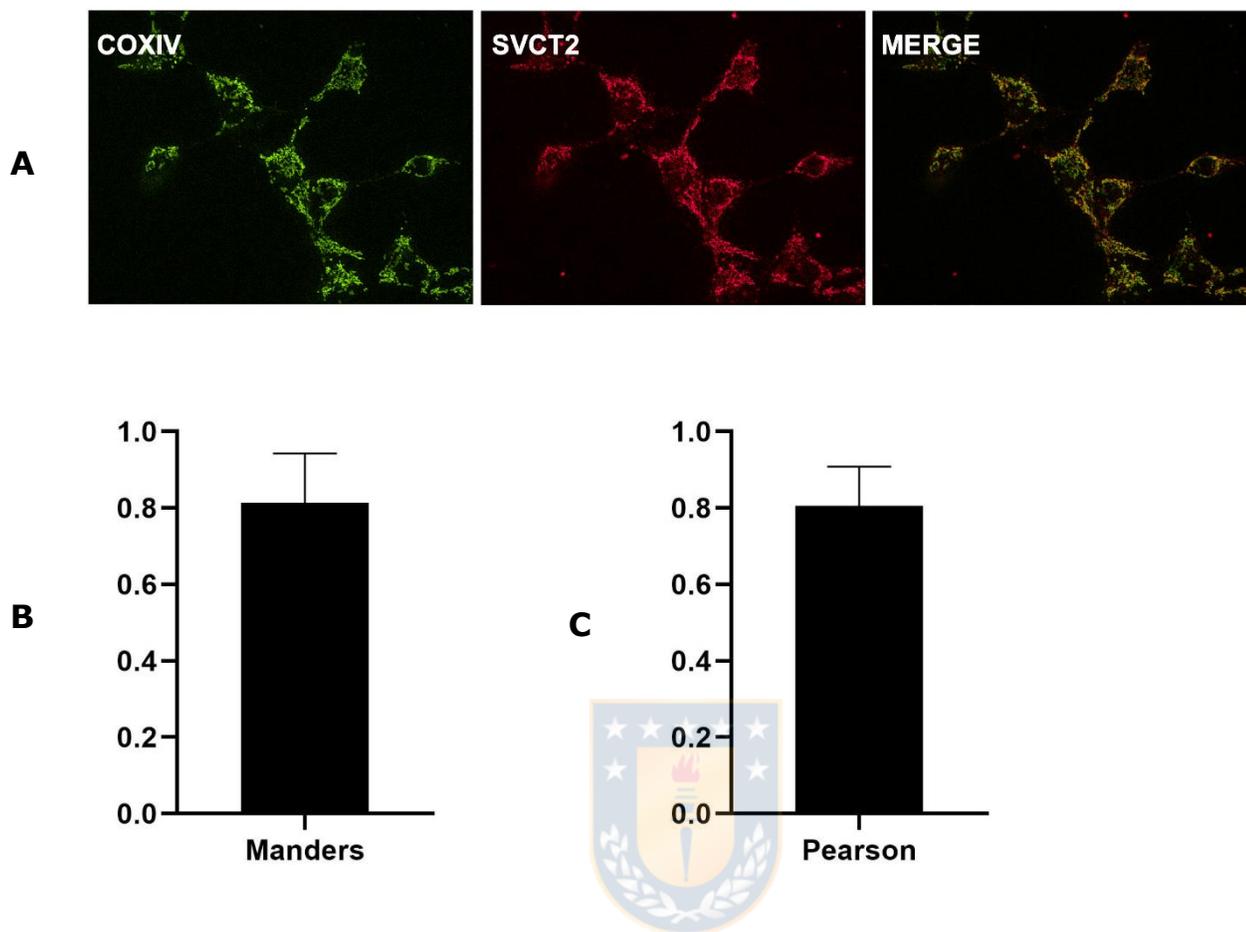


Figura 18. Colocalización de la expresión de COXIV y SVCT2 en células HEK 293.

A) Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando un doble marcaje con un anticuerpo anti- SVCT2 y un anticuerpo contra el marcador mitocondrial de membrana interna, COXIV, para corroborar que la localización de SVCT2 era mitocondrial en las células HEK 293. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía motorizada invertida a un aumento de 60x. **B)** Parámetro de Manders de colocalización: $0,813 \pm 0,136$. **C)** Parámetro de Pearson de colocalización: $0,805 \pm 0,105$. Este resultado comprueba que la expresión de SVCT2 en células HEK 293 es a nivel mitocondrial. N=3.

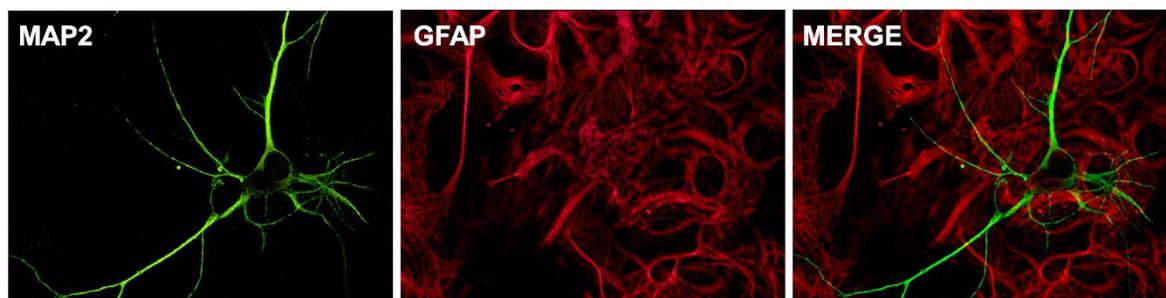


Figura 19. Expresión de MAP2 y GFAP en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Con el fin de caracterizar el modelo celular de AD a utilizar, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje en cultivos primarios neuronales hipocampales.

Se usó el anticuerpo MAP2 (proteína asociada a microtúbulo 2) como marcador neuronal y el anticuerpo GFAP (proteína ácida fibrilar glial) como marcador glial. Los anticuerpos secundarios fueron, respectivamente, verde para MAP2 y rojo para GFAP. La superposición de las imágenes entrega una estimación de la composición del cultivo celular y permite identificar morfológicamente las células nerviosas que lo componen.

N=1.

6.2.2 Caracterización de la expresión de transportadores de ácido ascórbico en neuronas hipocampales sometidas a tratamiento con A β oligomérico

Existe literatura que reporta la expresión de SVCT2 en neuronas, pero no especifica su localización intracelular. La localización de un transportador mitocondrial en patologías como el cáncer y fenómenos asociados a estrés oxidativo nos impulsó a intentar comprender si se lleva a cabo un fenómeno similar en enfermedades neurodegenerativas, como el AD.

Diversos estudios han demostrado que la localización del transportador de ácido ascórbico con características cinéticas similares al previamente descrito SVCT2 se encuentra en la membrana interna a nivel mitocondrial (Fiorani *et al.*, 2013; Muñoz-Montesino *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2019), por lo cual surge la interrogante sobre qué sucede en neuronas, específicamente en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Este modelo consiste en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón 11DIV tratadas con A β oligomérico 0,5 μ M.

Para determinar si en estos cultivos SVCT2 se expresa a nivel mitocondrial, se trataron los cultivos con A β oligomérico a concentraciones crecientes durante 24 horas y luego se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos previamente estandarizados: anti- MAP2, anti- TOM20 y anti- SVCT2. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal (**Figura 20**), y el posterior análisis de colocalización fue realizado con el programa *Fiji* para obtener los parámetros de Manders (**Figura 21A**) (p:0,5691, ns) y Pearson (**Figura 21B**) (p: 0,1394, ns). Los gráficos muestran que la

colocalización de TOM20 y SVCT2 aumenta en las neuronas tratadas con A β oligomérico a concentraciones de 0,25 μ M y 0,5 μ M, con respecto a la condición control. Además, la intensidad de fluorescencia de SVCT2 con respecto al marcador nuclear DAPI aumenta de forma significativa a la concentración 0,25 μ M del tratamiento con A β oligomérico (**Figura 21C**) (p: 0,0260, s).



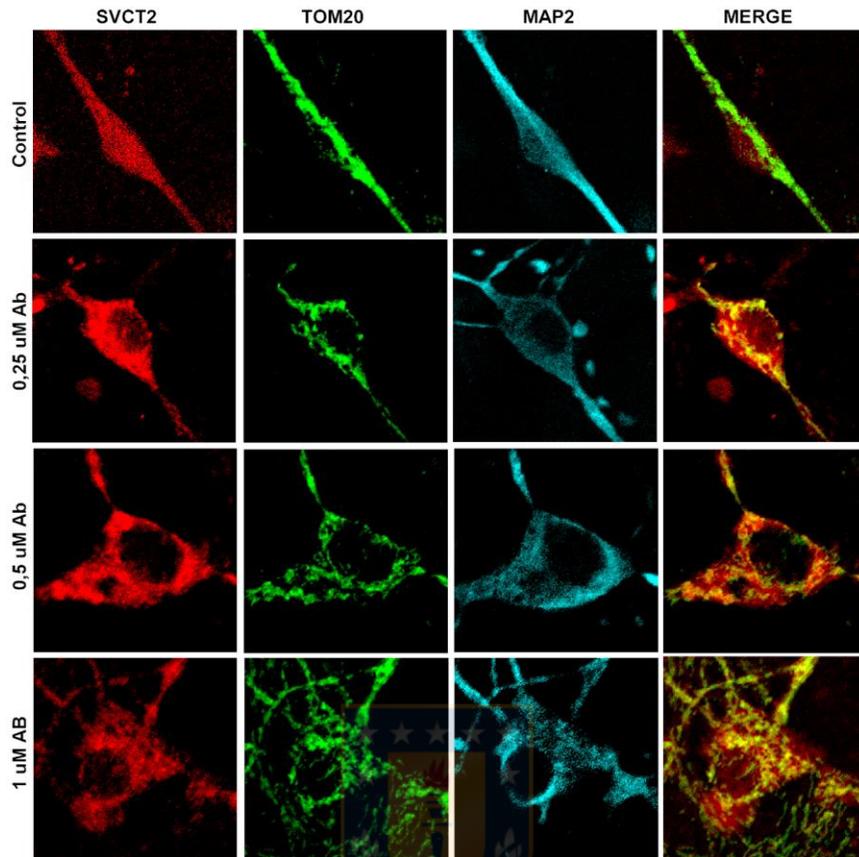


Figura 20. Colocalización SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales.

Para determinar si en cultivos de neuronas hipocampales tratados con A β oligomérico había expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de neuronas tratadas con concentraciones crecientes de A β oligomérico. Se utilizaron los anticuerpos contra SVCT2 (rojo), contra TOM20 (verde), contra MAP2 (celeste) y se superpusieron los canales rojo y verde para el MERGE. Las neuronas fueron incubadas a condición control, a 0,25 uM A β , a 0,5 uM A β y 1 uM A β durante 24 horas y las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Estas sugieren que el tratamiento con A β oligomérico aumenta la expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial. N=1.

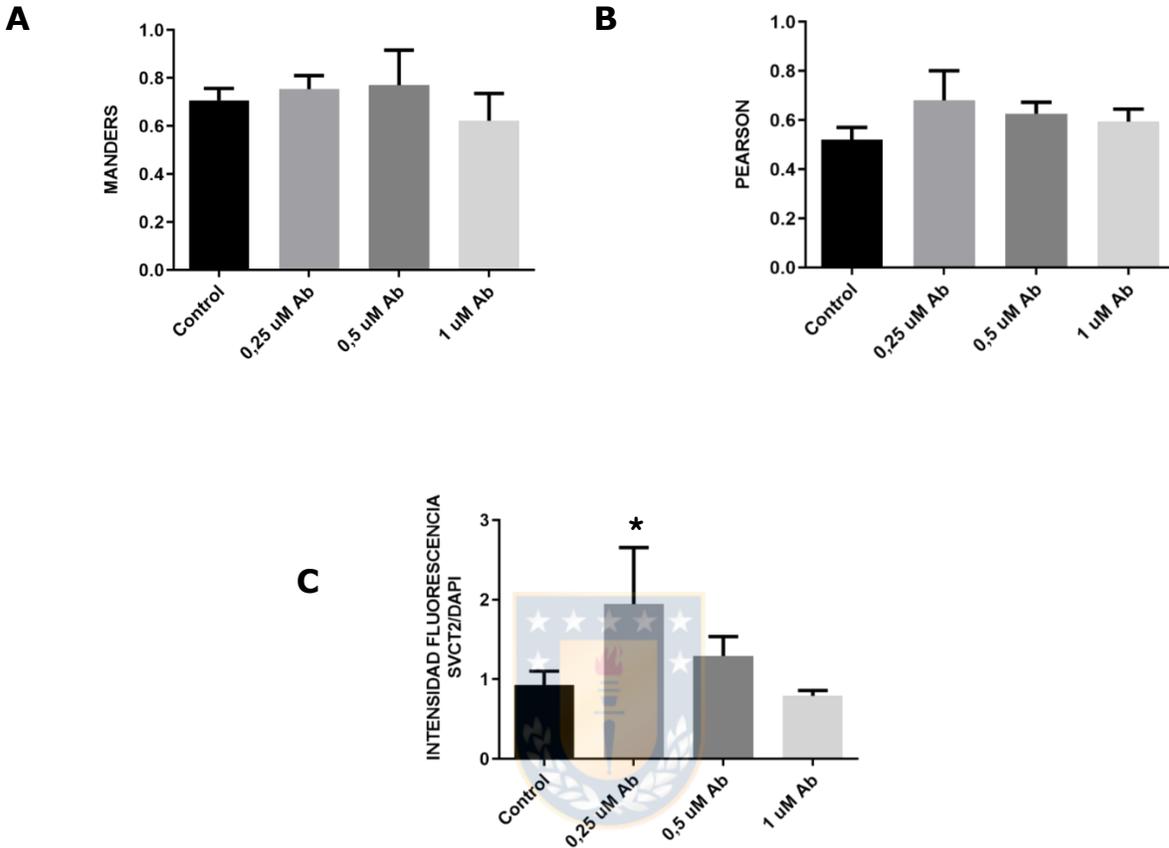


Figura 21. Análisis de colocalización de SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales.

A) Parámetro Manders de colocalización de SVCT2 y TOM20, $p:0,5691$, ns. **B)** Parámetro Pearson de colocalización de SVCT2 y TOM20, $p: 0,1394$, ns. **C)** Intensidad de fluorescencia de SVCT2 con respecto al marcador nuclear DAPI, $p: 0,0260$, s. La intensidad de fluorescencia de SVCT2 aumenta de forma significativa en las neuronas tratadas con $0,25 \mu\text{M A}\beta$, en comparación con las neuronas control.

Posteriormente, y con el propósito de tener una visión más clara sobre de la localización de SVCT2 en las neuronas hipocampales, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia de doble marcaje en condición control y tratamiento con 0,5 uM de A β por 24 horas a las neuronas. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia de superresolución, la cual tiene permite separar ópticamente moléculas con una resolución dos veces mejor que la microscopía confocal convencional (**Figura 22**). Posteriormente, fueron analizadas con el programa *Fiji* para obtener los parámetros de colocación (**Figura 23A y 23B**) e intensidad de fluorescencia (**Figura 23C**). El parámetro de Manders de las neuronas control fue de $0,717 \pm 0,075$ y el de las neuronas tratadas con A β oligomérico fue de $0,56 \pm 0,175$ (**Figura 23A**), mientras que el parámetro de Pearson de las neuronas control fue de $0,71 \pm 0,035$ y el de las neuronas tratadas con A β oligomérico fue de $0,493 \pm 0,117$ (**Figura 23B**), el cual disminuye de forma significativa ($p: 0,0296$, s). Estos resultados sugieren que el tratamiento de las neuronas con A β oligomérico disminuye la colocación de SVCT2 con TOM20. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia de SVCT2 con respecto a TOM20 (**Figura 23C**), aumenta de forma significativa ($p: 0,0059$, s), presentando las neuronas control un radio intensidad SVCT2/intensidad TOM20 de $0,672 \pm 0,048$ y las neuronas tratadas con A β oligomérico un radio de $1,327 \pm 1,203$.

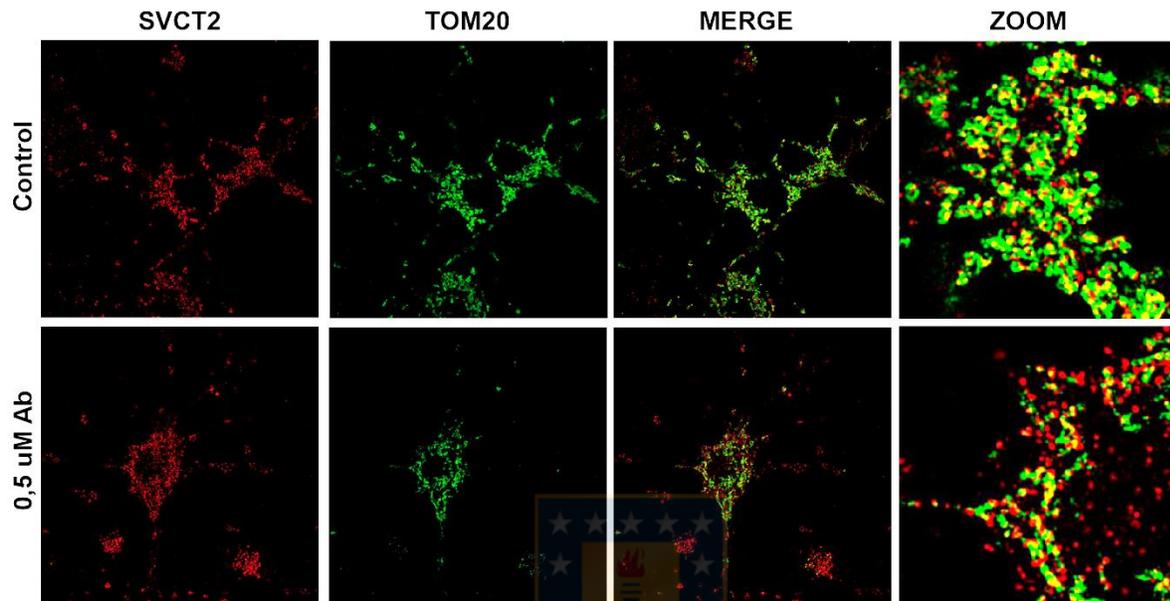


Figura 22. Colocalización SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales-superresolución.

Para obtener una mejor resolución de este experimento, se realizó una inmunofluorescencia de neuronas hipocampales tratadas con A β oligomérico y las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia de superresolución. En la inmunocitoquímica se utilizaron los anticuerpos contra SVCT2 (rojo) y contra TOM20 (verde). Se superpusieron los canales rojo y verde para el MERGE, donde el color amarillo observado sugiere la colocalización de SVCT2 y TOM20. Las neuronas fueron incubadas a condición control y a 0,5 μ M A β oligomérico durante 24 horas. N=1.

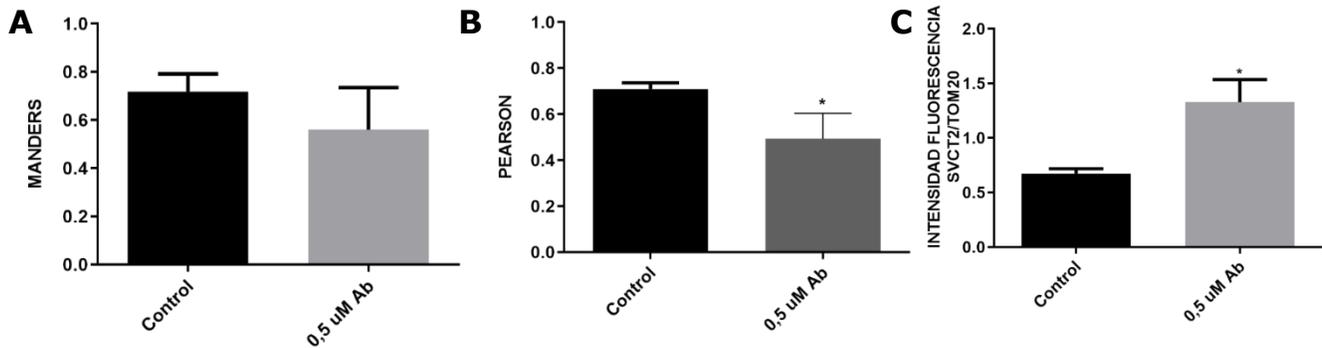


Figura 23. Análisis de colocalización de SVCT2 y TOM20 en neuronas hipocampales- superresolución.

A) Parámetro Manders de colocalización de la inmunofluorescencia contra SVCT2 y TOM20. Manders neuronas control: $0,717 \pm 0,075$, Manders neuronas tratadas con A β oligomérico: $0,56 \pm 0,175$. La diferencia tuvo un valor p: $0,2232$, ns. **B)** Parámetro Pearson de colocalización de la inmunofluorescencia contra SVCT2 y TOM20. Pearson neuronas control: $0,71 \pm 0,035$, Pearson neuronas tratadas con A β oligomérico: $0,493 \pm 0,117$. La diferencia tuvo un valor p: $0,0296$, s. **C)** Intensidad de fluorescencia de SVCT2 con respecto al marcador TOM20. Las neuronas control presentaron un ratio intensidad SVCT2/intensidad TOM20 de $0,672 \pm 0,048$ y las neuronas tratadas con A β oligomérico un ratio de $1,327 \pm 1,203$. La diferencia tuvo un valor p: $0,0059$, s. Tanto la colocalización de SVCT2 según el parámetro Pearson como la intensidad de fluorescencia de SVCT2 presentan cambios significativos en neuronas hipocampales tratadas con A β oligomérico.

CONCLUSIONES

Objetivo 1: Identificar el transportador de AA mitocondrial y expresarlo en células HEK para analizar su capacidad de transporte.

- _ La secuencia SVCT2-373 genera una proteína de localización mitocondrial
- _ La proteína SVCT2-373 es reconocida por el anticuerpo anti- SVCT2
- _ SVCT2-373 tiene una estructura proteica energéticamente posible, posee dominios transmembrana
- _ SVCT2-373 podría funcionar como homodímero y además sería capaz de unir su ligando, el ácido ascórbico.

Objetivo 2: Caracterizar la expresión endógena del transportador de AA en neuronas hipocámpales y determinar cambios en los niveles de expresión y localización en respuesta a A β oligomérico.

- _ El transportador SVCT2 se encuentra a nivel mitocondrial
- _ En este modelo celular de la enfermedad de Alzheimer hay variaciones de esta expresión mitocondrial en respuesta a tratamiento con A β oligomérico
- _ Mediante superresolución se observa menor colocalización de SVCT2 y TOM20, pero una mayor intensidad de fluorescencia, en el modelo celular de Alzheimer
- _ Se necesitan más experimentos para reforzar estos resultados.

7. DISCUSIÓN

Estudios preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el transportador mitocondrial de AA correspondería a una forma más corta del transportador SVCT2. Dada su relevancia en fenómenos patológicos asociados a estrés oxidativo, nos propusimos dilucidar la identidad de este transportador.

7.1 Expresión exógena de SVCT2-373 en la línea celular HEK 293

Fue con este propósito que se realizó la búsqueda de secuencias de *splicing* alternativo del gen de SVCT2 humano, SLC23A2. De esta búsqueda surgió la propuesta de una secuencia putativa que correspondía a la primera mitad del SVCT2 descrito en literatura, siendo más corta, pero reconocida por los anticuerpos contra el N-terminal de SVCT2 y conteniendo la firma de sorting mitocondrial Px[D/E]xx[K/R], presente en la familia de transportadores mitocondriales SLC25 que median el intercambio de metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna (Mahlke *et al.*, 1990). El esquema topológico generado con esta secuencia de 373 aminoácidos presentó 7 dominios transmembrana, lo cual concuerda con la evidencia estructural de SVCT2 *full length* considerando que esta fuera la primera mitad de un dímero. Como no era suficiente tener un esquema topológico para demostrar que esta secuencia efectivamente daba origen a una proteína funcional, se realizó el clonamiento y subclonamiento de SVCT2-373 en un vector que la expresaría junto con una proteína reportera (GFP). La expresión de la proteína SVCT2-373 en la línea celular HEK 293 y posterior ensayo de inmunofluorescencia mostró que

la proteína era reconocida por el anticuerpo anti- SVCT2 y que, se localizaba a nivel mitocondrial, además de otros compartimentos que no fueron identificados en este trabajo de tesis. Sin embargo, durante este trabajo no pudimos determinar la funcionalidad de la SVCT2-373, es decir, que efectivamente esta proteína fuera capaz de mediar el transporte de AA en la mitocondria. Como ensayos adicionales que apoyaran esta hipótesis, realizamos estudios bioinformáticos utilizando herramientas como el modelamiento por homología y la predicción de estructuras secundarias. Nos basamos en estudios actualizados de la familia de transportadores a la que pertenece SVCT2: En el 2017 Chang y colaboradores (Chang *et al.*, 2017) publicaron una revisión sobre una nueva clase de transportadores de siete dominios transmembrana invertidos repetidos. En este trabajo se resaltaba el hecho de que familias de transportadores de solutos estaban relacionadas unas con otras, a pesar de poseer baja similitud de secuencia. Una de las clases estructurales recientemente descubierta se conforma de las familias SLC4, SLC23 y SLC26. La familia humana SLC23 está compuesta de 3 genes codificantes para transportadores de vitamina C, perteneciente a la familia simportadora de nucleobases/cationes, también llamada transportadores de nucleobases/ascorbato. A pesar de que las identidades promedio de la secuencia de aminoácidos entre las familias humanas es solo del 15%, las estructuras cristalinas revelaron una alta homología en el plegamiento de las proteínas con el simportador de protones para uracilo, UraA de *E. coli* (Lu *et al.*, 2011) y para xantina, UapA de *A.nidulans* (Alguel *et al.*, 2016). La similitud en el plegamiento proteico incluye los dominios transmembrana, que están compuestos de 14 segmentos. Otras características son que existe una pseudosimetría interna de 7 dominios transmembrana cada uno, lo cual no es evidente en la estructura

primaria de las proteínas. Ambas mitades están orientadas en direcciones opuestas en la membranas, formando una estructura entrelazada de dos repeticiones invertidas. El transportador UraA fue el miembro fundador de esta clase estructural, que se refiere a 7 dominios transmembrana repetidos invertidos (7TMIR). Debido al descubrimiento de esta nueva clase estructural es que se decidió utilizar como molde en el modelamiento por homología de SVCT2 y SVCT2-373 a la estructura cristalina de UraA.

Mediante el programa *Modeller* se generaron dos modelos por homología, SVCT2 *full length* y SVCT2-373, usando como molde el simportador de uracilo/H⁺ de *Escherichia coli*, (Lu, y otros, 2011) (Yu, y otros, 2017). Los modelos obtenidos fueron similares tanto en estructura, energía y afinidad por el sustrato, siendo SVCT2-373 modelado como homodímero. Cabe destacar que, en cuanto a energía, parámetro que indica si la estructura predicha es energéticamente posible, tanto el modelo de SVCT2 *full length* como el modelo SVCT2-373 entregaron parámetros favorables, que demuestran la posibilidad de que exista esta estructura. En cuanto a la afinidad de la proteína modelada hacia su ligando, en este caso el AA, se repitió la misma tendencia en que tanto el modelo SVCT2 *full length* como el modelo SVCT2-373 presentaron valores favorables para la interacción con ligando. El que ambos modelos hayan presentado estructuras (mismo número de dominios transmembrana y loops), valores de energía y afinidad por su ligando similares demuestran que proponer a SVCT2 mitocondrial como un homodímero de la secuencia SVCT2-373 es factible. Además, el hecho de que 3 programas o servidores distintos (*Modeller*, *Jpred* y *Psi-Pred*) predijeran la misma cantidad y ubicación de regiones de la secuencia SVCT2-373 donde habría hélices (dominios transmembrana), también valida la propuesta de SVCT2 mitocondrial como homodímero.

Con respecto al modelo obtenido de SVCT2-373, es importante destacar que tanto los valores obtenidos para la caracterización estructural (*docking score*), la caracterización energética de la proteína (energía total) y la caracterización energética del complejo proteína-ligando (ΔG de unión) fueron favorables y les otorgan a estos resultados una repercusión biológica. El hecho de que los modelos generados hayan tenido tanto energía como score de unión a su ligando favorables, demuestra que la conformación homodimérica de SVCT2-373 es posible, lo cual además se apoyó con la predicción estructural en base a su secuencia.

Si bien los modelos generados presentan 12 dominios transmembrana en vez de 14, esto corresponde a un efecto normal del programa utilizado para el modelamiento por homología, donde las proteínas pierden una hélice corta que está más expuesta hacia la membrana a cada lado. Esta leve diferencia no afecta la energía ni la funcionalidad de los modelos propuestos, por lo cual se considera despreciable.

Un experimento clave para corroborar la capacidad de transporte de esta proteína sería realizar un ensayo de captación de ácido ascórbico en mitocondrias de células transfectadas con el plásmido pEGFP-SVCT2-373. Sin embargo, existe evidencia que muestra que a altas concentraciones, GFP tiende a homodimerizar (Zhang *et al.*, 2002), por lo cual sería recomendable clonar SVCT2-373 en otro plásmido, evaluar transporte, y así corroborar que la dimerización de SVCT2-373 existe y no es causada por la dimerización de GFP.

Nuestros estudios permitieron la expresión transiente de SVCT2-373 mediante la transfección con un plásmido. Nuestro siguiente paso sería lograr la expresión estable de SVCT2-373 mediante técnicas de biología molecular como la generación de adenovirus

o lentivirus que contengan la secuencia. Al mantener la expresión en el tiempo de esta proteína, podremos determinar si la expresión de SVCT2-373 en las células juega un rol significativo contra estrés oxidativo o genera protección frente a muerte celular.

También es importante tener en cuenta, para los estudios funcionales que se realicen a posterior de la proteína SVCT-373, que las condiciones a las que este transportador debiera funcionar son muy distintas a las condiciones de transporte de SVCT2 de membrana. En la literatura ha sido ampliamente descrito el transporte de AA a nivel de membrana plasmática, donde las condiciones de transporte son de alto sodio y bajo potasio, con una Km de 20-30 μM , siendo necesario el sodio para realizar el cotransporte de AA mediante SVCT2. Sin embargo, a nivel mitocondrial las condiciones del transporte son diferentes: alto potasio y bajo sodio, pero altos niveles de AA. En estas condiciones estudios de nuestro laboratorio han reportado que el transporte de AA a nivel mitocondrial presenta una Km de 600 μM y es independiente de sodio. Al realizar estudios funcionales deberíamos determinar si se cumple esta premisa.

Tomando en cuenta todos los resultados de este objetivo de la investigación, en conjunto con los estudios previos realizados en nuestro grupo y la evidencia presente en la literatura, se propone un modelo para la expresión de SVCT2 como un homodímero a nivel mitocondrial (**Figura 24**): Debido al splicing alternativo del gen SLC23A2, se produciría la proteína SVCT2-373 de sorting mitocondrial, la cual se anclaría a la membrana interna de la mitocondria homodimerizando, conformando un transportador de AA funcional. Evidentemente este modelo requiere estudios funcionales que determinen si esta hipótesis es correcta.

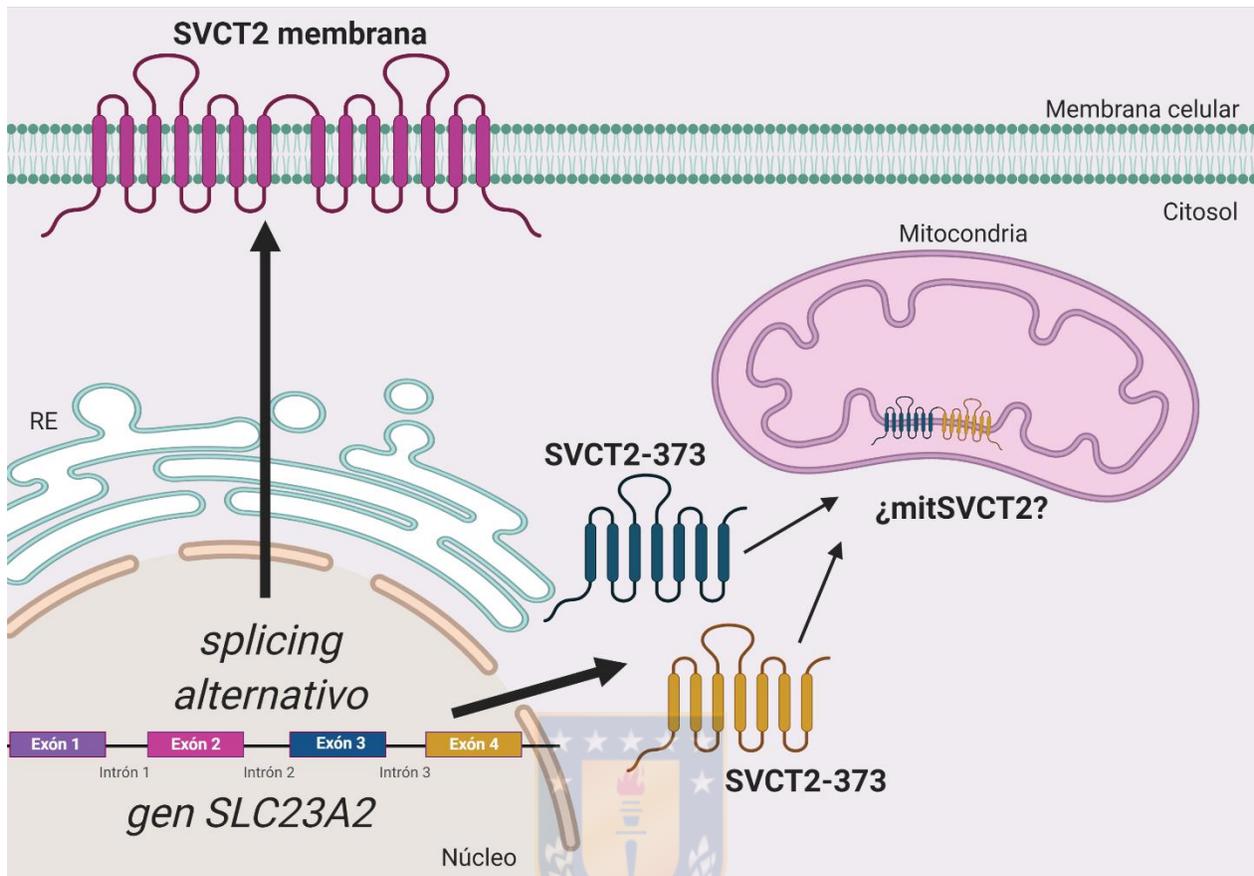


Figura 24. Modelo propuesto de la expresión de SVCT2-373 como homodímero.

Debido al *splicing* alternativo del gen *SLC23A2*, se produciría la proteína SVCT2-373 con *sorting* mitocondrial, la cual se anclaría a la membrana interna de la mitocondria homodimerizando, conformando un transportador de AA funcional.

7.2 Caracterización de la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón

Este primer acercamiento a la localización de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón en un modelo celular sugiere que el transportador podría estar expresándose a nivel mitocondrial y que esta localización estaría afectada por las concentraciones del péptido A β oligomérico. Debido a la relevancia de la expresión de SVCT2, y la evidencia que demuestra su localización a nivel mitocondrial, es necesario entonces enfocar el estudio en resolver definitivamente la identidad de esta proteína de neuronas hipocampales, mediante técnicas como espectrometría de masas o secuenciación, y así determinar su posible función para combatir el estrés oxidativo asociado a AD y otras enfermedades neurodegenerativas.

Una vez dilucidada la posible identidad del transportador mitocondrial SVCT2, y dado su preponderante rol demostrado en literatura en condiciones de estrés oxidativo y también su relación con la enfermedad de Alzheimer, surgió la interrogante sobre si estaría involucrado en la etiología de la AD, tal como la evidencia muestra su rol en cáncer.

Los estudios de inmunofluorescencia realizados y analizados, tanto mediante microscopía confocal como microscopía de superresolución, mostraron que efectivamente hay expresión de SVCT2 en neuronas hipocampales a nivel mitocondrial, tanto en condiciones control como tratadas con el péptido A β . Ahora, si bien los resultados obtenidos sugieren un aumento de esta colocalización a determinadas

concentraciones de A β , se requieren más estudios que lo apoyen. En experimentos posteriores sería muy interesante poder comparar la colocación de SVCT2 con marcadores mitocondriales de membrana interna y externa a través de superresolución, para así analizar los parámetros Pearson y Manders y establecer si existe algún tipo de redistribución interna del transportador a nivel mitocondrial en respuesta a las ROS. Además, sería de gran interés determinar si la proteína SVCT2 expresada en mitocondria de neuronas hipocampales, corresponde efectivamente a SVCT2-373. En este sentido sería interesante expresar SVCT2-373 en modelos neuronales y determinar si evita daño oxidativo producido por A β O_s (**Figura 25**). Los trabajos mencionados en esta tesis sugieren una modificación de los niveles de SVCT2 mitocondrial tanto en el contexto de estrés oxidativo en general como en la AD, por lo que el estudio de su identidad y posible función frente al daño producido por A β O_s toman relevancia pues podrían mostrar un nuevo *target* terapéutico para combatir esta enfermedad.

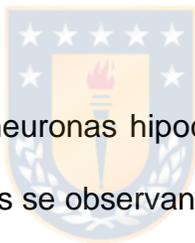
Por otro lado, es de gran interés para nuestro grupo dilucidar la localización subcelular de SVCT2 en este modelo de la Enfermedad de Alzheimer, diferenciando la expresión en membrana interna y externa mitocondrial. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que SVCT2 mitocondrial se localiza en membrana interna de la mitocondria (Peña *et al.*, 2019), sin embargo, en esta tesis solo se analizó su expresión con un marcador de membrana externa mitocondrial, por lo cual sería relevante realizar un experimento con el mismo tratamiento con oligómeros del péptido A β sobre neuronas hipocampales, usando esta vez en la inmunofluorescencia el marcador de membrana interna. Los resultados obtenidos por microscopía de superresolución sugieren una disminución de la expresión de SVCT2 a nivel de membrana externa mitocondrial, lo cual

podría significar que hay una disminución general de la expresión de SVCT2 a nivel mitocondrial, o que esta se redistribuye hacia otro subcompartimento como la membrana interna.

La expresión relativa de SVCT2 presentó tendencia a aumentar en los experimentos de las Figuras 21 y 23, sin embargo, esta fue calculada en relación a distintos marcadores que podrían o no estar afectados en su expresión por el tratamiento con A β oligomérico. Por lo cual, es un desafío determinar cuál sería el mejor marcador contra el cual comparar la expresión de SVCT2 posterior al tratamiento.

Con respecto al tratamiento con A β oligomérico en neuronas, existe evidencia sobre los efectos que puede tener a nivel de transporte. Por ejemplo, se ha demostrado que el A β perjudica el transporte de glucosa en neuronas hipocampales y corticales (Mark *et al.*, 1997), también existe evidencia que indica que el péptido beta amiloide disminuye la expresión y función de los transportadores de glutamato en neuronas hipocampales (Tong *et al.*, 2017), así como también podría afectar la localización de GLUT2 en cultivos neuronales retinianos (Oliveira *et al.*, 2015). Estos trabajos demostraron que el A β puede afectar la expresión, función o localización de diversos transportadores, por lo cual es interesante el determinar si esto también ocurre con el transportador SVCT2. Con respecto a los tipos de microscopía utilizados en este trabajo, se decidió, luego de obtener imágenes de microscopía confocal, utilizar microscopía de superresolución. El poder resolutivo de un microscopio óptico está limitado a 200 nm en el eje lateral y a 500 nm en la dirección axial, debido al límite de difracción de la luz. La microscopía de superresolución utiliza una tecnología con poder de resolución que excede el límite de difracción y permite separar ópticamente moléculas con una resolución dos veces mejor,

comparada con la microscopía confocal convencional. Por lo tanto, la microscopía de superresolución tiene gran utilidad en el estudio de la arquitectura y dinámica de proteínas en compartimentos subcelulares, como es el caso de SVCT2 en la membrana interna mitocondrial. Además, permite el uso de fluoróforos tradicionales, por lo que una misma inmunocitoquímica podría ser analizada en primer lugar por microscopía confocal convencional, y luego, ser analizada mediante microscopía de superresolución (Vangindertael, *et al.*, 2018). En una publicación previa de nuestro grupo de investigación se utilizó la microscopía de superresolución para diferenciar la expresión de SVCT2 en membrana interna versus membrana externa, por lo cual los anticuerpos y la técnica están previamente estandarizados para inmunocitoquímica y obtención de imágenes con superresolución (Peña *et al.*, 2019).



Dado que en los experimentos en neuronas hipocampales tratadas con el péptido A β oligomérico presentados en esta tesis se observan datos controversiales con respecto a la colocalización de SVCT2 con el marcador de membrana externa mitocondrial TOM20, dependiendo del tipo de microscopía utilizado, surge la interrogante sobre si efectivamente los resultados fueron dispares o se debe a que la microscopía confocal capta la señal de forma más general a nivel mitocondrial que la microscopía de superresolución, por lo que se deben realizar experimentos para diferenciar entre membrana interna y externa. Además, los experimentos presentados de neuronas en este trabajo fueron realizados una sola vez, por lo que es necesario realizar más repeticiones para llegar a una conclusión al respecto de los niveles de expresión de SVCT2 en respuesta a A β y su colocalización con marcadores de membrana interna y externa mitocondrial.

La enfermedad de Alzheimer en estos momentos un gran problema de salud pública en nuestra sociedad. Sus efectos no ocurren solo a nivel personal, sino también en los ámbitos familiar y social. La discapacidad que produce afecta a las actividades cotidianas del paciente y deteriora su calidad de vida, generando a la vez dependencia de cuidadores, lo que conlleva una importante carga para la familia. Según estudios sobre la salud de cuidadores de personas con EA, se estima que alrededor del 60-70% padecen depresión, estrés, ansiedad y problemas musculares derivados directamente del cuidado (Ceafa y F. Sanitas, 2016). Esto pone en evidencia que los sistemas de salud deben potenciar la investigación científica que busque comprender la etiología de la enfermedad de Alzheimer y encontrar posibles *targets* terapéuticos. En este contexto, los resultados de esta tesis podrían contribuir a abrir una nueva área de investigación, enfocándose en el estudio del transportador SVCT2 mitocondrial y su posible alteración en esta patología.

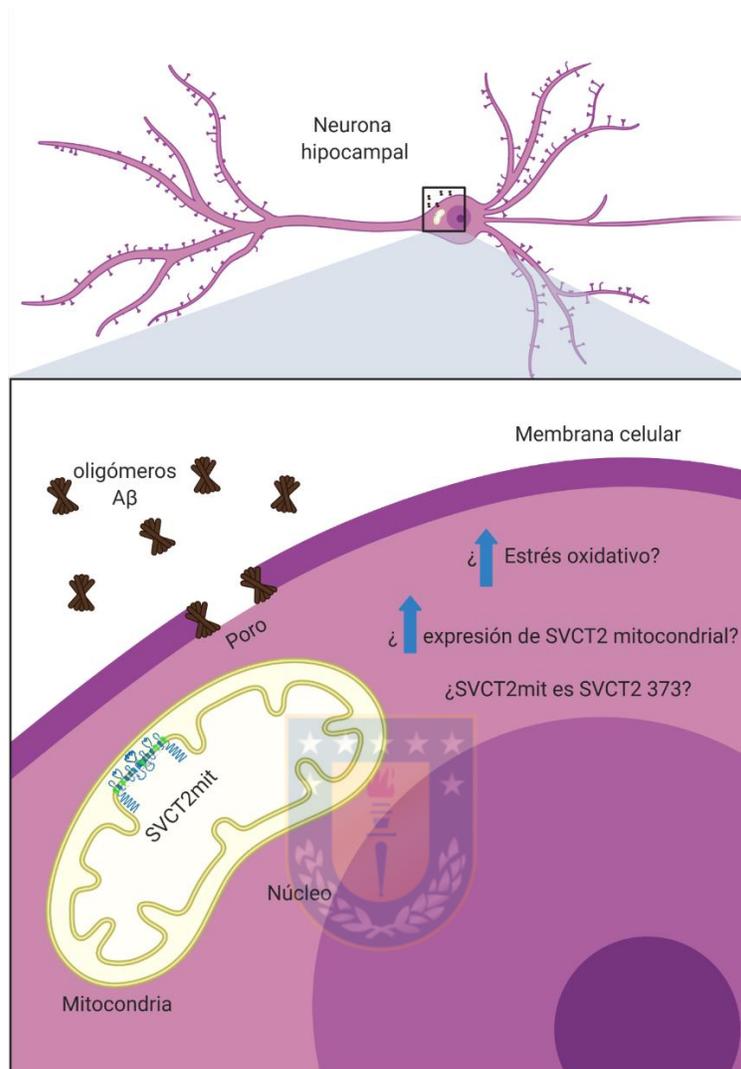


Figura 25. Modelo propuesto de la expresión de SVCT2 mitocondrial en neuronas hipocámpicas.

En neuronas hipocámpicas la proteína mitocondrial SVCT2 se localiza la membrana interna y las interrogantes abiertas aún son si su expresión aumenta frente a condiciones de estrés oxidativo como el cultivo con oligómeros del péptido A β y si el transportador SVCT2 presente en mitocondria frente al aumento de estrés oxidativo es SVCT2-373.

8. BIBLIOGRAFÍA

Al-Adnani, M. S., Patrick, R. S., & McGee, J. O. (1974). The subcellular distribution of polyhydroxylase determined immunohistochemically. *J Cell Sci*, 16, 639-540.

Alonso, A. D., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature medicine*, 2(7), 783-787.

Alonso, A. D., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5562-5566.

Alzheimer's Disease International. (2020). Obtenido de <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/#:~:text=There%20are%20over%2050%20million,and%20152%20million%20in%202050.>

Andersen, M., Regueira, T., & Leighton, F. (2006). Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Revista médica de Chile*, 134(5), 649-656.

Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2017). Alpha-synuclein and beta-amyloid – different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 483, Issue 4.

Arias, J., & Martínez, M. L. (2020). Práctica regular de ejercicio físico como freno para la progresión de la enfermedad de Alzheimer. *Gerokomos*, 31(1), 26-31.

Ashton, T., Young, I. S., Peters, J. R., Jones, E., Jackson, S. K., Davies, B., & Rowlands, C. C. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *Journal of Applied Physiology*, 87(6), 2032-2036.

Ball, M. J. (1977). Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. *Acta neuropathologica*, 37(2), 111-118.

Banhegyi, G., Marcolongo, P., Puskas, F., Fulceri, R., Mandl, J., & Benedetti, A. (1998). Dehydroascorbate and ascorbate transport in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 273, 2758-2762.

Beck, E., Burkert, A., & Hofmann, M. (1983). Uptake of l-Ascorbate by Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiology*, 73, 41-45.

Bigard, A. X. (2001). Lésions musculaires induites par l'exercice et surentraînement.

Science & Sports, 16(4), 204-215.

Bird, T. A., Schwartz, N. B., & Peterkofsky, B. (1986). Mechanism for the decreased biosynthesis of cartilage proteoglycan in the scorbutic guinea pig. *BioChem*, 261, 11166-11172.

Bird, T. A., Spanheimer, R. G., & Peterkofsky, B. (1986). Coordinate regulation of collagen and proteoglycan synthesis in costal cartilage of scorbutic and acutely fasted, vitamin C-supplemented guinea pigs. *Arch Biochem Biophys*, 246, 42-51.

Bodannes, R. S., & Chan, P. C. (1979). Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS letters*, 105(2), 195-196.

Bowman, G. L. (2012). Ascorbic acid, cognitive function, and Alzheimer's disease: A current review and future direction. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Journals*, Volume 38, Issue 2.

Brunkan, A. L., & Goate, A. M. (2005). Presenilin function and γ -secretase activity. *Journal of neurochemistry*, 93(4), 769-792.

Burczynski, M. E., Sridhar, G. R., Palackal, N. T., & Penning, T. M. (2001). The reactive oxygen species- and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the α , β -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1, 4-dihydroxy-2-nonenal. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2890-2897.

Burns, J. J., Peyser, P., & Moltz, A. (1956). Missing step in guinea pigs required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Science (Washington)*, 124, 1148-1149.

Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573.

Butterfield, D. A., Hensley, K., Harris, M., Mattson, M., & Carney, J. (1994). β -amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 200(2), 710-715.

Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology Medicine*, 222-230.

Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Montecinos, H., & Nualart, F. (2009). The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *Journal of neurochemistry*, 108(3), 563-577.

Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millán, C., Reinicke, K., Vera, J. C., & Nualart, F.

(2001). High-affinity sodium–vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *Journal of neurochemistry*, 78(4), 815-823.

Cavanaugh, S. E., Pippin, J. J., & Barnard, N. D. (2014). Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 31(3), 279-302.

Chang, Y. N., & Geertsma, E. R. (2017). The novel class of seven transmembrane segment inverted repeat carriers. *Biological Chemistry*, 398(2), 165-174.

Chao, J. C., Yuan, M. D., Chen, P. Y., & Chien, S. W. (2002). Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(11), 653-663.

Chatterjee, I. B., Ghosh, N. C., Ghosh, J. J., & Guha, B. C. (1958). Site of the enzyme system involved in the biosynthesis of ascorbic acid. *Science & Culture*, 23, 382.

Cheng, F., Cappai, F., Ciccotosto, G. D., Svensson, G., Fransson, L. A., & Mani, K. (2011). Suppression of Amyloid β A11 Antibody Immunoreactivity by Vitamin C possible role of heparan sulfate oligosaccharides derived from glypican-1 by ascorbate-induced, nitric oxide (no)-catalyzed degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27559-27572.

Colton, C. A., & Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS letters*, 223(2), 284-288.

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. *J Biol hem*, 288: 9092-101.

Cras, P., Kawai, M., Siedlak, S., Mulvihill, P., Gambetti, P., Lowery, D., & Perry, G. (1990). Neuronal and microglial involvement in beta-amyloid protein deposition in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 137(2), 241.

Daniels, A. J., Dean, G., Viveros, O. H., & Diliberto, E. J. (1982). Secretion of newly taken-up ascorbic acid by adrenomedullary chromaffin cells. *Science*, 216, 737-739.

Daruwala, R., Song, J., Kh, Koh, W. S., Rumsey, S. C., & Levine, M. (1999). Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 y hSVCT2. *FEBS Letters*, 460:480-4.

Dixit, S., Bernardo, A., Walker, J. M., Kennard, J. A., Kim, G. Y., Kessler, E. S., & Harrison, F. E. (2015). Vitamin C deficiency in the brain impairs cognition, increases amyloid accumulation and deposition, and oxidative stress in APP/PSEN1 and normally aging mice. *ACS chemical neuroscience*, 6(4), 570-581.

Du, H., Guo, L., Zhang, W., Rydzewska, M., & Yan, S. (2011). Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiology of aging*, 32(3), 398-406.

Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(2), 443-457.

Du, Y. S., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., & Migheli, A. (1996). RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 382(6593), 685-691.

Durham, H. D., Roy, J., Dong, L., & Figlewicz, D. A. (1997). Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(5), 523-530.

Eipper, B. A., & Mains, R. E. (1991). The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. *The American journal of clinical nutrition*, 54(6), 1153S-1156S.

Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Ruitengerg, A., van Swieten, J. C., Hofman, A., Witteman, J. C., & Breteler, M. M. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Association*, 287(24), 3223-3229.

Epperly, M. W., Osipor, A. N., Martin, I., & Kawai, K. K. (2004). Ascorbate as a "redox sensor" and protector against irradiation-induced oxidative stress. *International Journal Radiation Oncol*, 58(3): 851-61.

Esteves, A. R., Arduino, D. M., Silva, D. F., Martins-Branco, D., Oliveira, C. R., & Cardoso, S. (2010). Mitochondrial Metabolism in Agerelated Neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Parkinson's Revisited. *Mitochondria: structure, functions, and dysfunctions*, 187-244.

Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 647S-652S.

Findeis, M. A. (2007). The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & therapeutics*, 116(2), 266-286.

Fiorani, M., Azzolini, C., Cerioni, L., Guidarelli, A., & Cantoni, O. (2013). Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. *IUBMB life*, 65(2), 149-153.

Fischer, P., Zehetmayer, S., Jungwirth, S., Weissgram, S., Krampla, W., & Hinterberger, M. (2008). Risk factors for Alzheimer dementia in a community-based birth cohort at the age of 75 years. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 25:501-7.

Frei, B. (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *The American journal of clinical nutrition*, 54(6), 1113S-1118S.

Frei, B., Stocker, R., & Ames, B. N. (1988). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9748-9752.

Friedman, S., & Kaufman, S. (1965). Physical properties, copper content, and role of copper in the catalytic activity. *J Biol Chem*, 240, 4763-4773.

Fukumoto, H., Tennis, M., Locascio, J. J., Hyman, B. T., Growdon, J. H., & Irizarry, M. C. (2003). Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid β -protein levels. *Archives of neurology*, 60(7), 958-964.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., & Mullan, M. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349: 704-6.

Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuñiga, F. A., Sotomayor, P., Barra, V., . . . Vera, J. C. (2007). Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. *J Biol Chem*, 282:615-24.

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3: 519-526.

Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., & Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4051-4055.

Gong, C. X., & Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*, 15:2321-8.

Good, P. F., Perl, D. P., Bierer, L. M., & Schemidler, J. (1992). Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 31(3), 286.

Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W., & Perl, D. P. (1996). Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 149(1), 21.

Grundke-Iqbal, K., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in

Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13), 4913-4917.

Halliwell, B., & Gutteridge, M. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*.

Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 719-730.

Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 719-730.

Harrison, F. E., Yu, S. S., Van Den Bossche, K. L., Ki, L., May, J. M., & McDonald, M. P. (2008). Elevated oxidative stress and sensorimotor deficits but normal cognition in mice that cannot synthesize ascorbic acid. *Journal of Neurochemistry*, 106(3), 1198-1208.

Ul Hassan, M., & Lehninger, A. L. (1956). Enzymatic formation of ascorbic acid in rat liver extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 223, 123-138.

Hemila, H., Roberts, P., & Wikstrom, M. (1984). Activated polymorphonuclear leucocytes consume vitamin C. *FEBS letters*, 178(1), 25-30.

Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., ... & Butterfield, D. A. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3270-3274.

Hillen, H. (2019). The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1154.

Holman, G. D. (2018). Chemical biology probes of mammalian GLUT structure and function. *Biochemical Journal*, 475: 3511-3534.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., ... & Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274(5284), 99-103.

Huh, W. K., Kim, S. T., Yang, K. S., Seok, Y. J., Hah, Y. C., & Kang, S. O. (1994). Characterisation of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231. *Eur J Biochem*, 225, 1073-1079.

Huh, W. K., Lee, B. K., Kim, Y. R., Rhie, G. E., Baek, Y. W., Hwang, C., . . . Kang, S. O. (1998). D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 30, 895-903.

Hung, C. W., Chen, Y. C., Hsieh, W. L., Chiou, S. H., & Kao, C. L. (2010). Ageing and

neurodegenerative diseases. Ageing research reviews, 9, S36-S46.

Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., & Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. . Journal of Biochemistry, 99(6), 1807-1810.

Jackson, T. S., Xu, A., Vita, J. A., & Keane, J. F. (1998). Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. Circulation research, 83(9), 916-922.

Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., & Selkoe, D. J. (2011). Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A, 108:5819–24.

Joost, H. G., & Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. Molecular Membrane Biology, 18: 247-256.

Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., . . . Moley, K. H. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. Am J Physiol Endocrinol Metab, 282, E974-976.

Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., . . . Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 282: E974-E976.

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., & Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature, 325(6106), 733-736.

Khoury, E., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C., & Loike, J. D. (1996). Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils. Nature, 382(6593), 716-719.

Kim, G. H., Rhie, S. J., Kim, J. E., & Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. Experimental neurobiology, 24(4), 325-340.

Kook, S. Y., Lee, K. M., Kim, Y., Cha, M. Y., Kang, S., Baik, S. H., & Mook-Jung, I. (2014). High-dose of vitamin C supplementation reduces amyloid plaque burden and ameliorates pathological changes in the brain of 5XFAD mice. Cell death & disease, 5(2), e1083-e1083.

Kovachich, G. B., & Mishra, O. P. (1983). The effect of ascorbic acid on malonaldehyde formation, K⁺, Na⁺ and water content of brain slices. Exp. Brain Res., 50:62-68.

Krinsky, N. I. (1988). Membrane antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 551, 17.

LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8: 499–500.

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. *Hum Mol Genet*, 19: 3721-33.

Lemasters, J. J. (2007). Lemasters, J. J. (2007). Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22, S31-S37.

Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M. L., . . . Castelli, P. (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Annual New York Academy Science*, 959, 199-213.

Levine, M. (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New England Journal of Medicine*, 314(14), 892-902.

Levy-Lagad, E., Wasco, W., & Poorkai, P. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269: 973-7.

Li, B., Chohan, M. O., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta neuropathologica*, 113(5), 501-511.

Li, X., Cobb, C. E., Hill, K. E., Burk, R. F., & May, J. M. (2001). Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem, Biophys*.

Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.

Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2019). The pharmacokinetics of vitamin C. *Nutrients*, 11(10), 2412.

Lu, F. R., Li, S., Jiang, J., Fan, H., Lu, G. F., Deng, D., & Dang, S. Y. (2011). Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, 472: 243-246.

Luo, P., Yu, X. A., Wang, W. G., Fan, S. L., & Li, X. C. (2015). Crystal structure of a phosphorylation-coupled vitamin C transporter. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22:238-241.

Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., & Vassar, R. (2001).

Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nature neuroscience*, 4(3), 231-232.

Mahlke, K., Pfanner, N., Martin, J., Horwich, A. L., HARTL, F. U., & Neupert, W. (1990). Sorting pathways of mitochondrial inner membrane proteins. *European journal of biochemistry*, 192(2), 551-555.

Mahut, H., Zola-Morgan, S. T., & Moss, M. (1982). Hippocampal resections impair associative learning and recognition memory in the monkey. *Journal of Neuroscience*, 2(9), 1214-1220.

Mandi, J., Szarka, A., & Banhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1097-1110.

Mann, D. M., & Esiri, M. M. (1989). The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *Journal of the neurological sciences*, 89(2), 169-179.

Mao, A., Zhou, X., Liu, Y., Ding, J., Miao, A., & Pan, G. (2019). KLF8 is associated with poor prognosis and regulates glycolysis by targeting GLUT4 in gastric cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(8), 5087-5097.

Mardones, L., Ormazabal, V., Romo, X., Jaña, C., Binder, P., Peña, E., & 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, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K., & Mattson, M. P. (1997). Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *Journal of Neuroscience*, 17(3), 1046-1054.

Masters, C. L., Bateman, R., Blannow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature reviews*, 15056-15056.

Masters, C. L., Multhaup, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., & Beyreuther, K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *The EMBO Journal*, 4(11), 2757-2763.

May, J. M. (2012). May, J. M. (2012). Vitamin C transport and its role in the central nervous system. Dordrecht: Springer.

May, J. M., Li, L., Hayslett, K., & Qu, Z. C. (2006). Ascorbate transport and recycling by SH-SY5Y neuroblastoma cells: response to glutamate toxicity. *Neurochemical research*, 31(6), 785-794.

May, J. M., Mendiratta, S., Hill, K. E., & Burk, R. F. (1997). Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22607-22610.

Mayes, P. A. (1997). Estructura y función de vitaminas liposolubles. *Bioquímica de Harper*. Murray RK, Mayes PA. México DF: Granner DK eds. El Manual Moderno, SA, 728-31.

McCay, P. B. (1985). Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annual review of nutrition*, 5(1), 323-340.

Mefford, I. N., Oke, A. F., & Adams, R. N. (1981). Regional distribution of ascorbate in human brain. *Brain research*, 212(1), 223-226.

Michels, A. J., & Frei, B. (2013). Myths, artifacts, and fatal flaws: identifying limitations and opportunities in vitamin C research. *Nutrients*, 5(12), 5161-5192.

Mills, J., & Reiner, P. B. (1999). Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *Journal of neurochemistry*, 72(2), 443-460.

Montine, T. J., Amarnath, V., Martin, M. E., Strittmatter, W. J., & Graham, D. G. (1996). E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. *The American journal of pathology*, 148(1), 89.

Morris, M. C., Beckett, L. A., Hebert, L., Bennett, D. A., Field, T. S., & Evans, D. A. (1998). Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 12(3), 121-126.

Mucke, L. (2009). Alzheimer's disease. *Nature*, 461(7266), 895-897.

Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*, 34: 121-38.

Mun, G. H., Kim, M. J., Lee, J. H., Kim, H. J., Chung, Y. H., & Lee, W. J. (2006). Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *Journal of neuroscience research*, 83(5), 919-928.

Muñoz-Montesino, C., Roa, F. J., Peña, E., González, M., Sotomayor, K., Inostroza, E., & Reyes, A. M. (2014). Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radical Biology and Medicine*, 70, 241-254.

Musiek, E. S., & Schindler, S. E. (2013). Alzheimer Diseases: Current Concepts & Future Directions. *Missouri Medicine*, 110(5): 395-400.

Neff, E. P. (2019). Animal models of Alzheimer's disease embrace diversity. *Lab animal*, 48(9), 255-259.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. *Lehninger principles of biochemistry*, 4, 521-559.

Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1322S-1326S.

Nishikimi, M. (1975). Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochemical and biophysical research communications*, 63(2), 463-468.

Nunomura, A., Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G., & Smith, M. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology & experimental neurology*, 65(7), 631-641.

Oba, K., Nishikawa, M., Mizuno, H., & Yamamoto, T. (1995). Purification and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *The Journal of Biochemistry*, 117(1), 120-124.

Oliveira, L. T., Leon, G. V., Provance Jr, D. W., de Mello, F. G., Sorenson, M. M., & Salerno, V. P. (2015). Exogenous β -amyloid peptide interferes with GLUT4 localization in neurons. *brain research*, 1615, 42-50.

OMS | Demencia. (2017). World Health Organization. Obtenido de www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia.

Oteiza, P. I. (1997). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308(2), 374-379.

Packer, J. E., Slater, T., & Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278(5706), 737-738.

Palmer, F. M., Nieman, D. C., Henson, D. A., McAnulty, S. R., Swick, N. S., & Morrow, J. D. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *European journal of applied physiology*, 89(1), 100-107.

Peña, E., Roa, F. J., Inostroza, E., Sotomayor, K., González, M., Gutierrez-Castro, F. A., & Aylwin, C. F. (2019). Increased expression of mitochondrial sodium-coupled ascorbic acid transporter-2 (mitSVCT2) as a central feature in breast cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 135, 283-292.

A., & Perry, G. (1995). Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament

protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 64(6), 2660-2666.

Puskás, F., Braun, L., Csala, M., Kardon, T., Marcolongo, P., Benedetti, A., & Bánhegyj, G. (1998). Gulonolactone oxidase activity-dependent intravesicular glutathione oxidation in rat liver microsomes. *FEBS letters*, 430(3), 293-296.

Qiu, S., Li, L., Weeber, E. J., & May, J. M. (2007). Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *Journal of neuroscience research*, 85(5), 1046-1056.

Regulation of vitamin C transport. (2005). *Annu. Rev. Nutr*, 25, 105-125.

Ren, X. Y., Santhosh, S. M., Coppo, L., Ogata, F. T., Lu, J., & Holmgren, A. (2019). The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 134:350-358.

Retsky, K. L., Freeman, M. W., & Frei, B. (1993). Ascorbic acid oxidation product (s) protect human low-density lipoprotein against atherogenic modification. Anti-rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 1304-1309.

Rice, M. E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends in neurosciences*, 23(5), 209-216.

Rivas, C. I., Zuniga, F. A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., & Vera, J. C. (2008). Vitamin C transporters. *Journal of physiology and biochemistry*, 64(4), 357-375.

Rivas, C. I., Zuñiga, F. A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., & Vera, J. C. (2008). Vitamin C transporters. *Journal of physiology and biochemistry*, 64(4), 357-375.

Roa, F. J., Peña, E., Gatica, M., Escobar-Acuña, K., Saavedra, P., Maldonado, M., & Muñoz-Montesino, C. (2020). Therapeutic Use of Vitamin C in Cancer: Physiological Considerations. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 211.

Roa, F. J., Peña, E., Inostroza, E., Sotomayor, K., González, M., Gutiérrez-Castro, F. A., & Rivas, C. I. (2019). Data on SVCT2 transporter expression and localization in cancer cell lines and tissues. *Data in brief*, 25, 103972.

Roberds, S., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., & McConLogue, L. (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Human molecular genetics*, 10(12), 1317-1324.

Rogaev, E. I., Shemngton, R., & Rogaeva, E. A. (1995). Familial Alzheimer's disease in

kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376: 775-8.

Rogers, J. O. S. E. P. H., & Morrison, J. H. (1985). Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 5(10), 2801-2808.

Rumsey, S. C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M. J., Simpson, I. A., & Levine, M. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 275: 28246-53.

Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I., & Levine, M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem*, 272: 18982-9.

Sagun, K. C., Cárcamo, J. M., & Golde, D. W. (2005). Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (GLUT1). *Faseb J*, 19, 1657-1667.

Salazar, K., Cerda, G., Martínez, F., Sarmiento, J. M., González, C., Rodríguez, F., & Nualart, F. (2014). Salazar, K., Cerda, G., Martínez, F., Sarmiento, J. M., González, C., Rodríguez, F., ... & Nualart, F. (2014). SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *Journal of neurochemistry*, 130(5), 693-706.

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., & Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309(5733), 476-481.

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.

Scheffler, I. E. (2007). *Structure and morphology. Integration into the cell. Mitochondria*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.

Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., & Wanker, E. E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90(3), 549-558.

Schoffner, J. M. (1997). Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease. *Neurogenetics*, 1(1), 13-19.

Schoonenboom, N. S., Pijnenburg, Y. A., Mulder, C., Rosso, S. M., van Elk, E. J., & van Kamp, G. J. (2004). Amyloid beta (1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology*, 62:1580-4.

Schor, N. F. (2011). What the halted phase III γ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Annals of neurology*, 69(2), 237-239.

Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594), 789-791.

Seregi, A., Schaefer, A., & Komlós, M. (1978). Protective role of brain ascorbic acid content against lipid peroxidation. *Experientia*, 34(8), 1056-1057.

Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., & Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, 89(4), 629-639.

Sherrington, R., Rogaev, E. I., & Liang, Y. (1995). Cloning of a gene bearing mis-sense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375: 75460.

Smirnoff, N. (2001). L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitamins & Hormones*, 61, 241-266.

Smith, M. A., Rudnicka-Nawrot, M., Richey, P. L., Praprotnik, D., Mulvihill, P., Miller, C.

Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S. D., Stern, D., & Perry, G. (1994). Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5710-5714.

Sobow, T., Fliski, M., & Liberski, P. P. (2004). Amyloid-beta and tau proteins as biochemical markers of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 64:53-70.

Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., & Nussbaum, R. L. (2002). Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nature medicine*, 8(5), 514-517.

Stocker, R. (1991). Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. *Oxidative stress*, 213-243.

Szarka, A., Horemans, N., Banhegyj, G., & Asard, H. (2004). Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428(1), 73-80.

Terry, R. D., & Katzman, R. K. (1983). Senile dementia of the Alzheimer type. *Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, Annals of Neurology: Official, AI* 14(5), 497-506.

Tong, H., Zhang, X., Meng, X., Xu, P., Zou, X., & Qu, S. (2017). Amyloid-beta peptide decreases expression and function of glutamate transporters in nervous system cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 85, 75-84.

Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., & Hediger,

M. A. (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399(6731), 70-75.

Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., . . . Hediger, M. A. (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399:70-5.

van Duijn, C. M., de Kniff, P., & Cruts, M. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 7: 748.

Vangindertael, J., Camacho, R., Sempels, W., Mizuno, H., Dedecker, P., & Janssen, K. P. F. (2018). An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist. *Methods and applications in fluorescence*, 6(2), 022003.

van Ham, T. J., Breitling, R., Swertz, M. A., & Nollen, E. A. (2009). Neurodegenerative diseases: lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO molecular medicine*, 1(8-9), 360-370.

Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischberg, J., & Golde, D. W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*, 364(6432), 79-82.

Vera, J. C., Rivas, C. I., Velasquez, F. V., Zhang, R. H., Concha, I., & Golde, D. W. (1995). Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. *J Biol Chem*, 270: 23706-12.

Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L. D., Leibach, F. H., Ganapathy, V., & Prasad, P. D. (1999). Human Na⁺-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1461(1), 1-9.

Wang, J. Z., Gong, C. X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and-2B. *Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4854-4860.

Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240-1247.

Wang, Y., Mackenzie, B., Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C., & Hediger, M. A. (2000). Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochemical and biophysical research communications*, 267(2), 488-494.

Warner, T. A., Kang, J. Q., Kennard, J. A., & Harrison, F. E. (2015). Low brain ascorbic

acid increases susceptibility to seizures in mouse models of decreased brain ascorbic acid transport and Alzheimer's disease. *Epilepsy research*, 110, 20-25.

Weber, A., Servaites, J. C., Geiger, D. R., Kofler, H., Hille, D., Groner, F., Flugge, U. I. (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell*, 12, 787-802.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5), 1858-1862.

Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y. F., & Rocque, P. A. (1990). Mammalian Thioltransferase (Glutaredoxin) and Protein Disulfide Isomerase Have Dehydroascorbate Reductase-Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 15361-15364.

Yang, F., Uéda, K., Chen, P. P., Ashe, K. H., & Cole, G. M. (2000). Plaque-associated α -synuclein (NACP) pathology in aged transgenic mice expressing amyloid precursor protein. *Brain research*, 853(2), 381-383.

Yang, H. (2013). Conserved or lost: Molecular evolution of the key gene GULO in vertebrate vitamin C biosynthesis. *Biochemical genetics*, 51(5-6), 413-425.

Yu, X. Z., Yang, G. H., Yan, C. Y., Baylon, J. L., Jiang, J., Fan, H., & Lu, G. F. (2017). Dimeric structure of the uracil: proton symporter UraA provides mechanistic insights into the SLC4/23/26 transporters. *Cell Research*, 27: 1020-1033.

Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., & Tsien, R. Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(12), 906-918.

Zhao, F. Q., & Keating, A. F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current Genomics*, 8:113-128.

Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., & Wang, X. (2013). Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 33(s1), S253-S262.

Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G., & Aliev, G. (2004). Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 19(6), 345-3552.

Zola-Morgan, S., & Squire, L. R. (1986). Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behavioral neuroscience*, 100(2), 155.

Zorzano, A., Palacin, M., & Guma, A. (2005). Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 183, 43-58.

