



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR
DE MÉDULA ESPINAL Y CEREBRO DE COBAYOS
DEFICIENTES EN VITAMINA C COMO POSIBLE
MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS LATERAL
AMIOTRÓFICA**

POR VALENTINA ANDREA MUÑOZ MONJE

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía

Dra. Nery Alejandra Jara Mendoza
Departamento de Farmacología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Patrocinante

Dr. Francisco Javier Nualart Santander
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Francisco Javier Nualart Santander
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Abril, 2024

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Esclerosis lateral amiotrófica	1
1.2 Características patológicas del ELA	5
1.3 Etiología del ELA	13
1.4 Factores de riesgo de ELA	15
1.5 Vitamina C	17
1.6 Esclerosis lateral amiotrófica experimental	23
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVO PRINCIPAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Animales de experimentación	29
5.2 Procesamiento histológico	30
5.2.1 Fijación en Bouin	30
5.2.2 Inclusión y corte en parafina	30
5.3 Tinciones	31
5.3.1 Hematoxilina – Cromotropo	31
5.3.2 Tinción de Nissl	32
5.4.1 Inmunohistoquímica	33

5.4.2 Inmunofluorescencia	35
5.5 Microscopia	36
5.6 Análisis estadístico	37
6. RESULTADOS.....	40
6.1 Morfología y degeneración neuronal	40
6.3 Análisis de estrés reticular.....	55
6.4 Análisis de la activación astrocitaria	66
6.5 Expresión de proteínas de muerte celular	76
6.6 Expresión de transportadores de vitamina C	79
7. DISCUSIÓN	90
7.1 Alteración en la vía motora corticobulbar y corticoespinal de cobayos con deficiencia de vitamina C.....	90
7.2 Alteraciones celulares en deficiencia de vitamina C	95
7.2.1 Procesos neuronales.....	95
7.2.2 Astrocitosis reactiva	99
7.3 Alteraciones subcelulares en deficiencia de vitamina C.....	101
7.3.1 RE	101
7.3.2 Transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1	105
8. CONCLUSIONES	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5-1. Anticuerpos primarios ensayos inmunolocalización.....38

Tabla 5-2. Anticuerpos secundarios ensayos inmunolocalización.....39

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1. Degeneración y disfunción de las neuronas motoras superiores e inferiores en la enfermedad de ELA.....	4
Figura 1-2. Zonas afectadas por la degeneración neuronal que se produce en la enfermedad de ELA.	6
Figura 1-3. AA en el SNC.	21
Figura 6-1. Tinción histológica Hematoxilina-Cromotopo en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.	42
Figura 6-2. Tinción histológica Hematoxilina-Cromotopo en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	43
Figura 6-3. Tinción histológica de Nissl en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.	45
Figura 6-4. Tinción histológica de Nissl en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	46
Figura 6-5. Análisis inmunohistoquímico con Tubulina β III en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.....	48
Figura 6-6. Análisis inmunohistoquímico con Tubulina β III en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	50
Figura 6-7. Análisis y reconstrucción 3D de inmunofluorescencia con Tubulina β III en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C.....	54
Figura 6-8. Análisis inmunohistoquímico con KDEL en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.....	58
Figura 6-9. Análisis inmunohistoquímico con KDEL en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	60
Figura 6-10. Análisis de inmunofluorescencia con KDEL en corteza cerebral y médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	63

Figura 6-11. Análisis de inmunofluorescencia con PDI y Calnexina en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	65
Figura 6-12. Análisis inmunohistoquímico con GFAP en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.....	67
Figura 6-13. Análisis inmunohistoquímico con GFAP en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	68
Figura 6-14. Análisis de inmunofluorescencia con GFAP en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C.....	70
Figura 6-15. Análisis de inmunofluorescencia con GFAP en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	72
Figura 6-16. Análisis de inmunofluorescencia con GFAP y Vimentina en tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.....	75
Figura 6-17. Análisis de inmunofluorescencia con Caspasa3 clivada y MLKL en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	77
Figura 6-18. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 y SV2 en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C.....	81
Figura 6-19. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 y SV2 en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	83
Figura 6-20. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 en tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C.	85
Figura 6-21. Análisis de inmunofluorescencia con GLUT1 en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	87
Figura 6-22. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 y Vimentina en corteza cerebral y médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.....	89
Figura 7-1. Alteraciones en las vías corticoespinales y corticobulbares en cobayos con deficiencia de vitamina C.....	94

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por la degeneración y disfunción de las neuronas superiores e inferiores, lo que lleva a la debilidad progresiva de músculos esqueléticos voluntarios. Estudios han evaluado el efecto de la dieta en la progresión y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En particular, la vitamina C se encuentra involucrada en varios procesos fisiológicos del SNC. EL rol de la vitamina C como un importante antioxidante a nivel cerebral nos sugiere que su deficiencia podría estar involucrada en el desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas como el ELA. Esta tesis postulaba que el cobayo con deficiencia de vitamina C reproducía características morfológicas y moleculares que se observan en ELA. A través de técnicas histológicas, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se determinó que la deficiencia de vitamina C no induce degeneración neuronal ni activación de vías de muerte celular. Sin embargo, se observaron alteraciones en los procesos neuronales corticales, así como también alteraciones en el RE de las neuronas, activación de astrocitos en el tronco encefálico y la sustancia blanca de la médula espinal, y una disminución en la expresión del transportador SVCT2 en la vía corticoespinal. Este estudio se centra en la importancia de la Vitamina C, la cual es considerado el antioxidante más abundante del SNC, regulando una variedad de funciones y protegiendo a las distintas células neuronales.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects the central nervous system (CNS). It is characterized by the degeneration and dysfunction of both upper and lower motor neurons, leading to progressive weakness of voluntary skeletal muscles. Studies have evaluated the effect of diet on the progression and development of neurodegenerative diseases. Specifically, vitamin C is involved in various physiological processes of the CNS. The role of vitamin C as an important antioxidant in the brain suggests that its deficiency could be involved in the development and progression of neurodegenerative diseases such as ALS. This thesis postulated that guinea pigs with vitamin C deficiency would reproduce morphological and molecular characteristics observed in ALS. Through histological techniques, immunohistochemistry, and immunofluorescence, it was determined that vitamin C deficiency does not induce neuronal degeneration or activation of cell death pathways. However, alterations were observed in cortical neuronal processes, as well as alterations in the endoplasmic reticulum (ER) of neurons, activation of astrocytes in the brainstem and spinal cord white matter, and a decrease in the expression of the SVCT2 transporter in the corticospinal pathway. This study emphasizes the importance of vitamin C, which is considered the most abundant antioxidant in the CNS, regulating a variety of functions and protecting different neuronal cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible que afecta al sistema nervioso central (SNC). Fue descrita por primera vez en 1869 por el médico francés Jean-Martin Charcot como una enfermedad de la neurona motora (Masrori y Van Damme, 2020). Esta primera descripción relacionaba el ELA principalmente con la disfunción motora que presentaban los pacientes que la padecían; sin embargo, en la actualidad, diversos estudios han demostrado que los pacientes que padecen esta enfermedad presentan cambios cognitivos y conductuales significativos (Rusina *et al.*, 2021). Razón por la cual, hoy en día, es considerada una enfermedad neurodegenerativa (Feldman *et al.*, 2022). Se estima que, actualmente, el ELA correspondería al tercer trastorno neurodegenerativo más común, después de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Vahsen *et al.*, 2021), con una prevalencia de aproximadamente 1-2,6 casos por cada 100.000 personas al año (Talbot *et al.*, 2016).

El ELA se caracteriza por la degeneración y disfunción de las neuronas motoras, las cuales se agrupan en neuronas motoras superiores (NMS) y neuronas

motoras inferiores (NMI). Las NMS se encuentran en la corteza cerebral motora y se proyectan hacia la médula espinal, mientras que las NMI están ubicadas en el tronco encefálico y a médula espinal, proyectándose hacia el músculo diana (Hardiman *et al.*, 2017). La degeneración neuronal afecta tanto la vía corticoespinal como a la vía corticobulbar (Fig. 1-1). Por un lado, las neuronas motoras espinales (vía corticoespinal) controlan movimientos musculares voluntarios, y su disfunción en las neuronas superiores lleva a la rigidez y espasticidad muscular, mientras que en las neuronas inferiores provocan episodios de fasciculaciones y atrofia muscular debido a una pérdida de conectividad sináptica (Brown y Al-Chalabi, 2017). Por otro lado, las neuronas motoras bulbares participan en funciones como el sueño, la postura, el tono muscular y controlan funciones vitales involuntarias como la respiración y la presión arterial (Davis y Pirio, 2015).

La degeneración de las motoneuronas resulta en diversas manifestaciones clínicas, principalmente relacionada a la debilidad de los músculos esqueléticos voluntarios involucrados en la deglución, el habla, el movimiento de extremidades y la función respiratoria (Hardiman *et al.*, 2017). Dado que esta enfermedad se caracteriza por su heterogeneidad tanto en la anamnesis del paciente, los genes involucrados y su patogenia general, resulta una patología difícil de reconocer en sus inicios. Además, requiere que el médico tratante logre excluir todas las enfermedades cuyos síntomas imitan al ELA. Por lo general, el tiempo promedio

en que se inician los síntomas y se realiza un diagnóstico asertivo es de aproximadamente doce meses, lo cual retrasa la supervisión médica. La rápida progresión de esta enfermedad estima que, una vez iniciados los síntomas, la esperanza de vida del paciente es de dos a cinco años, donde finalmente fallece debido a una insuficiencia respiratoria neuromuscular (Vahsen *et al.*, 2021).

Se ha determinado que esta enfermedad puede presentarse como múltiples fenotipos clínicos de acuerdo al nivel y área de afección de la neurona motora, así como el patrón de aparición de la enfermedad (Grad *et al.*, 2017). El ELA bulbar (cervical) y el ELA espinal (lumbar) son los fenotipos más comunes y comprenden aproximadamente una cuarta parte de los casos (Feldman *et al.*, 2022).

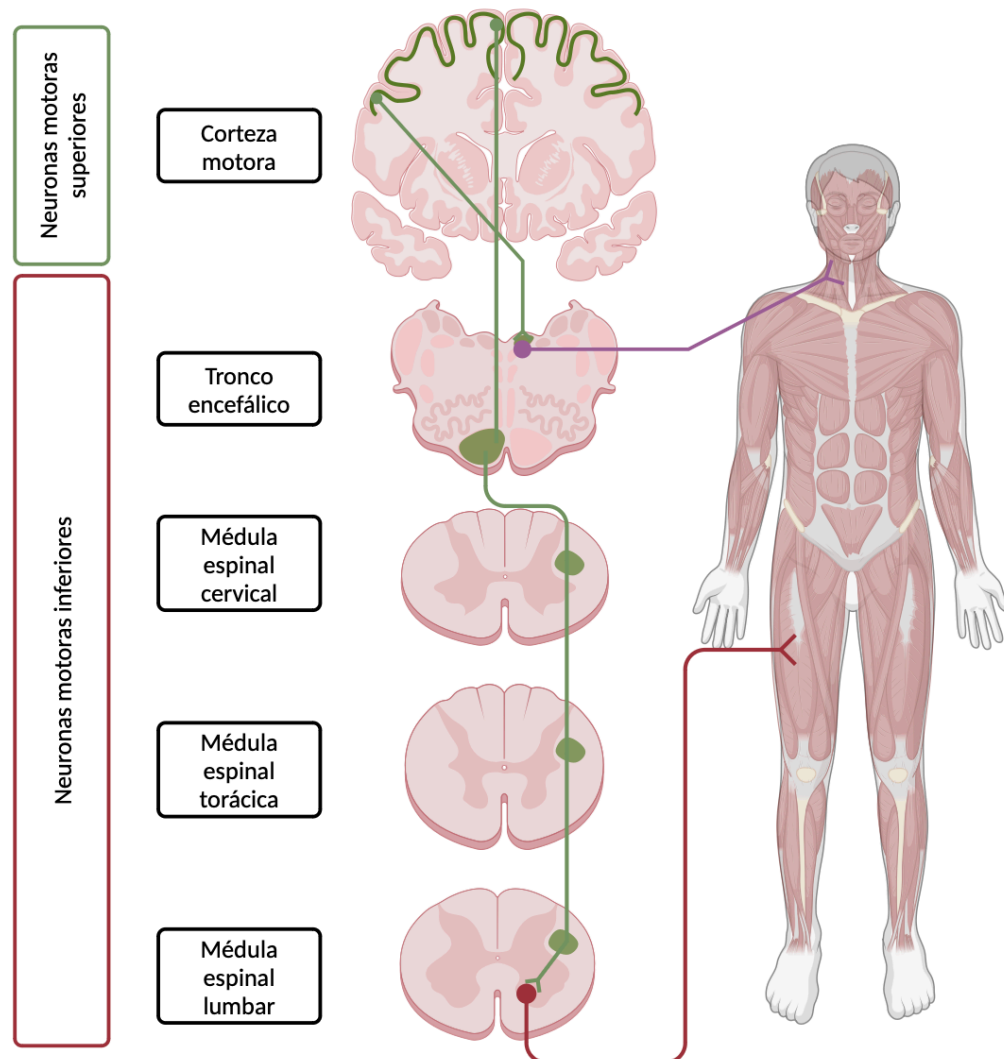


Figura 1-1. Degeneración y disfunción de las neuronas motoras superiores e inferiores en la enfermedad de ELA. En primer lugar, se observa el tracto corticoespinal que involucra a las NMS que nacen de las neuronas de Betz en la corteza cerebral motora (capa V) (vía verde). Esta vía interacciona con las NMI que se proyectan desde la médula espinal hasta el músculo a inervar. En segundo lugar, se observa la vía corticobulbar, donde las neuronas que nacen de la corteza cerebral motora (vía verde), inervan las neuronas motoras presentes en el tronco encefálico (vía morada). Ambos grupos neuronales se ven afectados en la enfermedad de ELA. Imagen modificada de (Brown y Al-Chalabi, 2017; Feldman *et al.*, 2022). Esquema creado en BioRender.com.

1.2 Características patológicas del ELA

La patogénesis del ELA se caracteriza por una pérdida en la conexión neuromuscular, la retracción axonal y la degeneración de NMS y NMI, particularmente las neuronas de Betz en la capa V de la corteza cerebral motora, y las motoneuronas alfa presentes en los núcleos motores (núcleos V y VII de la protuberancia, y los núcleos IX, X, XII del bulbo raquídeo) del tronco encefálico y las astas anteriores de la médula espinal (Fig. 1-2) (Reiner *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2015; Grand *et al.*, 2017; Masrori y Van Damme, 2020).

En esta enfermedad, la degeneración de los axones afecta las zonas laterales del tracto corticoespinal en los distintos segmentos de la médula espinal, lo cual produce adelgazamiento y cicatrización axonal (esclerosis). Esto lleva a la posterior muerte de las neuronas motoras espinales y del tronco encefálico, así como también el adelgazamiento de las raíces ventrales de la médula. Como consecuencia se produce la denervación (amiotrofia) en músculos de la lengua, la zona orofaríngea y extremidades, las cuales corresponden a las características patológicas más observadas en los pacientes (Brown y Al-Chalabi, 2017). Adicionalmente, este proceso degenerativo va acompañado de neuroinflamación y activación de células gliales (Grand *et al.*, 2017).

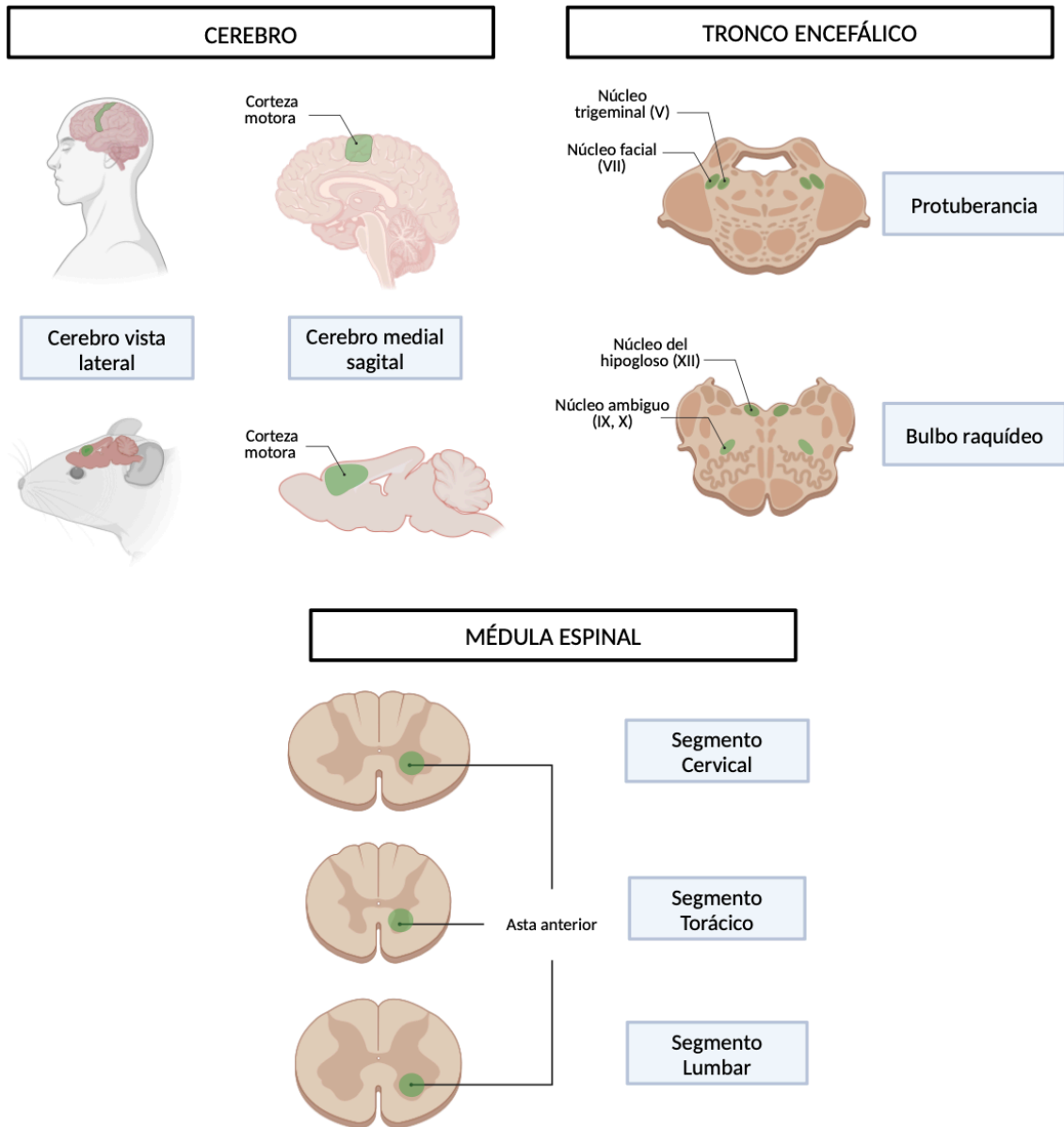


Figura 1-2. Zonas afectadas por la degeneración neuronal que se produce en la enfermedad de ELA. El ELA se caracteriza por la degeneración neuronal en la corteza cerebral motora, el tronco encefálico (principalmente núcleos V y VII de la protuberancia, y los núcleos IX, X, XII del bulbo raquídeo) y el asta anterior de los segmentos cervicales, torácicos y lumbares de la médula espinal (Reiner *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2015; Masrori y Van Damme, 2020). En esta figura, además, se realiza una comparación respecto a la ubicación de la corteza motora de cerebro humano y en roedor. Esquema creado en BioRender.com.

Las neuronas se caracterizan por tener una amplia variedad en su forma y tamaño. Bajo microscopía óptica, es posible observar en las neuronas motoras un cuerpo celular grande, el cual contiene un núcleo con un solo nucléolo prominente y gránulos citoplasmáticos, también llamados sustancias de Nissl. Considerando que la descripción anterior corresponde a una neurona sana, cuando hablamos de apariencia clásica de degeneración neuronal lo podemos asociar a un cuerpo celular de menor tamaño, con pérdida de sustancia de Nissl, citoplasma eosinófilo y un núcleo pequeño que puede o no estar fragmentado (Garman, 2011). Se ha evidenciado, en estudios de pacientes que padecen ELA, la presencia de inclusiones interneuronales como los cuerpos de Bunina, inclusiones ubiquitinadas y cuerpos de Lewy, además de atrofia en neuronas del asta anterior, desmielinización y cambios degenerativos que desplazan el retículo endoplasmático (RE) (Stoyanov *et al.*, 2021). También se han reportado anomalías mitocondriales y fragmentación del aparato de Golgi en pacientes con ELA y ratones transgénicos que poseen la SOD1 humana mutante, el cual corresponde a un modelo de estudio de ELA (Rowland y Shneider, 2001).

Dado que esta enfermedad se caracteriza por la muerte selectiva de las neuronas motoras, se han realizado estudios que evalúan la activación de diferentes vías de muerte celular programada. A través de análisis de inmunofluorescencia y Western blot, utilizando marcadores apoptóticos como caspasa-3 clivada, se ha evidenciado que se produce un aumento de esta proteína y, por lo tanto,

activación de la vía apoptótica en pacientes con ELA (Rossi *et al.*, 2008; Hee y Keun, 2013). Sin embargo, pruebas farmacológicas y genéticas para inhibir la apoptosis en modelos de estudio de ELA no han sido efectivos previniendo la muerte neuronal. Esto ha generado interés en los investigadores para evaluar otras vías de muerte celular, entre ellas la necroptosis. En el caso de la vía necroptótica, estudios han reportado un aumento de marcadores de necroptosis como MLKL, RIPK1 y RIPK3 en pacientes y modelos de estudio de ELA; sin embargo, algunos investigadores contradicen estos resultados, generando controversia en la implicación de la necroptosis en esta enfermedad (Morrice *et al.*, 2017; Chevin y Sébire, 2021). Si bien estas vías suelen ser las más estudiadas, otros investigadores se han enfocado en vías no tan comunes como la ferroptosis. Recientemente, se ha determinado que la ferroptosis media la muerte de las neuronas motoras en ELA, lo cual ha impulsado el uso de fármacos antiferropénicos en estos pacientes (Wang, 2022). Aunque se han realizado varios avances respecto a la caracterización de la muerte de las neuronas en ELA, aún no se ha logrado determinar el mecanismo exacto que produce esta muerte neuronal.

Se han asociado diferentes mecanismos que contribuyen a la patogenia del ELA relacionados a las células neuronales, entre los cuales podemos mencionar la agregación de proteínas, el estrés del RE, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad y la alteración en el metabolismo del ARN. En

particular, el estrés reticular se ha evidenciado en muestras provenientes de pacientes con ELA y modelos *in vitro* e *in vivo* (Zhao *et al.*, 2022). El RE es un orgánulo membranoso involucrado en la síntesis y plegamiento de proteínas. Los péptidos recién sintetizados se pliegan y ensamblan correctamente en la luz del RE con ayuda de proteínas chaperonas y enzimas de plegamiento, como la proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina (BiP/GRP78), la calnexina y la proteína disulfuro isomerasa (PDI), evitando así la agregación y degradación proteica. Una vez modificadas correctamente, las proteínas son derivadas a su ubicación celular específica donde podrán cumplir sus respectivas funciones (Sasaki, 2010; Jin *et al.*, 2017). Cuando este mecanismo falla, la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo activa el sistema de señalización de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La UPR, a través de las vías de señalización de estrés reticular IRE1, ATF6 y PERK, regulan negativamente la síntesis de nuevas proteínas, incrementan la síntesis de genes que codifican chaperonas y promueven la desintegración de las proteínas mal plegadas a través del sistema ubiquitina – proteosoma (Atkin *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2017). El estrés prolongado del RE puede contribuir en la muerte celular, lo cual se ha evidenciado en varias enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad priónica (Sasaki, 2010).

Además de las características histopatológicas neuronales, otra característica que se observa en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas es la

activación de las células gliales que se encuentran alrededor de las neuronas en degeneración. Las células gliales o glía se clasifican según su morfología, ubicación y función en microglía, astrocitos y oligodendrocitos o células de Schwann. La glía no participa directamente en las interacciones sinápticas, sin embargo, está involucrada en diversos procesos que las hacen indispensables para la función neuronal tales como la plasticidad sináptica, la regulación de la barrera hematoencefálica, el mantenimiento de la transmisión sináptica a través de la homeostasis iónica, la captación de neurotransmisores y la neuroinflamación (Stevenson *et al.*, 2020).

Los astrocitos corresponden a las células gliales más abundantes del SNC. Se consideran típicamente células de apoyo y soporte para las neuronas, aunque estudios indican que también desempeña una función fundamental en la transmisión sináptica a través de la liberación de gliotransmisores (Kang *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2015). De acuerdo a su morfología, localización y fenotipo antigénico se clasifican en astrocitos protoplásmicos y fibrosos. Por un lado, los astrocitos protoplasmáticos son astrocitos que se encuentran en la sustancia gris y sus procesos envuelven a las sinapsis y vasos sanguíneos, poseen un cuerpo esponjiforme y múltiples ramificaciones. Por otro lado, los astrocitos fibrosos son astrocitos que se encuentran en la sustancia blanca y están relacionados a los nodos de Ranvier y vasos sanguíneos, poseen menos ramificaciones y son más alargadas (Guillamon-Vivancos *et al.*, 2015). En su citoesqueleto, asociada a la

red de filamentos intermedios, se encuentra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) la cual corresponde al marcador clásico para inmunolocalización de astrocitos.

Cuando se produce una lesión o enfermedad en el SNC los astrocitos sufren cambios a nivel molecular, celular y funcional, lo que se denomina astrocitosis reactiva. Estos cambios dependen del grado y severidad de la lesión y son regulados por moléculas de señalización inter e intracelular (Guillamon-Vivancos *et al.*, 2015). Se han determinado tres grados de astrocitosis de acuerdo a la severidad de la lesión. En primer lugar, está la astrocitosis reactiva leve o moderada, caracterizada por un aumento de GFAP por parte de los astrocitos y una hipertrofia tanto en el cuerpo celular como en los procesos. En segundo lugar, está la astrocitosis reactiva severa difusa, en este caso se observa una sobreexpresión de la GFAP y una hipertrofia aún más evidente. Por último, el tercer grado corresponde a astrocitosis reactiva severa con formación de cicatriz glial compacta. En este caso se observan astrocitos muy hipertróficos y la formación de una cicatriz glial, la cual impide la regeneración axonal, la migración celular y limita la llegada de células inflamatorias y agentes infecciosos (Guillamon-Vivancos *et al.*, 2015).

En ELA, la astrocitosis es uno de los primeros cambios patológicos que se han observado en modelos de ratones transgénicos que expresan la SOD1 humana

mutante. En el ratón G93A-SOD1, se ha evidenciado un aumento significativo del marcador GFAP, lo que indica el desarrollo de una activación astrocitaria importante en comparación con los ratones control (Levine *et al.*, 1999). Además, utilizando el marcador GFAP, se ha observado que los astrocitos reactivos poseen una morfología inusual, donde se observan núcleos y cuerpos celulares hipertróficos, además de procesos de distinta longitud y grosor que expresan una mayor cantidad de GFAP (Barbeito *et al.*, 2004).

Si bien la activación astrocítica es una de las características más importantes del ELA, también se han evidenciado alteraciones tanto en la microglía como en los oligodendrocitos en esta enfermedad. Por un lado, la microglía corresponde a las principales células inmunes dentro del SNC y participan en la protección activa de las neuronas frente a infecciones, lesiones y procesos degenerativos. Algunos estudios indican que la microglía se ve activada en corteza cerebral motora y médula espinal de casos esporádicos de ELA; sin embargo, otros estudios indican que esto solo ocurre en un subconjunto de los casos de la enfermedad y posiblemente este dado por su naturaleza heterogénea de la enfermedad (Clarke y Patani, 2020). Por otro lado, los oligodendrocitos son células especializadas en la formación de mielina alrededor de los axones neuronales, lo cual es clave para asegurar la integridad axonal y una conducción nerviosa eficiente. Se han observado alteraciones patológicas en la sustancia blanca de pacientes y

modelos de ELA, sugiriendo que las células oligodendrocíticas también se ven afectadas durante el desarrollo de esta enfermedad (Raffaele *et al.*, 2021).

1.3 Etiología del ELA

Clásicamente, el ELA se clasifica como una enfermedad que puede tener un origen esporádico o familiar. Por un lado, el ELA esporádico ocurre en el 85% de los casos y se presenta en pacientes sin antecedentes familiares de ELA. Por otro lado, el ELA familiar constituye del 10 al 15% de los casos y se produce por herencia autosómica dominante de esta enfermedad o síndromes asociados, como, por ejemplo, la demencia frontotemporal (DFT) (Brown y Al-Chalabi, 2017).

Aproximadamente el 70% de los casos de ELA familiar se deben a mutaciones dentro de los genes que han sido relacionados a la enfermedad. La arquitectura genética del ELA es bastante compleja. Hoy en día, se han identificado más de 40 genes asociados a esta enfermedad, los cuales varían en frecuencia, modo de herencia y penetrancia (Feldman *et al.*, 2022). Dentro de las mutaciones más comunes asociadas al ELA encontramos la expansión de hexanucleótidos en el marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (C9orf72), la proteína de unión al ADN TAR 43 (TARDBP), la superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1) y la proteína fusionada en el sarcoma (FUS) (Masmori y Van Damme, 2020).

Literatura sugiere que una de las causas más frecuentes de ELA familiar son mutaciones en el gen de la SOD1. La SOD1 es una enzima homodimérica que contiene un sitio de unión de cobre (Cu) y otro de zinc (Zn), así como un enlace disulfuro intramolecular por subunidad (Sheng *et al.*, 2012). Es una proteína soluble que se puede encontrar en el citosol, núcleo, peroxisomas y mitocondrias, y se relaciona con la regulación del estrés oxidativo ya que cataliza la reacción que convierte el radical superóxido (O_2^-) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, el cual es menos reactivo (Valentine *et al.*, 2005). Tanto el superóxido como el peróxido de hidrogeno son parte de las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), el cual tiene un papel importante en procesos de regulación y respuesta al estrés (Barber y Shaw, 2010). Sin embargo, cuando hay un exceso de ROS puede ocurrir oxidación en ADN, lípidos y proteínas, lo que provoca alteración en los procesos celulares y daño reversible o irreversible en las células del organismo (Barber y Shaw, 2010).

Se ha determinado que mutaciones en la SOD1 produce degeneración en las neuronas motoras, sin embargo, se desconoce con certeza los mecanismos responsables de esto. Entre los mecanismos que se cree están relacionados con el daño a las motoneuronas está el estrés oxidativo, la excitotoxicidad mediada por glutamato, la sobreproducción de moléculas neurotóxicas por neuroinflamación, agregación proteica, alteración en la red de neurofilamentos y la disfunción mitocondrial (Komine y Yamanaka, 2015).

Esta proteína fue descrita como una de las causas de ELA familiar por primera vez en 1993 (Rosen *et al.*, 1993), y desde entonces se han realizado múltiples estudios en modelos animal transgénicos que expresan mutaciones en la SOD1 para evaluar los mecanismos patológicos de la enfermedad. Uno de los más estudiados corresponde al ratón transgénico G93A-SOD1 (Gurney *et al.*, 1994). En este modelo, que sobreexpresa la SOD1 humana mutante, se observa un inicio de la patología entre los 90 y 110 días, seguido de una rápida y significativa disminución de la función motora hasta aproximadamente los 130 a 150 días donde finalmente el ratón muere (Kreilaus *et al.*, 2020). Durante este proceso, se observa una marcada disminución de masa corporal, parálisis en las extremidades, neurodegeneración grave, activación de glía y agregados intracelulares, lo cual corresponde a un fenotipo similar al que se produce en ELA (Leichsenring *et al.*, 2006).

1.4 Factores de riesgo de ELA

Al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, se ha propuesto que el ELA se desarrolla por una combinación de factores genéticos, ambientales y disfunciones relacionadas con el envejecimiento (Masrori y Van Damme, 2020). En la actualidad, la mayoría de los casos de ELA reportados se han asociado a mutaciones genéticas, pero también se han determinado otros factores de riesgo relacionados a la edad y el sexo del paciente. En general, la mayoría de los casos

de ELA se producen en pacientes mayores de 40 años, y la probabilidad aumenta conforme a la edad, además hay un mayor porcentaje de casos de ELA reportados en hombres que en mujeres. Otro factor que se ha observado es un foco geográfico en Japón, donde se ha reportado una prevalencia entre 50 y 100 veces mayor de desarrollar ELA que en otras partes del mundo (Fang *et al.*, 2015).

Cabe destacar que, únicamente estos factores de riesgo han sido identificados como determinantes para el desarrollo del ELA. Aunque se han propuesto varios otros factores relacionados al estilo de vida y el entorno del paciente. Entre los cuales se encuentra el consumo de cigarrillos, que ha sido asociado a un aumento de casos de ELA especialmente en mujeres (Fang *et al.*, 2006). También se ha propuesto que atletas o personas que presentan un alto nivel de condición física y un IMC bajo el promedio tienden a tener un mayor riesgo de desarrollar ELA (Mattsson *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2015). En relación a la ocupación de los pacientes, se ha observado que trabajos donde el individuo se encuentra expuesto a químicos, metales y campos electromagnéticos pueden ser considerados como posibles factores de riesgo (Fang *et al.*, 2015). Además de estas características, otro factor importante que ha sido evaluado por múltiples estudios es el impacto de la dieta en los pacientes y su relación a el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el ELA. En particular, se ha

estudiado si existe alguna relación entre el desarrollo de esta enfermedad y el consumo regular de antioxidantes como la vitamina E y C.

1.5 Vitamina C

En el SNC, las neuronas se encuentran constantemente expuestas a ROS, el cual se genera como un subproducto de las reacciones metabólicas que tienen lugar en diferentes compartimentos subcelulares como la mitocondria, el RE y los peroxisomas (Kim *et al.*, 2015). En condiciones fisiológicas y a baja concentración, el ROS actúa como una molécula de señalización y está involucrado en la regulación de procesos asociados a la plasticidad sináptica y la supervivencia celular (Massaad y Klann, 2011; Kim *et al.*, 2015). Sin embargo, durante el envejecimiento y ciertas condiciones patológicas, se produce un incremento de ROS y una disminución de moléculas antioxidantes, lo que produce estrés oxidativo neuronal (Massaad y Klann, 2011). El estrés oxidativo se ha relacionado a la peroxidación de lípidos de la membrana celular, cambios en la estructura y función de proteínas y daño estructural en el ADN (Chen *et al.*, 2012; Gandhi y Abramov, 2012). El daño que produce el aumento de ROS y estrés oxidativo ha sido vinculado a una serie de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y el ELA (Barnham *et al.*, 2004). En este contexto, se han desarrollado estudios que evalúan el efecto de la dieta en la generación y progresión de estas enfermedades, incluyendo el

estudio de vitaminas y antioxidantes esenciales en nuestro día a día, como la vitamina C (Goncharova *et al.*, 2021).

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) es una vitamina hidrosoluble que posee propiedades ácidas y reductoras. En el cerebro, el AA media una variedad de reacciones enzimáticas como la síntesis de catecolaminas y aminoácidos, la formación de mielina, la actividad sináptica, la proliferación celular y la protección antioxidante, lo que la convierte en una vitamina esencial para el buen funcionamiento del SNC (Nualart *et al.*, 2014). En el organismo, la vitamina C puede existir en su forma reducida como AA, a pH fisiológico en su forma aniónica como ascorbato y en su forma oxidada como ácido dehidroascórbico (DHA) (Salazar *et al.*, 2023). La absorción de AA a partir de la dieta ocurre en el epitelio del intestino delgado a través de transportadores dependientes de sodio (Wilson, 2005). Una vez en sangre, los niveles de AA pueden alcanzar los 50 μM , de los cuales un 5-10% corresponde a DHA (Nualart *et al.*, 2014). El AA y DHA son incorporados a las membranas celulares a través de los transportadores de vitamina C dependientes de sodio (SVCT) y los transportadores facilitadores de glucosa (GLUT), respectivamente (Nualart *et al.*, 2014).

Los SVCT son una familia de transportadores de AA dependientes de sodio y constan de cuatro isoformas: SVCT1, SVCT2, SVCT3 y SVCT4, donde los dos

últimos corresponden a los denominados miembros huérfanos (Savini *et al.*, 2008). SVCT1 y SVCT2 son proteínas que poseen 12 dominios transmembrana y una cantidad similar de aminoácidos en su estructura, sin embargo, difieren en su distribución tisular (Harrison y May, 2009; Nualart *et al.*, 2014). Por un lado, el transportador SVCT1 humano se compone de 598 aminoácidos y se encuentra altamente expresando en las membranas apicales de las células tubulares del intestino y el riñón, donde media la absorción y reabsorción de AA respectivamente (Savini *et al.*, 2008; Harrison y May, 2009). Por otro lado, el SVCT2 humano se compone de 650 aminoácidos y se encuentra en las células de la mayoría de los tejidos, pero principalmente en cerebro y ojos (Castro *et al.*, 2001; Savini *et al.*, 2008; Harrison y May, 2009). Adicionalmente, se ha descrito una variable de SVCT2 denominada SVCT2 corta (SVCT2sh), la cual actúa como una proteína inhibidora en la absorción de AA (Salazar *et al.*, 2014).

En el SNC, el AA es ingresado a través de los transportadores SVCT2, mientras que DHA es incorporado a través de los transportadores GLUT1 (Nualart *et al.*, 2014). El ingreso de vitamina C se encuentra limitado por dos barreras, la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera formada por células epiteliales del plexo coroideo (Nualart *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha determinado que las células epiteliales del plexo coroideo expresan SVCT2 en su membrana basolateral, permitiendo el ingreso de AA (Ulloa *et al.*, 2019). Una vez dentro de estas células, el AA es liberado al líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de los transportadores

GLUT12, cuyo mecanismo recientemente fue descrito (Portugal, 2024). En el LCR, la concentración de AA se equilibra con la concentración en el líquido extracelular (LEC) a través de difusión por medio de las células endoteliales (Nualart *et al.*, 2014) (Fig. 1-3).

Una vez en el parénquima cerebral, el AA es incorporado a las células neuronales a través de SVCT2. Dentro de las neuronas, el AA actúa como donador de un electrón generando el radical libre de ascorbato, el cual luego es reducido nuevamente a AA dentro de la célula mediante reductasas dependientes de NADH y NADPH; sin embargo, la acumulación del radical ascorbato produce la interacción de dos de estas moléculas, que al reaccionar forman una molécula de AA y otra de DHA, el cual es muy inestable (Harrison y May, 2009). Para la mantención de las concentraciones intracelulares fisiológicas de AA se ha propuesto una interacción entre las neuronas y los astrocitos que permite el reciclaje de esta vitamina a través del denominado efecto espectador (Nualart *et al.*, 2003). Este mecanismo implica la oxidación de AA a DHA en las neuronas, seguido por su liberación al LEC mediante el transportador GLUT3. Una vez en el LEC, el DHA es captado e ingresado a los astrocitos a través de GLUT1, donde será reducido a AA y liberado nuevamente al LEC para su utilización (Nualart *et al.*, 2014).

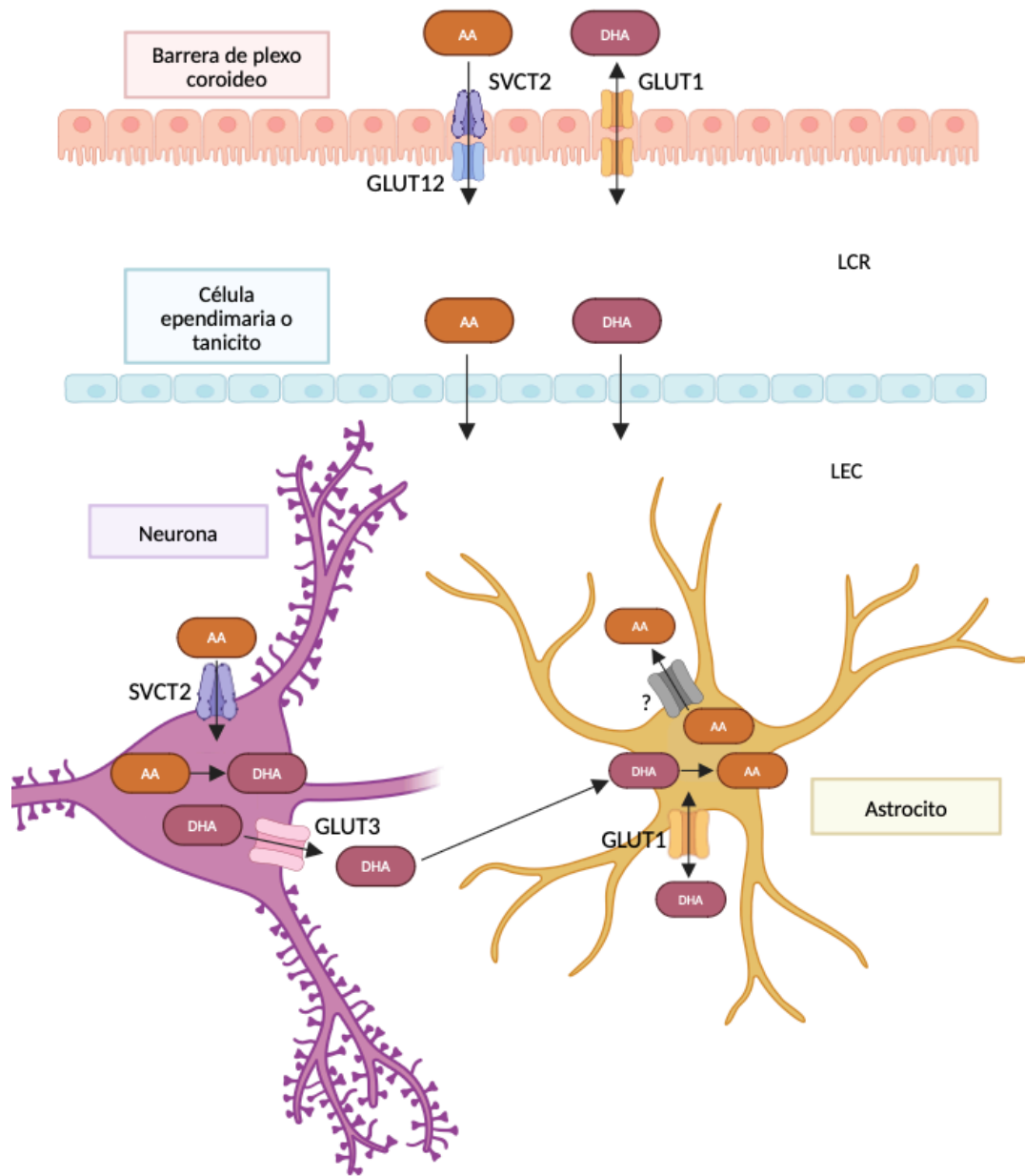


Figura 1-3. AA en el SNC. Ingreso y metabolización de AA en el SNC. El AA ingresa al LCR desde el epitelio del plexo coroideo a través de transportadores SVCT2 y GLUT12, mientras que DHA ingresa a través de GLUT1. En el LCR, AA y DHA atraviesan la célula endimaria o tanicitos para llegar al LEC. Aquí, el AA ingresa a las neuronas a través de SVCT2 donde es convertido en DHA. Este DHA luego es incorporado por los astrocitos para convertirlo nuevamente en AA, generado un proceso de reciclaje de AA. Imagen modificada de (Harrison y May, 2009; Nualart *et al.*, 2014; Portugal, 2024). Esquema creado en BioRender.com.

Este mecanismo no solo es de vital importancia para mantener las concentraciones intracelulares de AA requeridas, sino también para evitar la acumulación de DHA en el cerebro. Se estima que los astrocitos poseen hasta cuatro veces más glutatión (GSH) que las neuronas y, por lo tanto, una mayor capacidad de reducir el DHA (Nualart *et al.*, 2014). En el SNC, en condiciones fisiológicas, el DHA se encuentra en concentraciones muy bajas y, dada su toxicidad para las células neuronales, es incorporado rápidamente a los astrocitos para su reducción (García-Krauss *et al.*, 2016). Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas donde hay un aumento de estrés oxidativo, se puede producir una oxidación masiva del AA extracelular producto de ROS, aumentando las concentraciones de DHA y provocar daño en las neuronas (Cisternas *et al.*, 2014). Nuestro laboratorio ha descrito varios de los efectos que tiene el DHA en las células neuronales. Cisterna y colaboradores el 2014, demostró que un aumento creciente de concentración de DHA producía una oxidación transitoria de GSH, sugiriendo un cambio metabólico en neuronas corticales inducido por el DHA (Cisternas *et al.*, 2014). En este mismo estudio también se determinó que la acumulación de DHA inducía una disminución de GSH, lo cual alteraba la vía glucolítica neuronal y aumentaba el consumo de glucosa a través de la vía de las pentosas-fosfato (PPP) (Cisternas *et al.*, 2014). Por otro lado, García-Krauss y colaboradores en 2016 demostraron que un aumento masivo de DHA promovía la muerte de las células neuronales corticales bajo condiciones de estrés oxidativo (García-Krauss *et al.*, 2016). Finalmente,

Espinoza y colaboradores en 2020 demostraron que una acumulación de DHA induce una alteración en el crecimiento y pérdida de neuritas en un ambiente oxidativo, lo cual era reversible a través del reciclaje de DHA por medio de los astrocitos corticales (Espinoza *et al.*, 2020).

1.6 Esclerosis lateral amiotrófica experimental

Los mamíferos, en general, son capaces de sintetizar la vitamina C de forma endógena; sin embargo, especies como los cobayos, capibaras, algunos primates y los seres humanos deben introducirla a través de la dieta. Esto se debe a que estas especies presentan un gen no funcional de la enzima L-gulonolactona oxidasa (GULO) encargada de catalizar la última etapa de la biosíntesis de la vitamina C en el hígado (Nualart *et al.*, 2014). En humanos, la dosis diaria recomendada de vitamina C es de 75 y 90 mg en mujeres y hombres respectivamente (Kocot *et al.*, 2017). Aquellas personas que presentan hipovitaminosis o no ingieren esta vitamina corren el riesgo de desarrollar una condición denominada escorbuto ($<11 \mu\text{mol/L}$), la cual se caracteriza por síntomas como anemia, fatiga y síndrome hemorrágico, entre otros signos asociados a la disminución de la síntesis efectiva de colágeno, el cual es crucial para el mantenimiento del tejido conectivo, los vasos sanguíneos y otras estructuras en el organismo (Gandhi *et al.*, 2023).

En 1985, un grupo de investigadores llevó a cabo un experimento que postulaba al cobayo con déficit de vitamina C como un modelo de estudio para la enfermedad del ELA. Los resultados mostraron que la dieta con déficit de vitamina C produjo en los cobayos atrofia neurogénica de los músculos, degeneración de las células motoras del asta anterior de la médula espinal y desmielinización del tracto piramidal, lo cual fue observado a través de tinciones histológicas, también se evidencio en los músculos una disminución de la citocromo c oxidasa y se encontraron hemorragias subcutáneas en articulaciones (den Hartog Jager, 1985).

Si bien los hallazgos en esa época no coinciden completamente con las características del ELA, si se reporta una degeneración neuronal importante. Hoy en día se tiene mucho más conocimiento respecto a esta patología, por lo que resulta relevante estudiar nuevamente si es posible encontrar similitudes morfológicas y/o moleculares que indiquen una relación entre la deficiencia de vitamina C y esta enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por un desequilibrio redox en el sistema nervioso y una disfunción muscular importante.

2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La vitamina C desempeña un papel fundamental como el principal antioxidante en el SNC. Un desequilibrio redox, con un incremento en el estrés oxidativo ha sido vinculado al desarrollo y progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales se incluye el ELA. En este contexto, un déficit de vitamina C podría propiciar un desequilibrio redox y potencialmente contribuir a la génesis y progresión del ELA. Es más, se ha demostrado que una dieta con déficit de vitamina C en los cobayos produce atrofia neurogénica de los músculos, degeneración de las células motoras del asta anterior de la médula espinal y desmielinización del tracto piramidal. Sin embargo, se desconoce si el déficit de vitamina C puede reproducir otras características del ELA como son la gliosis reactiva, el estrés del retículo y el aumento en la expresión de proteínas de muerte celular. Tampoco se conoce cuál es el efecto de la deficiencia de vitamina C en la expresión de proteínas relevantes en la mantención de la homeostasis de la vitamina C, como son SVCT2 y GLUT1.

En base a esto, nuestra pregunta de investigación se formula como:

¿Cuál es el efecto de la deficiencia de vitamina C sobre marcadores clásicos de la neurodegeneración asociados a ELA, como son la degeneración de motoneuronas, gliosis reactiva, estrés de retículo, muerte celular, entre otros?

3. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis plantea que la deficiencia de vitamina C reproduce características morfológicas y moleculares de ELA, como la degeneración de neuronas de la corteza cerebral motora y del asta anterior de la médula espinal, modificaciones subcelulares del retículo endoplasmático rugoso (RER), astrogliosis reactiva y aumento de la expresión de proteínas de muerte celular. Además, alteración en la expresión de proteínas relevantes en la homeostasis de vitamina C, como SVCT2 y GLUT1.

4. OBJETIVO PRINCIPAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar el efecto que tiene la deficiencia de vitamina C en la reproducción de características morfológicas y moleculares de ELA en modelo animal de cobayo deficiente en vitamina C.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Definir la morfología de neuronas motoras de la corteza cerebral y del asta anterior de la médula espinal en cobayos deficientes en vitamina C, especialmente analizando las características del RER.
- 2) Determinar expresión de proteínas involucradas en muerte celular, como caspasa-3 clivada, marcador de apoptosis, y MLKL, marcador de necroptosis, en la médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.
- 3) Evaluar la expresión de SVCT2 y GLUT1, proteínas involucradas en la homeostasis de vitamina C en la corteza cerebral y en el asta anterior de la médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron cobayos Pirbrigh machos y hembra de 1 a 2 meses de edad. Los cobayos que corresponden a muestras control fueron alimentados utilizando pellet que contiene vegetales, mientras que los cobayos en tratamiento deficiente en vitamina C fueron alimentados con pellet carente de vegetales (pellet para conejo). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura entre 20 a 25°C con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad. Además, recibieron libre acceso a agua y fueron alimentados con sus pellets correspondientes diariamente. Luego de 2 a 3 semanas los cobayos control y en deficiencia de vitamina C fueron anestesiados utilizando una mezcla de Ketamina (40%), Xilacina (40%) y Pacifor (20%), y eutanasiados para la obtención de las muestras de cerebro y médula espinal.

Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del National Institute of Health (NIH), Bethesda, MD, y el manual de Bioseguridad de CONICYT. Proyecto Fondecyt N°11170959.

5.2 Procesamiento histológico

5.2.1 Fijación en Bouin

Los cobayos fueron fijados en Bouin (formalina 25%, ácido acético 5% en solución saturada de ácido pícrico) a través de perfusión vascular. Para ello se realizó una punción con catéter en el ventrículo cardiaco izquierdo para luego pasar el fijador Bouin por aproximadamente 10 minutos. Una vez fijados se extrajo la médula y cerebro, los cuales quedaron inmersos por 12 horas en el mismo fijador. Protocolo extraído de (Jara *et al.*, 2016).

5.2.2 Inclusión y corte en parafina

Para la inclusión de las muestras en parafina lo primero a realizar fue la deshidratación del tejido utilizando una serie de alcoholes en concentraciones crecientes 70°, 96°, 100° I, II, III y IV, donde dependiendo del grosor del tejido se determinó el tiempo de los lavados. Luego, el tejido fue expuesto a solvente HistoClear (Merck) por 15 y 30 minutos para luego dejarlo por 3 horas. Finalmente, las muestras se pasaron por baños de parafina I, II, III y IV de 30, 30, 45 y 15 minutos. Una vez confeccionados los bloques, estos se mantuvieron a 4°C. Para la obtención de los cortes de 7 µm se cortaron los bloques de parafina que contenían las muestras de cerebro y médula espinal utilizando un Micrótopo (Leica RM2125). Protocolo extraído de (Jara *et al.*, 2022).

5.3 Tinciones

Para definir la morfología de las neuronas motoras del asta anterior en la médula espinal y corteza motora cerebral se realizaron las tinciones de Hematoxilina – Cromotrope y tinción de Nissl siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

5.3.1 Hematoxilina – Cromotrope

La tinción de Hematoxilina - Cromotrope es una de las tinciones más comunes que se realiza en histología. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe núcleos celulares, mientras que el cromotrope es un colorante ácido que se utiliza para la tinción de citoplasma.

Para esta tinción, las muestras fueron desparafinadas utilizando una serie de solventes HistoClear (Merck) I, II y III, sumergiéndolas durante 5 minutos en cada baño. Posteriormente, las muestras fueron hidratadas mediante una serie de baños de alcohol en concentración decreciente (100° I y II, 96° I y II, 70° y 50°) durante 5 minutos en cada lavado. Finalmente, se eliminó el exceso de alcohol con agua destilada. Para la tinción de núcleos, los tejidos fueron expuestos a hematoxilina previamente filtrada por 3 minutos, seguido de un proceso de lavado en agua corriente durante 3 minutos para eliminar el exceso de colorante y 10 minutos para lograr el viraje de la tinción. Pasado este tiempo las muestras fueron

lavadas rápidamente en agua destilada. Para la tinción de citoplasma, las muestras se sumergieron en una serie de baños de alcohol creciente (50°, 70° y 80°) durante 2 minutos en cada uno. Luego, las muestras se sumergieron en cromotropo durante 5 segundos. Posteriormente, se realizó una serie de lavados rápidos en alcoholes de 96° (I, III y III) para eliminar el exceso de colorante. Luego, se procedió a la deshidratación de las muestras en una serie de baños de alcohol creciente e HistoClear (100° I y II, e HistoClear I, II, III y IV) durante 5 minutos en cada uno. Una vez deshidratadas, las muestras fueron montadas utilizando medio de montaje HistoMount (Merck) para fijar los cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas por microscopio de campo claro.

5.3.2 Tinción de Nissl

La tinción de Nissl es una de tinciones más utilizadas al momento de estudiar tejido nervioso. Esta tinción marca estructuras ácidas como el núcleo celular y los cuerpos de Nissl de un color azul – violeta.

Para esta tinción, las muestras fueron desparafinadas utilizando una serie de solventes HistoClear (Merck) I, II y III, sumergiéndolas durante 5 minutos en cada baño. Posteriormente, las muestras fueron hidratadas mediante una serie de baños de alcohol en concentración decreciente (100° I y II, 96° I y II, 70° y 50°) durante 5 minutos en cada lavado. Finalmente, se eliminó el exceso de alcohol

con agua destilada. Una vez hidratadas, las muestras fueron expuestas a una solución recién filtrada y previamente calentada a 57°C de acetado violeta de cresilo al 0,1%, durante 10 minutos a la misma temperatura. Una vez finalizado el tiempo, las muestras fueron lavadas en agua destilada por 3 minutos. Posteriormente, para comenzar la deshidratación, se realizó una serie de lavados rápidos en alcoholes de 96° (I, II y III), y luego, en una serie de baños de alcohol creciente e HistoClear (100° I y II, e HistoClear I, II, III y IV) durante 5 minutos en cada uno. Una vez deshidratadas, las muestras fueron montadas utilizando medio de montaje HistoClear (Merck) para fijar los cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas por microscopio de campo claro.

5.4 Ensayos de inmunolocalización

5.4.1 Inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica utilizando cortes de médula espinal y cerebro de cobayo de 7 µm para definir la morfología de las neuronas del asta anterior de la médula espinal y corteza motora cerebral, y determinar la expresión y localización de proteínas presentes en el RER, proteínas involucradas en la muerte celular y proteínas relacionadas a la homeostasis de vitamina C.

Lo primero que se realizó fue la desparafinación de las muestras utilizando solvente NeoClear (Merck) I, II y III por 5 minutos en cada baño. Luego se

procedió a la hidratación de estas utilizando concentraciones decrecientes de alcoholes 100° I y II, 96° I y II, 70° y 50° por 5 minutos en cada lavado. Una vez hidratadas se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena utilizando peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 minutos. Luego, las muestras fueron lavadas utilizando tampón Tris-fosfato 1X (Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 3,5 mM, NaCl 120 mM, TRIS 10 mM, pH 7,8, se preparan 10X, luego se realiza una dilución 1X) 3 veces por 10 minutos, para después incubar la solución con el anticuerpo primario (Tabla 1), que consta del anticuerpo primario diluido en tampón Tris-fosfato + BSA 1%, el cual se dejó en incubación por alrededor de 16 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Una vez terminado el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas utilizando el tampón Tris-fosfato 1X (pH 7,8) 3 veces por 10 minutos, para después ser expuestas a la solución de anticuerpo secundario (Tabla 2) + HRP (peroxidasa de rábano picante), que consta del anticuerpo secundario diluido en Buffer Tris-fosfato + BSA 1%, y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posterior a la incubación del segundo anticuerpo, se realizó otro lavado utilizando tampón Tris-fosfato 1X (pH 7,8) 3 veces por 10 minutos y se procedió al revelado, en el cual se utilizó una solución de buffer Tris-fosfato 1X (pH 7,8), diaminobenzidina (DAB) (0,7 $\mu\text{g/mL}$) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) por 15 minutos en oscuridad. Luego, se procedió a la deshidratación

de las muestras utilizando alcoholes en concentración creciente 70° I y II, 96° I y II y 100° I y II, y solución NeoClear I, II, III y IV por 5 minutos en cada lavado. Finalmente, una vez que las muestras fueron deshidratadas, se utilizó medio de montaje NeoMount (Merck) para colocar los cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas por microscopio de campo claro. Protocolo extraído de (Ramírez *et al.*, 2022).

5.4.2 Inmunofluorescencia

Se realizó la técnica de inmunofluorescencia utilizando cortes de médula espinal y cerebro de cobayo de 7 µm para definir la morfología de las neuronas del asta anterior de la médula espinal y corteza motora cerebral, determinar la expresión de proteínas de muerte celular y proteínas relacionadas a la homeostasis de vitamina C.

Lo primero que se realizó fue la desparafinación de las muestras utilizando solvente NeoClear (Merck) I, II y III por 5 minutos en cada baño. Luego, se procedió a la hidratación de estas utilizando concentraciones decrecientes de alcoholes 100° I y II, 96° I y II, 70° y 50° por 5 minutos en cada lavado. Una vez hidratadas las muestras fueron lavadas utilizando tampón Tris-fosfato 1X (Na₂HPO₄ 8,4 mM, KH₂PO₄ 3,5 mM, NaCl 120 mM, TRIS 10 mM, pH 7,8, se preparan 10X, luego se realiza una dilución 1X) 3 veces por 10 minutos. Seguido

de esto, se colocó la solución con el anticuerpo primario (Tabla 1), que consta del anticuerpo primario diluido en tampón Tris-fosfato + BSA 1%, el cual se dejó en incubación por alrededor de 16 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Una vez terminado el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas utilizando el buffer Tris-fosfato 1X (pH 7,8) 3 veces por 10 minutos. Una vez terminado el lavado, las muestras fueron expuestas a la solución de anticuerpo secundario (Tabla 2), que consta del anticuerpo secundario diluido en tampón Tris-fosfato + BSA 1%, y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posterior a la incubación del segundo anticuerpo se realizó un último lavado utilizando tampón Tris-fosfato 1X (pH 7,8) 3 veces por 10 minutos y se procedió a colocar los cubreobjetos utilizando medio de montaje para fluorescencia (DAKO). Las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. Protocolo extraído de (Ulloa *et al.*, 2019).

5.5 Microscopía

El análisis de las muestras y la adquisición de las imágenes de las tinciones histológicas y análisis inmunohistoquímico se realizó utilizando el microscopio Eclipse Ni (Nikon). Mientras que las muestras de microscopía de fluorescencia se adquirieron a través de el microscopio confocal espectral LSM 780 (Zeiss) y

el microscopio confocal de alta resolución SP8 (Leica), específicamente para la reconstrucción de tejido 3D. Todos estos equipos se encuentran ubicados en las dependencias del Centro de Microscopia Avanzada CMA-Biobío.

La intensidad de tinción y fluorescencia fueron cuantificadas a través del software ImageJ, donde se seleccionaron las regiones de interés correspondientes en las muestras de corteza cerebral y médula espinal. La colocalización se analizó a través del software IMARIS 9.2 (Bitplane) y se graficó el respectivo coeficiente de superposición de Manders.

5.6 Análisis estadístico

Los análisis cuantitativos para la comparación entre dos grupos se realizaron utilizando un t-test no emparejado de dos colas, considerando un $n=3$ por condición. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU).

Tabla 5-1. Anticuerpos primarios ensayos inmunolocalización.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-Vimentina	Gallina	1:400	Millipore
Anti-GFAP	Conejo	1:200	DAKO
Anti-Tubulina β III	Ratón	1:1000	Promega
KDEL	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology
P220	Conejo	1:100	Donación
NeuN	Ratón	1:500	Millipore
MAP2	Ratón	1:100	EnCor
PDI	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Calnexina	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Caspasa-3 clivada	Conejo	1:50	Millipore
Anti-MLKL	Rata	1:100	Millipore
Anti-SVCT2	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
SV2	Ratón	1:50	Hybridoma Bank
Anti-GLUT1	Conejo	1:200	Millipore

Tabla 5-2. Anticuerpos secundarios ensayos inmunolocalización.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-Ratón + HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Conejo + HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Gallina + HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Cabra + HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Ratón (Cy3)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Cabra (AF488)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Conejo (Cy5)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Rata (Cy3)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Conejo (AF488)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-Ratón (AF488)	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch

6. RESULTADOS

6.1 Morfología y degeneración neuronal

Una de las principales características patológicas de la enfermedad de ELA es la degeneración de las neuronas motoras que se encuentran en la corteza cerebral motora, el tronco encefálico y en el asta anterior de la médula espinal, lo que produce disfunción en la musculatura esquelética de los individuos que padecen la enfermedad.

En este estudio, como punto de partida, se realizó un análisis con la tinción histológica de Hematoxilina y Cromotropeo con el fin de observar la histología de los cuerpos neuronales y buscar indicios de degeneración celular a nivel cortical y medular de cobayos en deficiencia de vitamina C. Por un lado, a nivel cortical, se analizó la corteza cerebral motora y el tronco encefálico, específicamente las neuronas de la corteza externa (capa II y III), neuronas piramidales de la corteza motora profunda (capa V) y las neuronas presentes en la protuberancia anular y el bulbo raquídeo del tronco encefálico (Fig. 6-1). Por otro lado, a nivel de la médula espinal, se analizaron los segmentos cervicales, torácicos y lumbares, con un énfasis en el asta anterior de dichas médulas (Fig. 6-2).

A través de este análisis histológico se comparó la morfología neuronal de muestras provenientes de los animales en deficiencia de vitamina C respecto a un control con el fin de evaluar la presencia de indicios de degeneración neuronal tales como un cuerpo celular de menor tamaño, citoplasma eosinófilo y un núcleo fragmentado.

La observación de las muestras teñidas a través de microscopio de campo claro nos permitió determinar que las neuronas (flechas negras) presentes en los tejidos de corteza cerebral externa (Fig. 6-1. A, D), corteza profunda (Fig. 6-1. B, E), tronco encefálico (Fig. 6-1. C, F), y los distintos segmentos de médula espinal (Fig. 6-2. A-F) presentaron una arquitectura celular característica. La ampliación de las imágenes obtenidas de las zonas encefálicas (Fig. 6-1. G-L) y de la médula espinal (Fig. 6-2. G-L) nos permitieron determinar que estas neuronas presentaban cuerpos celulares bien definidos, así como también una buena distribución de orgánulos celulares y sustancia de Nissl. Estas observaciones nos sugieren que, en condición de déficit de vitamina C, no se producen características morfológicas que indiquen el desarrollo de un proceso neurodegenerativo.

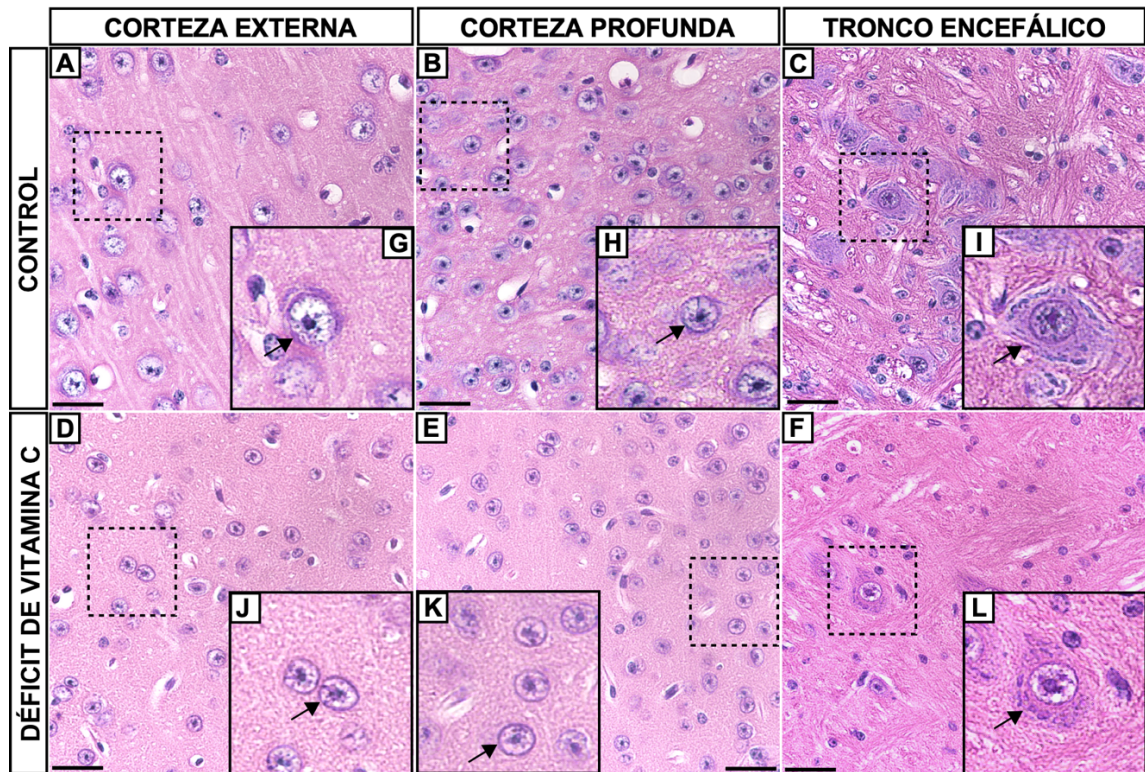


Figura 6-1. Tinción histológica Hematoxilina-Cromotrope en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C. Tinción Hematoxilina - Cromotrope para muestras de tejido de corteza cerebral externa (A, D), corteza profunda (B, E) y tronco encefálico (C, F) de cobayos en deficiencia de vitamina C. En los insertos (G, H, I, J, K, L) se observa una amplificación las neuronas (flecha negra), las cuales presentan una morfología característica sin indicios de degeneración neuronal. Barra de tamaño = 50 μ m.

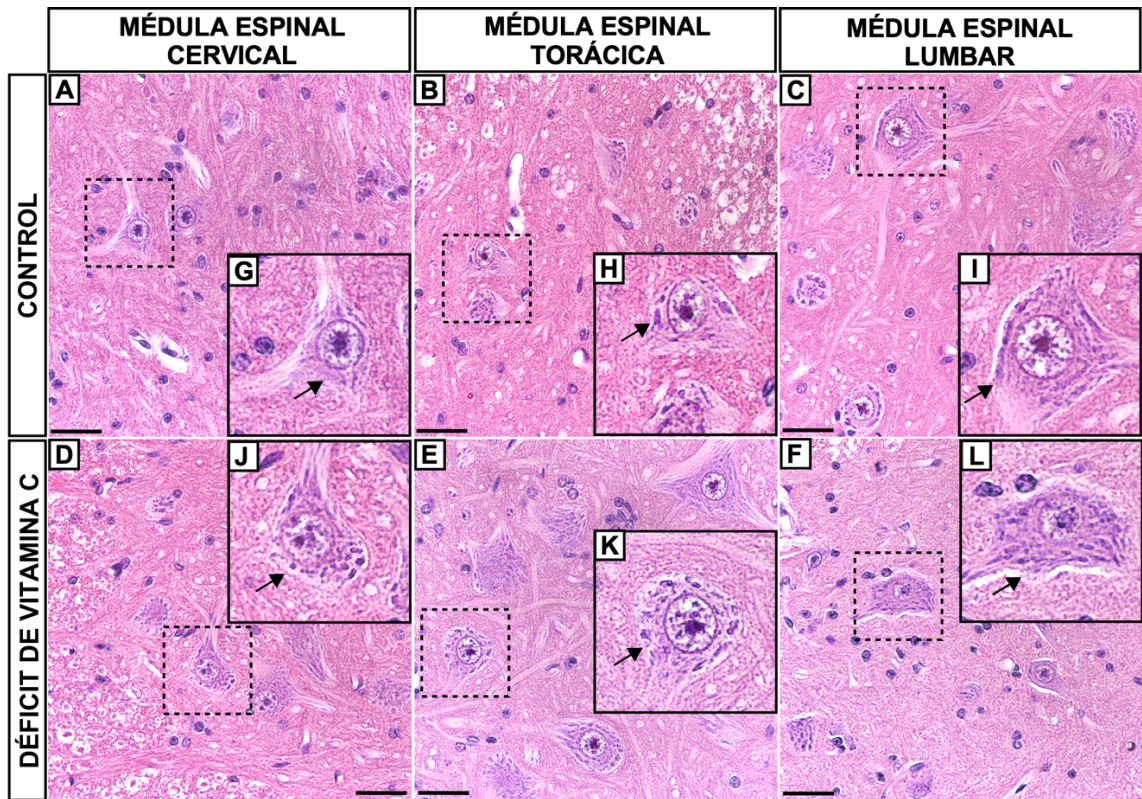


Figura 6-2. Tinción histológica Hematoxilina-Cromotropo en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Tinción Hematoxilina - Cromotropo para muestras de tejido de médula espinal cervical (A, D), torácica (B, E) y lumbar (C, F). En los insertos (G, H, I, J, K, L) se observa una amplificación de las neuronas motoras (flecha negra), las cuales presentan una morfología característica sin indicios de degeneración neuronal. Barra de tamaño = 50 μ m.

A continuación, se realizó otro análisis utilizando la tinción histológica de Nissl. Esta tinción utiliza el colorante básico violeta de cresilo, el cual interacciona con el ácido nucleico contenido en el ADN y ARN, tiñendo así los núcleos celulares y estructuras como el RE y los ribosomas presentes en el citoplasma de la neurona (sustancia de Nissl). Mediante este análisis histológico se examinó la morfología neuronal y se evaluaron cambios a nivel subcelular, como la distribución del retículo, en muestras de tejido obtenidos de corteza cerebral externa, corteza profunda y tronco encefálico (Fig. 6-3), así como de la medula espinal cervical, torácica y lumbar de cobayos en deficiencia de vitamina C (Fig. 6-4). Las observaciones obtenidas a través de este análisis no revelaron alteraciones morfológicas en las neuronas que sugirieran neurodegeneración. Sin embargo, se observó lo que podría ser incremento en la tinción, en muestras de corteza cerebral externa (Fig. 6-3. A, D) y profunda (Fig. 6-3. B, E), pero principalmente en las neuronas (flechas negras) del tronco encefálico (Fig. 6-3. C, F) y la médula espinal (Fig. 6-4), donde se observó un mayor marcaje de los corpúsculos de Nissl (flechas blancas) presentes en los cuerpos neuronales de las muestras de los animales con déficit de vitamina C. También se observó una distribución preferente de los cuerpos de Nissl en las muestras de tronco encefálico (Fig. 6-3. I, L) y médula lumbar (Fig. 6-4. I, L), donde estos se observan distribuidos principalmente cerca de la membrana plasmática neuronal. Este incremento y particular distribución podrían ser un indicio de una eventual alteración en el RE en estas neuronas, lo cual será evaluado más adelante.

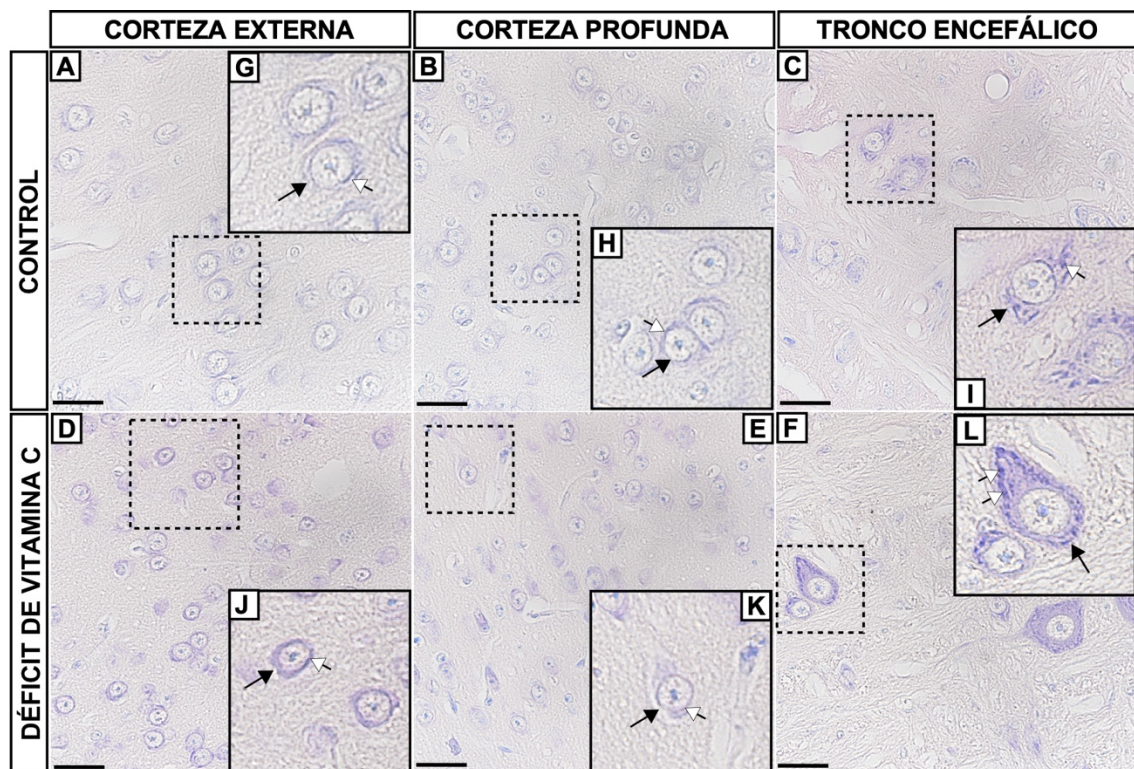


Figura 6-3. Tinción histológica de Nissl en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C. Tinción de Nissl para muestras de tejido de corteza cerebral externa (A, D), corteza profunda (B, E) y tronco encefálico (C, F) de cobayos en deficiencia de vitamina C. En los insertos (G, H, I, J, K, L) se observan una amplificación de las neuronas (flecha negra). Estas neuronas presentan una morfología característica, sin embargo, se logra observar un leve aumento de tinción en los gránulos presentes en el citoplasma y adyacentes al núcleo (flecha blanca), estructuras que podrían corresponder a ribosomas y el RE. Se observa además una distribución particular de los cuerpos de Nissl en neuronas del tronco encefálico, los cuales se encuentran ubicados cercanos a la membrana plasmática de la neurona (I, L). Barra de tamaño = 50 μ m.

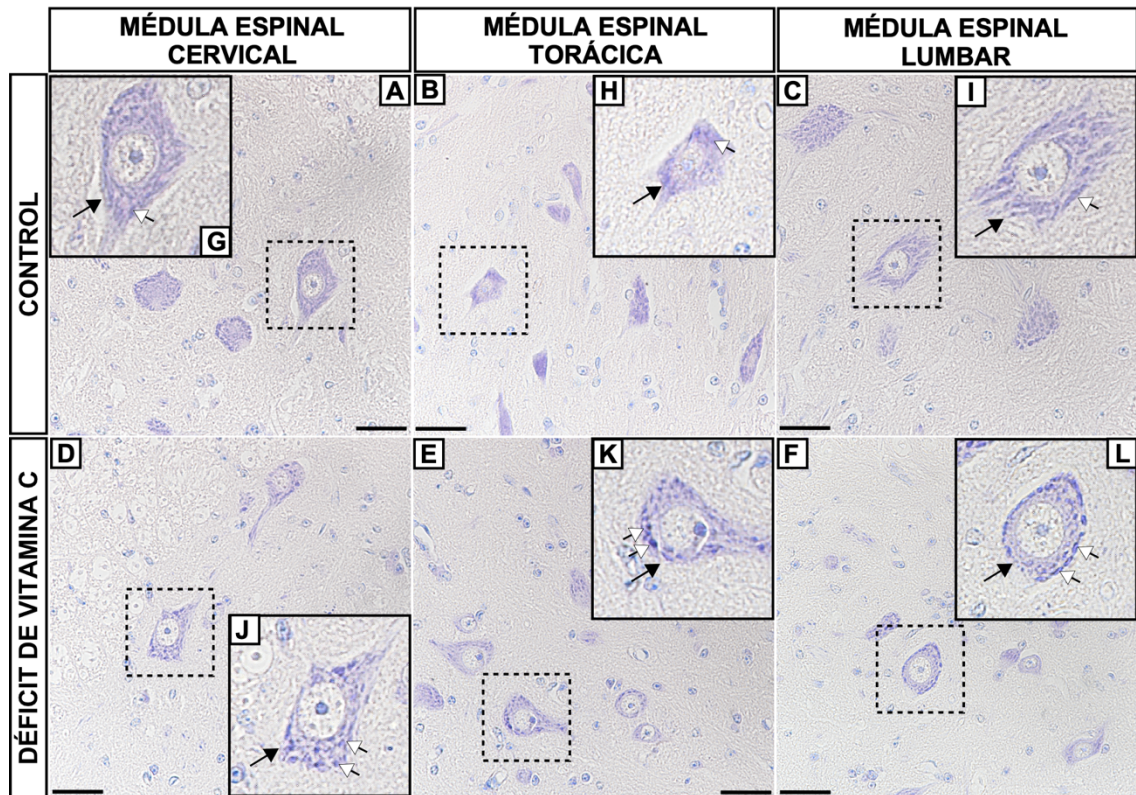


Figura 6-4. Tinción histológica de Nissl en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Tinción de Nissl para muestras de tejido de médula espinal cervical (A, D), torácica (B, E) y lumbar (C, F) de cobayos en deficiencia de vitamina C. En los insertos (G, H, I, J, K, L) se observan una amplificación de las neuronas (flecha negra). Estas neuronas presentan una morfología característica, sin embargo, se logra observar un moderado aumento de tinción en los gránulos presentes en el citoplasma y adyacentes al Se observa además una distribución particular de los cuerpos de Nissl en neuronas de la médula espinal lumbar, los cuales se encuentran ubicados cercanos a la membrana plasmática de la neurona (I, L). Barra de tamaño = 50 μm .

6.2 Análisis de los procesos neuronales

Los resultados obtenidos a partir de las tinciones histológicas de Hematoxilina y Cromotopo y la tinción de Nissl sugieren que no se produce degeneración neuronal en cobayos con deficiencia de vitamina C. Estas tinciones nos permitieron visualizar principalmente el cuerpo y el núcleo celular, sin embargo, para evaluar con mayor precisión las características que presentan las prolongaciones neuronales (axones y dendritas), es necesario el uso de anticuerpos que posibiliten una mejor observación de estas estructuras.

Uno de los marcadores neuronales más utilizados en el estudio de la neurobiología corresponde a la Tubulina β III (TUJ1). Las tubulinas son proteínas estructurales esenciales en la formación de los microtúbulos del citoesqueleto. TUJ1, un isotipo de tubulina, es utilizada como marcador específico de neuronas desde etapas tempranas de su diferenciación tanto en el SNC como en el SNP, para evaluar procesos como la neurogénesis y el crecimiento axonal (Duly *et al.*, 2022). Para continuar nuestro estudio, se realizó un análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo TUJ1 en muestras de tejido de corteza cerebral (Fig. 6-5), así como también tronco encefálico y los segmentos cervicales, torácicos y lumbares de la medula espinal (Fig. 6-6) provenientes de cobayos en deficiencia de vitamina C, con el fin de evaluar una posible alteración en los procesos de las neuronas bajo estas condiciones.

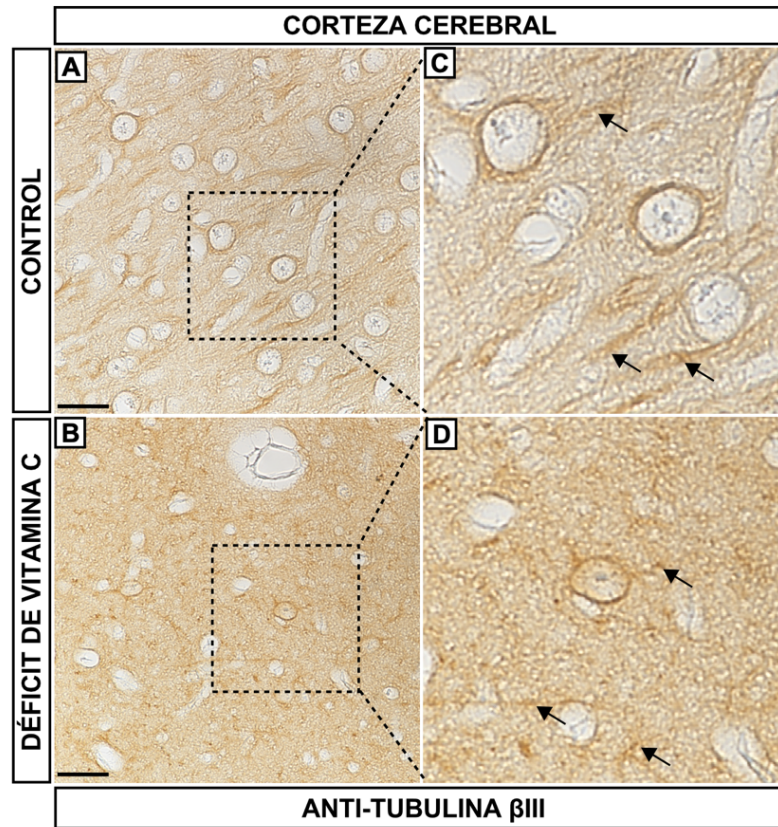


Figura 6-5. Análisis inmunohistoquímico con Tubulina β III en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-Tubulina β III (1:1000) para muestras de tejido de corteza cerebral (A, B) de cobayos con deficiencia de vitamina C. (C) y (D) corresponden a una amplificación de las muestras de corteza cerebral control y con déficit de vitamina C, respectivamente, donde se observan los procesos de las neuronas corticales (flechas blancas). Se evidencia alteración en la organización de las prolongaciones neuronales en las muestras provenientes del animal con deficiencia en vitamina C. Barra de tamaño = 50 μ m.

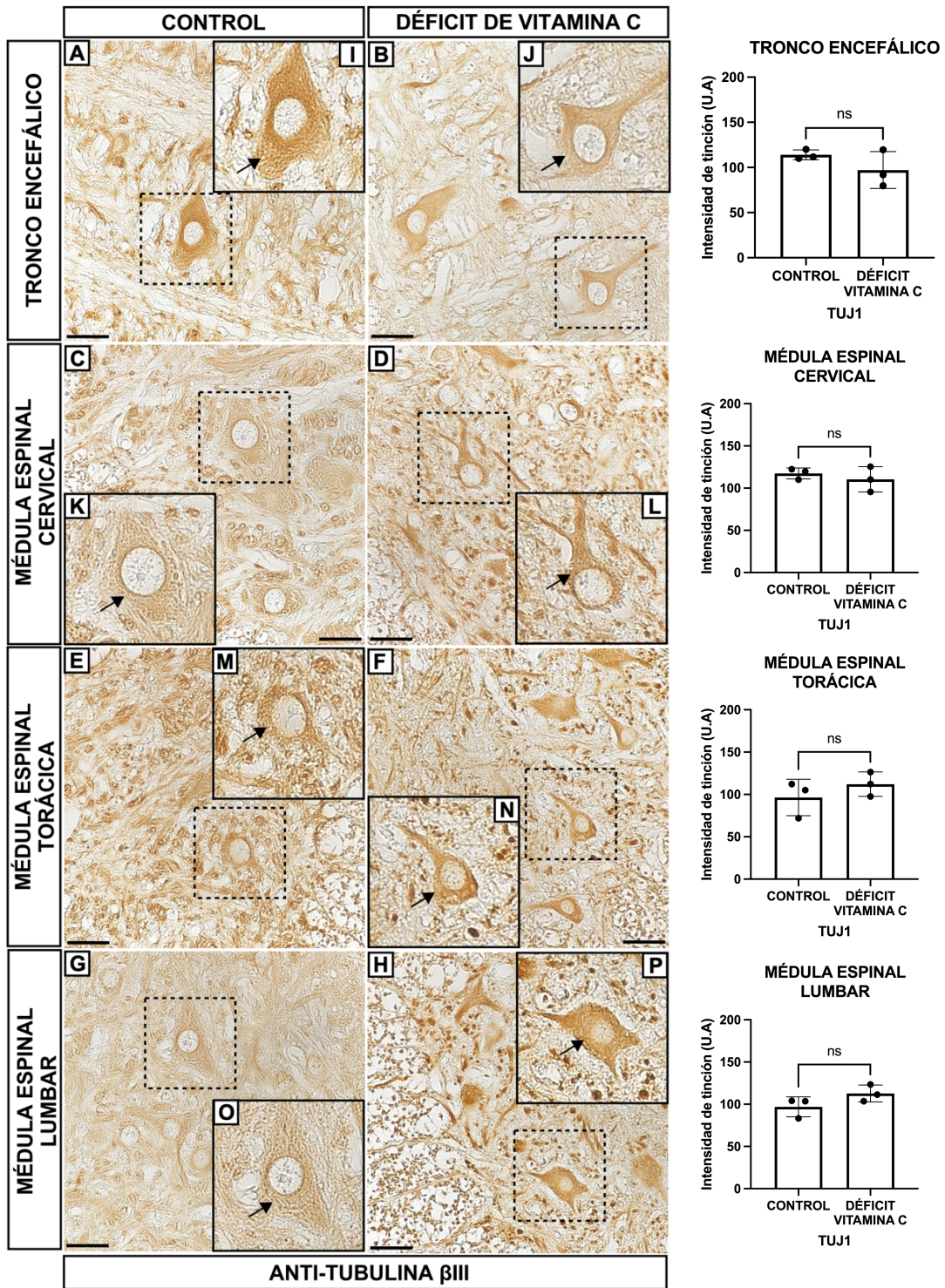


Figura 6-6. Análisis inmunohistoquímico con Tubulina β III en tronco encefálico y médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-Tubulina β III (1:1000) para muestras de tronco encefálico (A, B) y los segmentos cervicales, (C, D), torácicos (E, F) y lumbares (G, H) de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (I, J, K, L, M, N, O, P) se observan una amplificación de las neuronas y parte de sus prolongaciones neuronales (flecha negra). Se evaluó a través de un análisis cuantitativo la posibilidad de un aumento en el marcaje de TUJ1 en estas neuronas, sin embargo, los resultados no indicaron un cambio significativo en estas muestras. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un n=3 por condición. ns = not significant. Barra de tamaño = 50 μ m.

En este análisis inmunohistoquímico logramos observar, a nivel de la corteza cerebral profunda y motora, una alteración en la organización de los procesos neuronales de las muestras de cobayos con deficiencia de vitamina C. Como se observa en la figura (Fig. 6-5. A, B), en condiciones de deficiencia de vitamina C se pierde la alineación perpendicular de los procesos (flechas negras) que se observa en las neuronas control, lo que sugiere una alteración asociada a la disposición de los procesos de las células neuronales. En tronco encefálico (Fig. 6-6. A, B) y médula espinal (Fig. 6-6. C-H) no se observó alteración en los procesos, aunque si se evaluó un posible aumento de marcaje en los cuerpos neuronales (flechas negras). Sin embargo, estadísticamente, no existe una diferencia significativa en la expresión de TUJ1 en estas áreas.

A continuación, para complementar el análisis inmunohistoquímico, se realizó una inmunofluorescencia utilizando el marcador TUJ1, seguida de una reconstrucción 3D del tejido de la corteza cerebral (Fig. 6-7). Esto permitió una observación más detallada de las prolongaciones neuronales y la alteración previamente identificada.

En primer lugar, con el análisis de fluorescencia se logró observar con mayor claridad los procesos neuronales (flechas blancas) y su distribución en la corteza, así como también los cuerpos celulares de las neuronas piramidales (Fig. 6-7. A,

C). Una vez más, se observó una pérdida en la organización de los procesos neuronales en las muestras provenientes de los animales con deficiencia de vitamina C (Fig. 6-7. B, D). En segundo lugar, utilizando la reconstrucción 3D, se observó más claramente esta pérdida de orientación perpendicular de los procesos observados en las muestras control, sugiriendo una desorganización en los procesos neuronales en condiciones de deficiencia de vitamina C (Fig. 6-7. F).

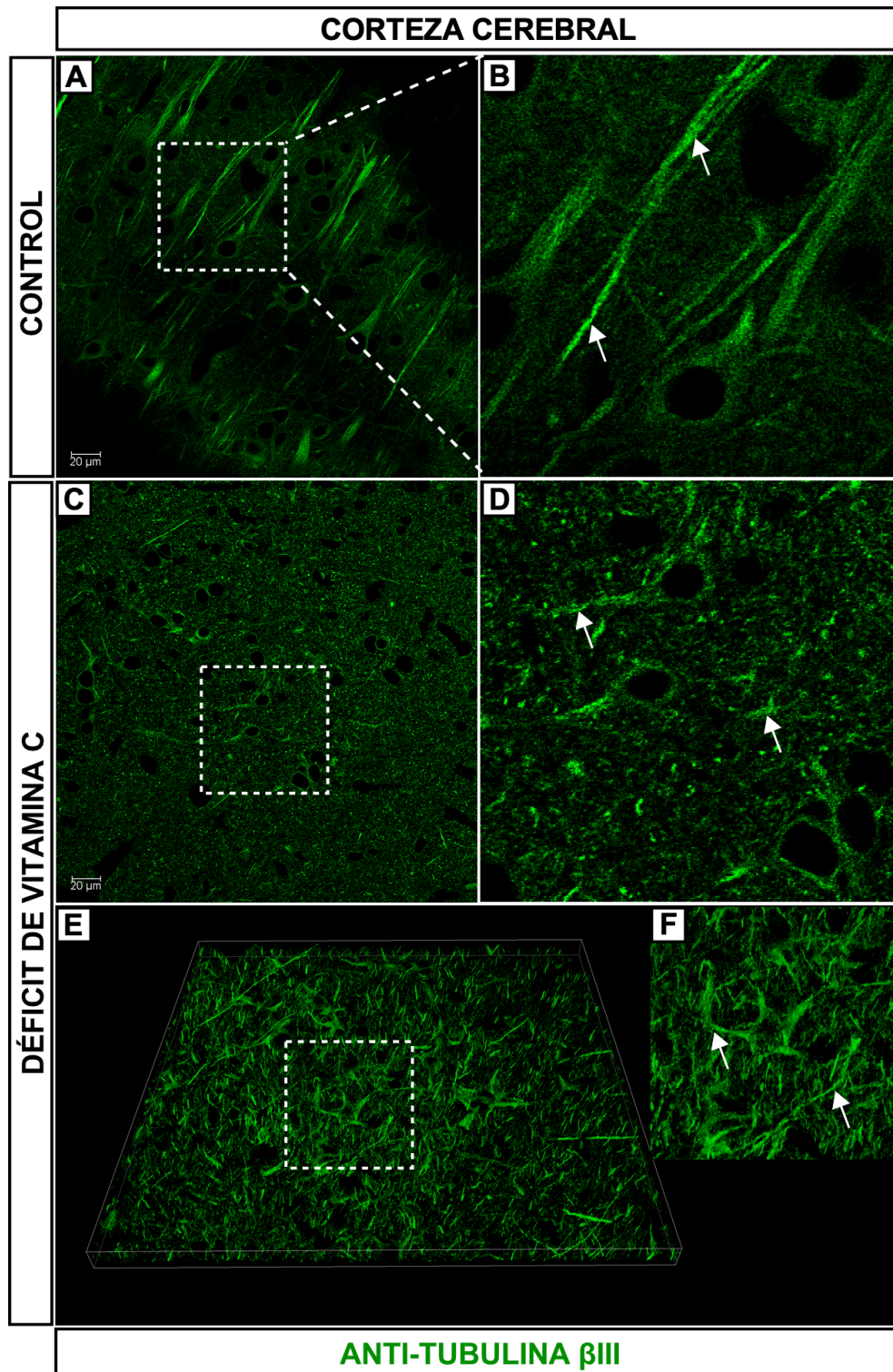


Figura 6-7. Análisis de fluorescencia y reconstrucción 3D de con Tubulina β III en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Tubulina β III (1:1000) para muestras de corteza cerebral (A, C) de cobayos con deficiencia de vitamina C. Los insertos (B) y (D) corresponden a una amplificación donde se observan las prolongaciones neuronales de la corteza (flechas blancas). Este análisis permitió observar una desorganización en los procesos neuronales de las neuronas en condiciones de deficiencia de vitamina C. Adicionalmente, se realizó una reconstrucción 3D del tejido del animal con déficit de vitamina C, donde se observa la organización de los procesos en diferentes planos. El insertos (F) corresponden a una amplificación de la reconstrucción 3D donde se observa en más detalle la alteración de los procesos neuronales observada en estos animales. Barra de tamaño = 20 μ m.

6.3 Análisis de estrés reticular

El retículo endoplasmático (RE) es un organelo fundamental para la síntesis, transporte y plegamiento de proteínas, así como también participa en la síntesis de lípidos, el metabolismo de los carbohidratos y el almacenamiento de calcio (Schwarz y Blower, 2016). La síntesis y el plegamiento de proteínas se encuentra regulado por una serie de proteínas chaperonas y enzimas que aseguran que el proceso se lleve a cabo de manera satisfactoria. Si bien este proceso se encuentra estrictamente regulado, hay ocasiones donde se produce la acumulación de proteínas mal plegadas en la luz del RE, generando estrés en la célula. El estrés celular, producto de un mal funcionamiento del RE, activa varias vías de señalización que llevan a una inhibición de la transducción y la degradación de estas proteínas mal plegadas, con el fin de reestablecer el equilibrio en la célula.

Los resultados obtenidos con la tinción de Nissl mostraban un aumento en la tinción de las sustancias de Nissl presentes en el citoplasma de las neuronas y una distribución particular de estas, principalmente en tronco encefálico y médula espinal lumbar, donde se observaron preferentemente en las cercanías de la membrana celular. El incremento de tinción en estas estructuras sugiere una posible alteración subcelular del retículo en los cobayos con deficiencia de vitamina C. En este contexto, se realizó un análisis para muestras de tejido de

corteza cerebral y tronco encefálico (Fig. 6-8), así como también los segmentos cervicales, torácicos y lumbares de la médula espinal (Fig. 6-9), provenientes de cobayos en déficit de vitamina C utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Para este análisis se hizo uso del anticuerpo anti-KDEL, la cual corresponde a una secuencia aminoacídica o péptido señal característica de proteínas residentes del RE, permitiéndonos así evaluar una posible alteración reticular en las neuronas a nivel cortical y medular. El análisis inmunohistoquímico para KDEL reveló un aumento en el marcaje tanto en el cuerpo celular (flechas negras) como en las sustancias de Nissl (flechas blancas) presentes en el citoplasma de las neuronas de las muestras de animales con deficiencia en vitamina C. Este incremento de marcaje de las sustancias de Nissl se observó principalmente y con mayor claridad en las neuronas del tronco encefálico (Fig. 6-8. C, F) y los segmentos cervicales (Fig. 6-9. A, D), torácico (Fig. 6-9. B, E) y lumbares (Fig. 6-9. C, F) de la médula espinal. Además, con este análisis, nuevamente se observa esta distribución periférica de la sustancia de Nissl, principalmente en médula espinal. Adicionalmente, esta diferencia de marcaje fue cuantificada. El análisis cuantitativo reveló un aumento significativo en las muestras de los cobayos con deficiencia de vitamina C en comparación con las muestras control, lo que confirma nuestras observaciones anteriores. Este significativo incremento de marcaje podría indicar el desarrollo de una alteración del RE en las neuronas bajo la condición de deficiencia de vitamina C.

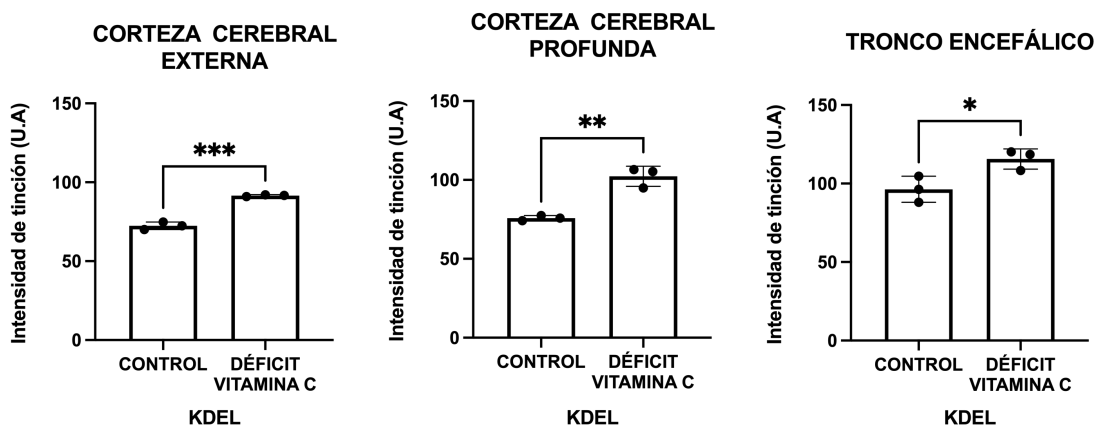
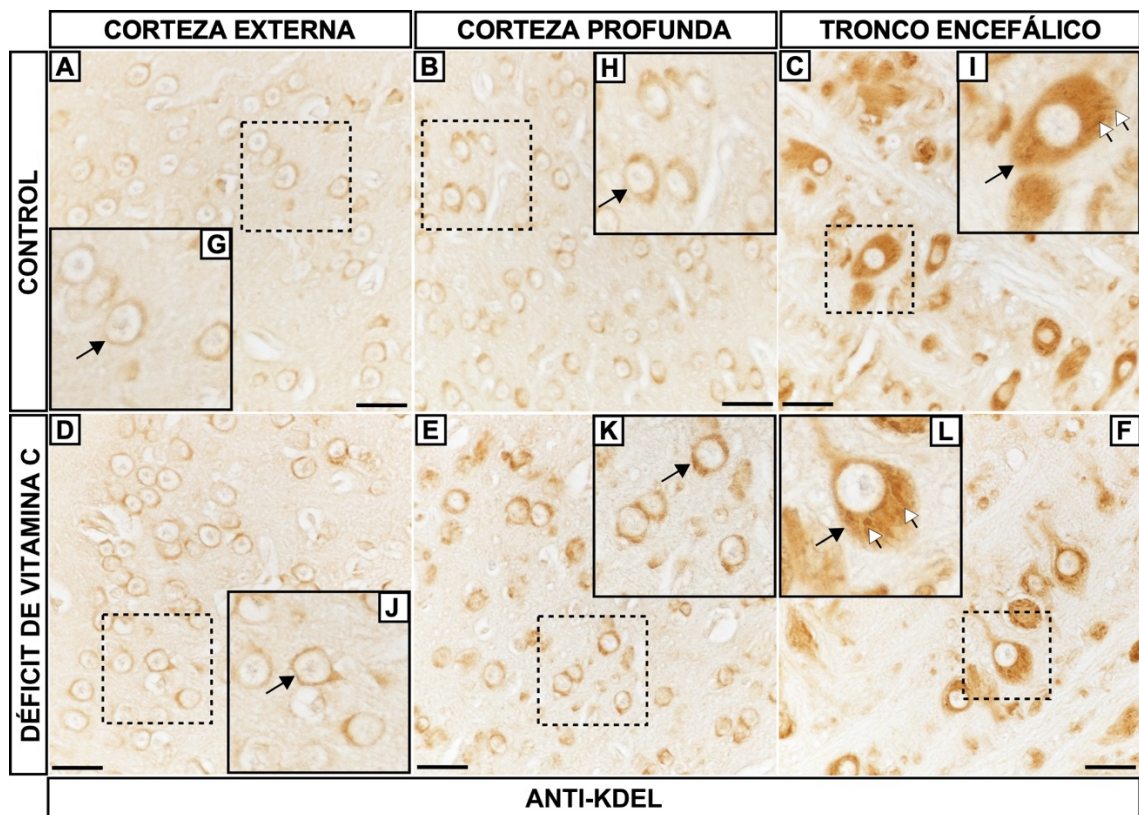


Figura 6-8. Análisis inmunohistoquímico con KDEL en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-KDEL (1:50) para muestras de corteza cerebral externa (A, D), corteza profunda (B, E) y tronco encefálico (C, F) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (G, H, I, J, K, L) se observan una amplificación de las neuronas (flecha negra). Se observa un aumento de marcaje en el citoplasma y sustancia de Nissl provenientes de los animales en deficiencia de vitamina C respecto a las muestras control. Esto se corroboró con un análisis cuantitativo, con el cual se evidenció un aumento significativo en las muestras provenientes de los animales con déficit de vitamina C. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un $n=3$ por condición. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Barra de tamaño = 50 μm .

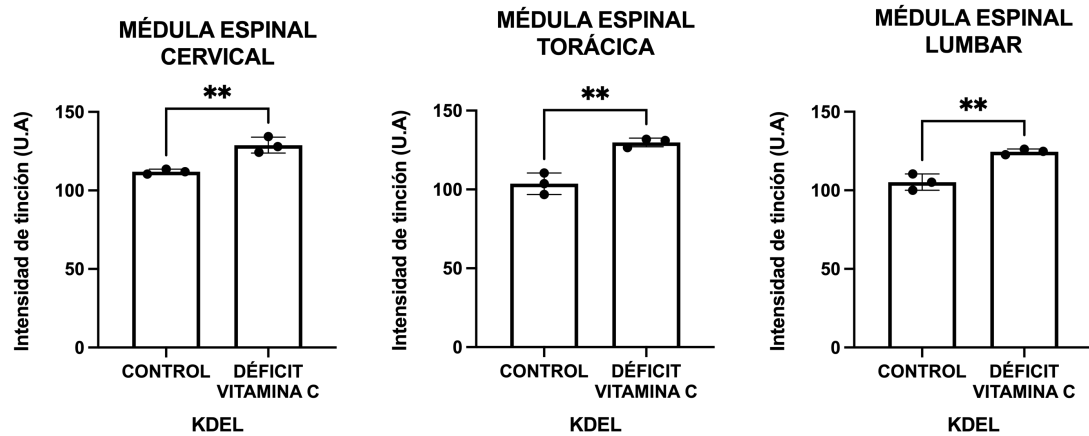
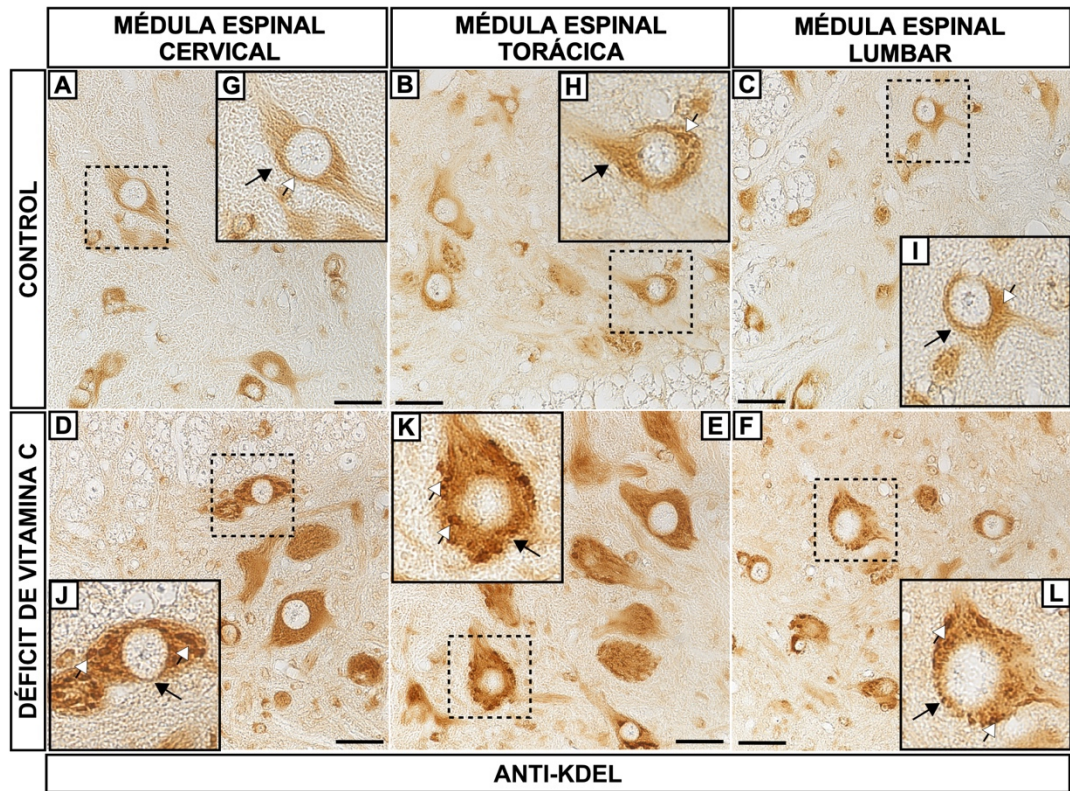


Figura 6-9. Análisis inmunohistoquímico con KDEL en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-KDEL (1:50) para muestras de los segmentos cervicales (A, D), torácicos (B, E) y lumbares (C, F) de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (G, H, I, J, K, L) se observan una amplificación de las neuronas (flecha negra). Se observa un aumento de marcaje en el citoplasma y sustancia de Nissl provenientes de los animales en deficiencia de vitamina C respecto a las muestras control. Esto se corroboró con un análisis cuantitativo, con el cual se evidenció un aumento significativo en las muestras provenientes de los animales con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un n=3 por condición. **p<0,01. Barra de tamaño = 50 μ m.

A continuación, para complementar el análisis inmunohistoquímico, se llevó a cabo un segundo análisis utilizando la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo KDEL en muestras de tejido de corteza cerebral y médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C (Fig. 6-10), con el fin de evaluar nuevamente el marcaje de KDEL a nivel cortical profundo y medular cervical.

El análisis de inmunofluorescencia indicó un importante incremento en el marcaje de KDEL en los cuerpos celulares (flechas blancas) de las neuronas tanto en la corteza cerebral (Fig. 6-10. A, C) como en la médula espinal (Fig. 6-10. E, G) de las muestras de cobayos con deficiencia de vitamina C, reafirmando los resultados obtenidos previamente través del análisis inmunohistoquímico. Para cuantificar esta diferencia de marcaje se realizó una medición de la intensidad de fluorescencia de las muestras. Los resultados del análisis cuantitativo revelaron un aumento significativo tanto a nivel cortical como medular en las muestras de los animales con déficit de vitamina C en comparación con las muestras control. Es relevante señalar que este incremento de marcaje fue más pronunciado en las muestras de médula espinal, sugiriendo que estas neuronas podrían ser más susceptibles a la deficiencia de vitamina C, lo que estaría provocando una posible alteración reticular en esta zona.

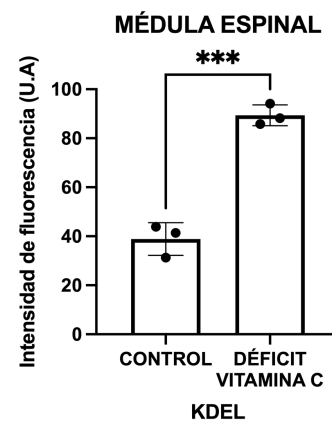
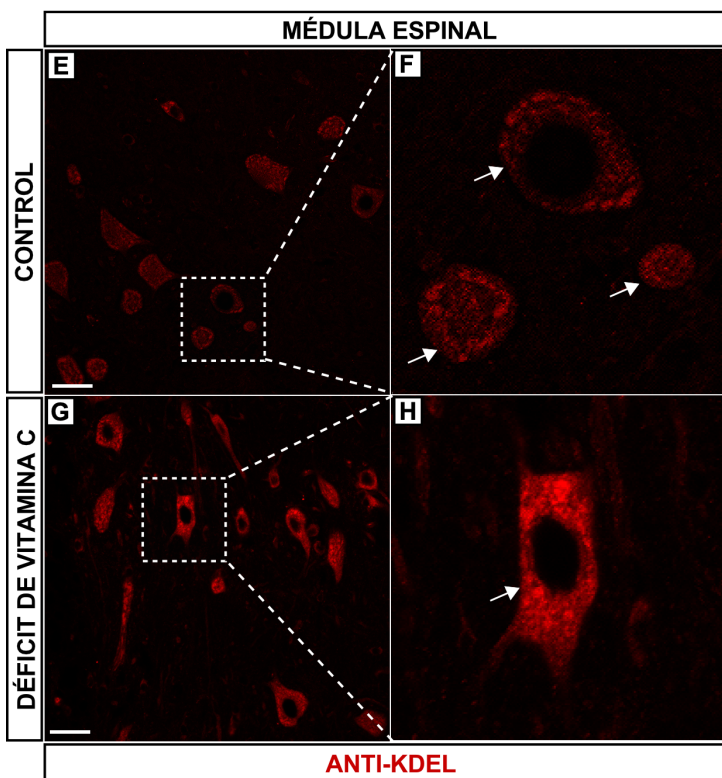
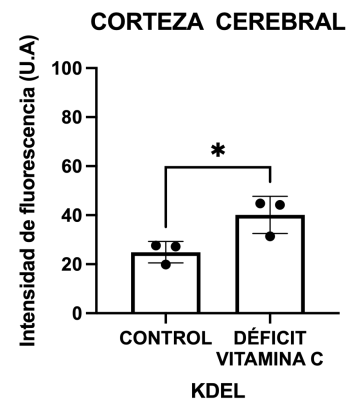
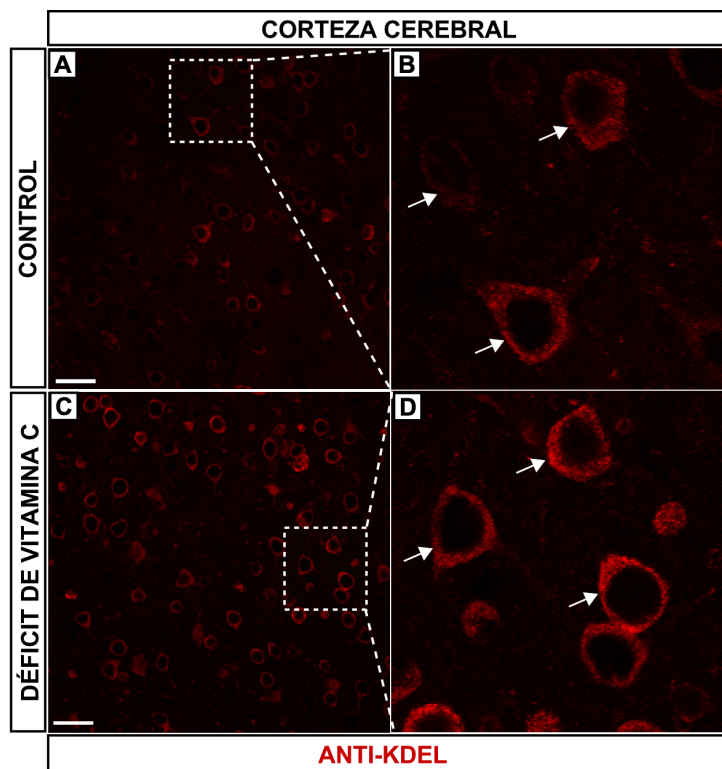


Figura 6-10. Análisis de inmunofluorescencia con KDEL en corteza cerebral y médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-KDEL (1:50) para muestras de corteza cerebral (A, C) y médula espinal (E, G) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (B, D, F, H) se observan una amplificación de las neuronas (flechas blancas). Se observa un aumento de marcaje en el citoplasma de las células neuronales provenientes de los animales en deficiencia de vitamina C respecto a las muestras control. Esto se corroboró con un análisis cuantitativo, con el cual se evidencio un aumento significativo en las muestras provenientes de los animales con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un n=3 por condición. *p<0,05; p***<0,001. Barra de tamaño = 20 μ m.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis preliminar de inmunofluorescencia en la médula espinal de cobayos deficientes de vitamina C utilizando anticuerpos para la proteína disulfuro-isomerasa (PDI) y Calnexina (Fig. 6-11). PDI y Calnexina son proteínas chaperonas residentes del RE, y su función está relacionada con el correcto plegamiento y el control de calidad de las proteínas que son sintetizadas en el retículo. Bajo determinadas condiciones, estas proteínas pueden experimentar un aumento en su expresión, lo que sugeriría una alteración en el RE. En este sentido, para complementar los resultados previamente obtenidos con el anticuerpo KDEL, se evaluó la expresión de estas proteínas a nivel medular.

El análisis de inmunofluorescencia para PDI y Calnexina reveló un importante incremento en el marcaje de estas proteínas en las muestras de médula espinal de cobayos con déficit de vitamina C. Por un lado, se observó un aumento de PDI casi exclusivamente en la sustancia blanca de la médula espinal, marcando intensamente algún tipo de proceso neuronales (flechas blancas) (Fig. 6-11. A, B). Por otro lado, Calnexina mostro un incremento principalmente en los cuerpos celulares (flecha blancas) de las neuronas de la médula espinal cervical (Fig. 6-11. D, E). Este aumento de marcaje en las muestras provenientes de cobayos con déficit de vitamina C, nos indican nuevamente una posible alteración reticular bajo estas condiciones, principalmente en ciertas zonas como la médula espinal.

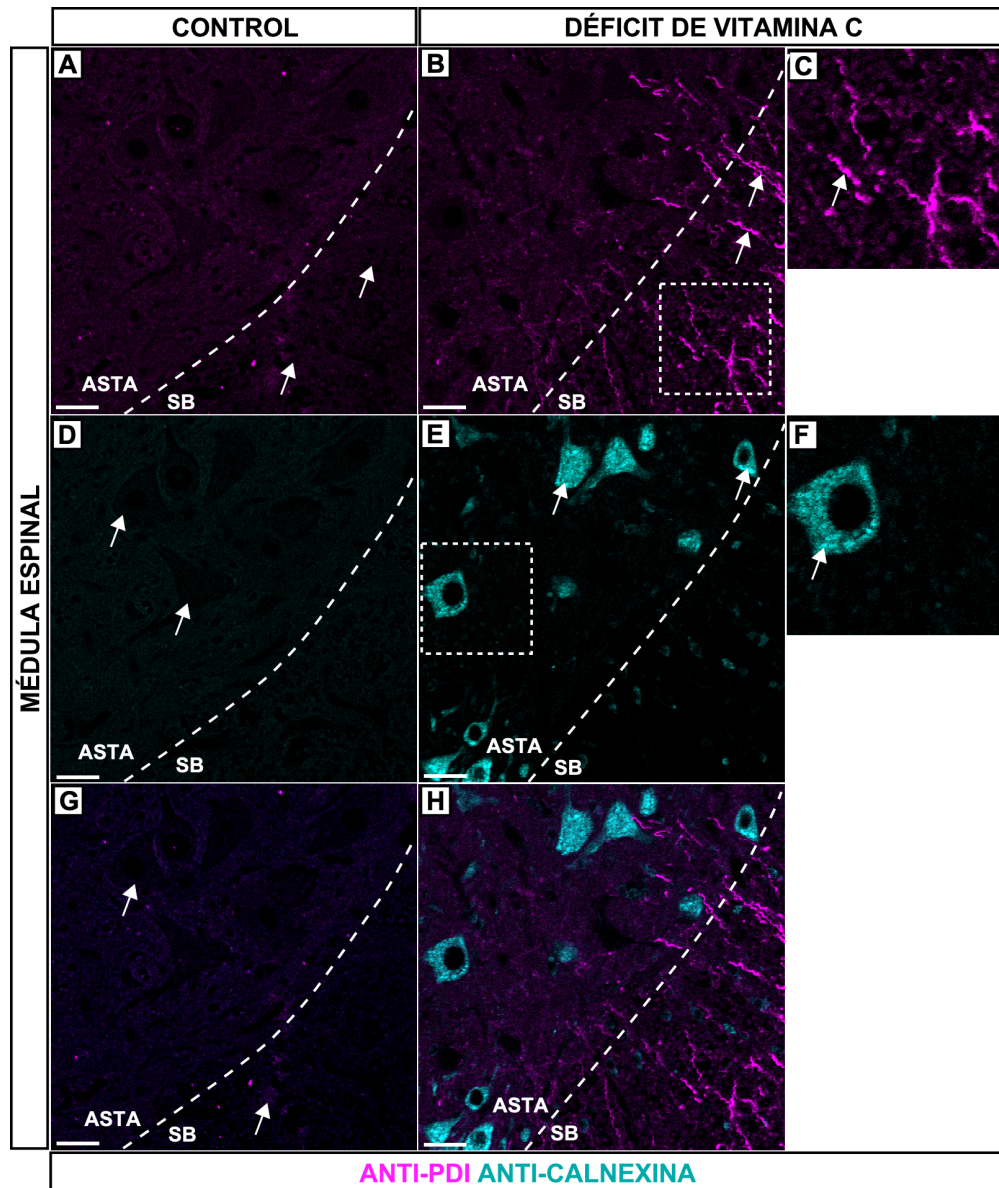


Figura 6-11. Análisis de inmunofluorescencia con PDI y Calnexina en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-PDI (1:200) (A, B) y anti-Calnexina (1:200) (D, E) para muestras de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C, así como también un merge de ambos anticuerpos (G, H). En los insertos se observa una amplificación de las proyecciones (C) y neuronas (F) con déficit de vitamina C (flechas blancas). Se evidencia un importante incremento de PDI, en los procesos neuronales, y Calnexina, en el cuerpo celular de las neuronas motoras, en los animales con déficit de vitamina C en comparación con las muestras control. ASTA: Asta anterior; SB: Sustancia Blanca. Barra de tamaño = 20 μ m.

6.4 Análisis de la activación astrocitaria

Los astrocitos representan la población predominante de células gliales en el SNC. Estas células, cuyos procesos le otorgan una forma estrellada, desempeñan un papel fundamental al proporcionar soporte estructural, metabólico y funcional a las neuronas, lo que las convierte en elementos esenciales para el correcto funcionamiento neuronal. En condiciones patológicas, los astrocitos adoptan un fenotipo reactivo denominado astrocitosis, el cual se caracteriza por un aumento de la expresión de la proteína GFAP y una hipertrofia tanto en el cuerpo celular como los procesos astrocitarios. La presencia de astrocitos reactivos en la corteza cerebral motora y en el asta anterior de la médula espinal es característica de la enfermedad de ELA.

A través de la técnica de inmunohistoquímica, se realizó un análisis utilizando el marcador astrocítico anti-GFAP en muestras de tejido de corteza cerebral (motora-profunda y externa) y tronco encefálico (Fig. 6-12), así como también en los segmentos cervicales, torácicos y lumbares de la médula espinal (Fig. 6-13) de cobayos control y con deficiencia de vitamina C, con fin de evaluar activación astrocítica.

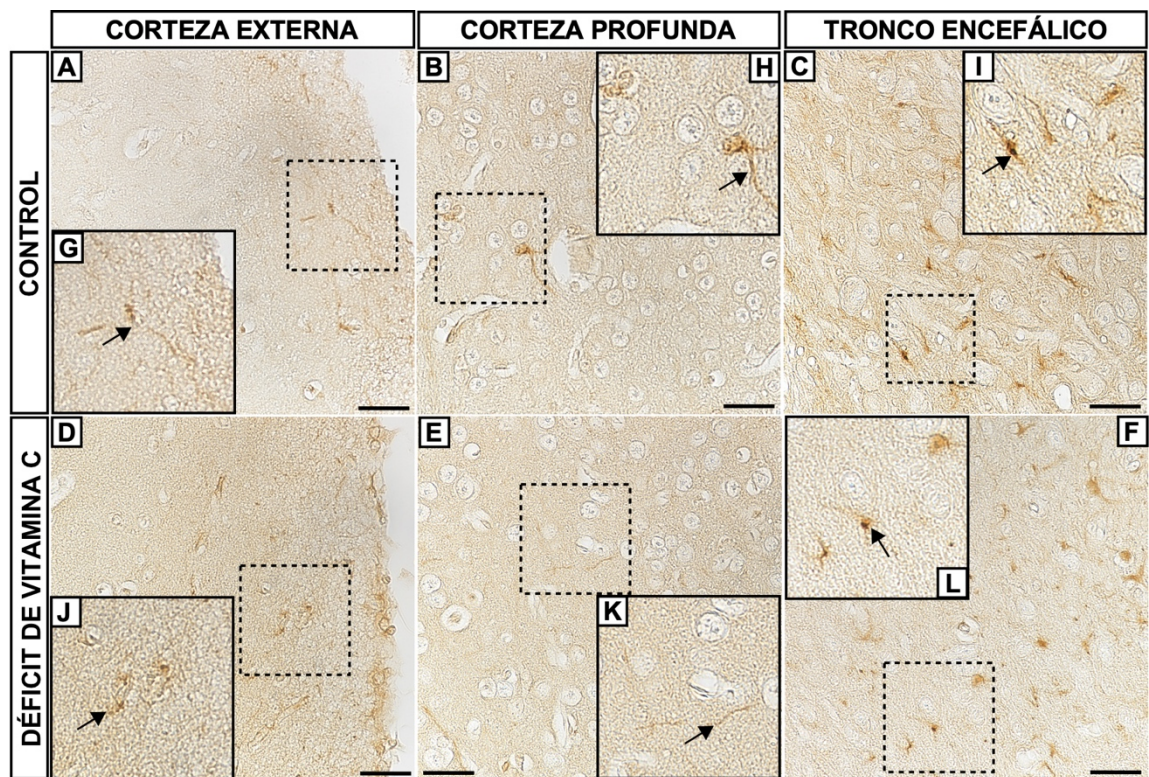


Figura 6-12. Análisis inmunohistoquímico con GFAP en corteza cerebral y tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-GFAP (1:200) para muestras de tejido de corteza cerebral externa (A, D), corteza profunda (B, E) y tronco encefálico (C, F) de cobayos con deficiencia de vitamina C. Los insertos (G, H, I, J, K, L) corresponden a una ampliación para observar el marcaje astrocitario (flechas negras). Tanto en corteza como tronco encefálico se evidencio mayor presencia de astrocitos en los animales con déficit de vitamina C. Barra de tamaño = 50 μ m.

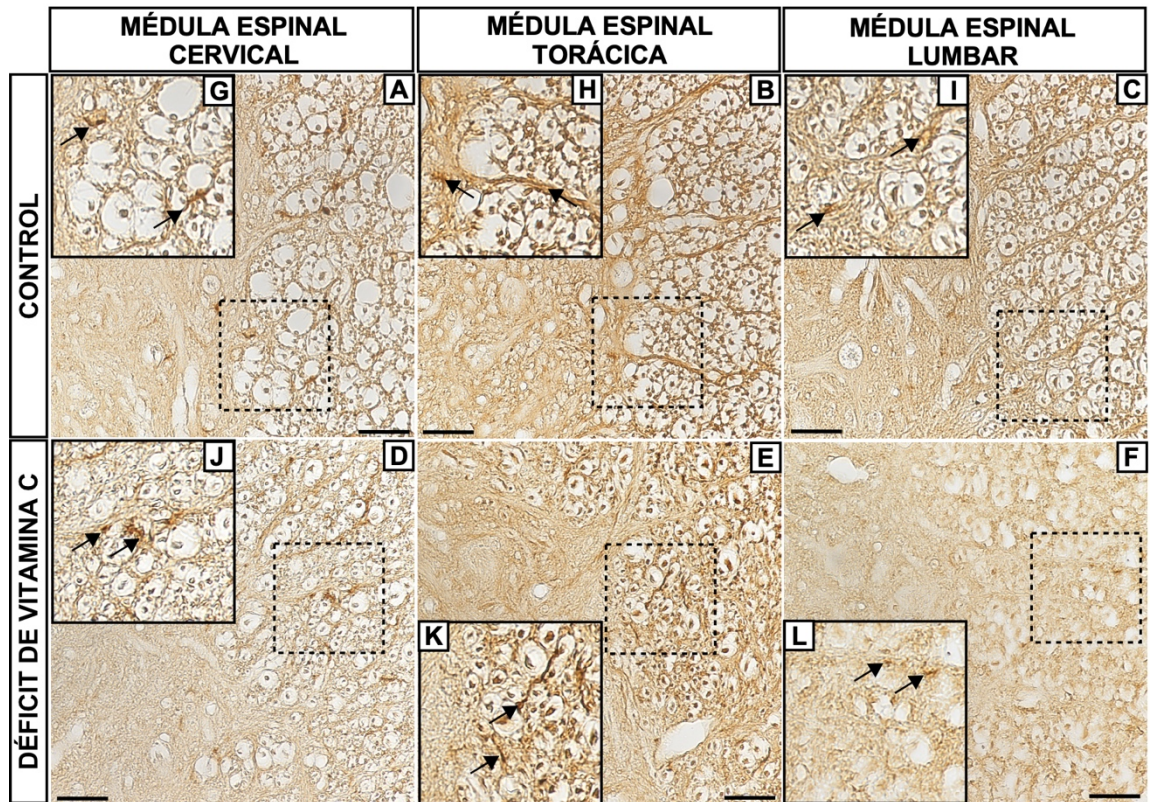


Figura 6-13. Análisis inmunohistoquímico con GFAP en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-GFAP (1:200) para muestras de tejido de los segmentos cervicales (A, D), torácicos (B, E) y lumbares (C, F) de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C. Los insertos (G, H, I, J, K, L) corresponden a una ampliación observar marcaje astrocitario (flechas negras). Se observa escaso contenido astrocítico alrededor de las neuronas motoras, sin embargo, se evidencia un mayor marcaje de astrocitos en la sustancia blanca de la médula espinal, el cual podría eventualmente estar incrementado en los animales con déficit de vitamina C. Barra de tamaño = 50 μ m.

El análisis inmunohistoquímico para GFAP reveló, en general, un escaso marcaje astrocítico. No obstante, se pudo observar la presencia de células astrocíticas (flechas negras) en nuestras áreas de estudio. En la capa más externa de la corteza cerebral se observó un ligero incremento en la densidad del marcado (Fig. 6-12, A, D), mientras que en la corteza profunda se visualizaron algunos procesos astrocíticos (Fig. 6-12. B, E). En el tronco encefálico, se observó mayor marcado astrocítico en comparación con la corteza, aunque no se detectaron cambios significativos entre las muestras de déficit de vitamina C y las muestras control (Fig. 6-12. C, F). En cuanto a la médula espinal, no se observó marcaje astrocítico cerca de las neuronas motoras, pero si se detectó el marcaje de algunos procesos y cuerpos de astrocitos en la sustancia blanca, lo cual pareció estar aumentado en las muestras con déficit de vitamina C (Fig. 6-12. A-F). Estos resultados sugieren una alteración astrocítica mínima, principalmente, en la corteza cerebral y la sustancia blanca de la médula espinal.

A continuación, se realizó un análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GFAP en tejidos de corteza cerebral (Fig. 6-14) y médula espinal (Fig. 6-15) de cobayos con deficiencia de vitamina C, con el fin de evaluar nuevamente el marcaje de GFAP a nivel cortical y medular.

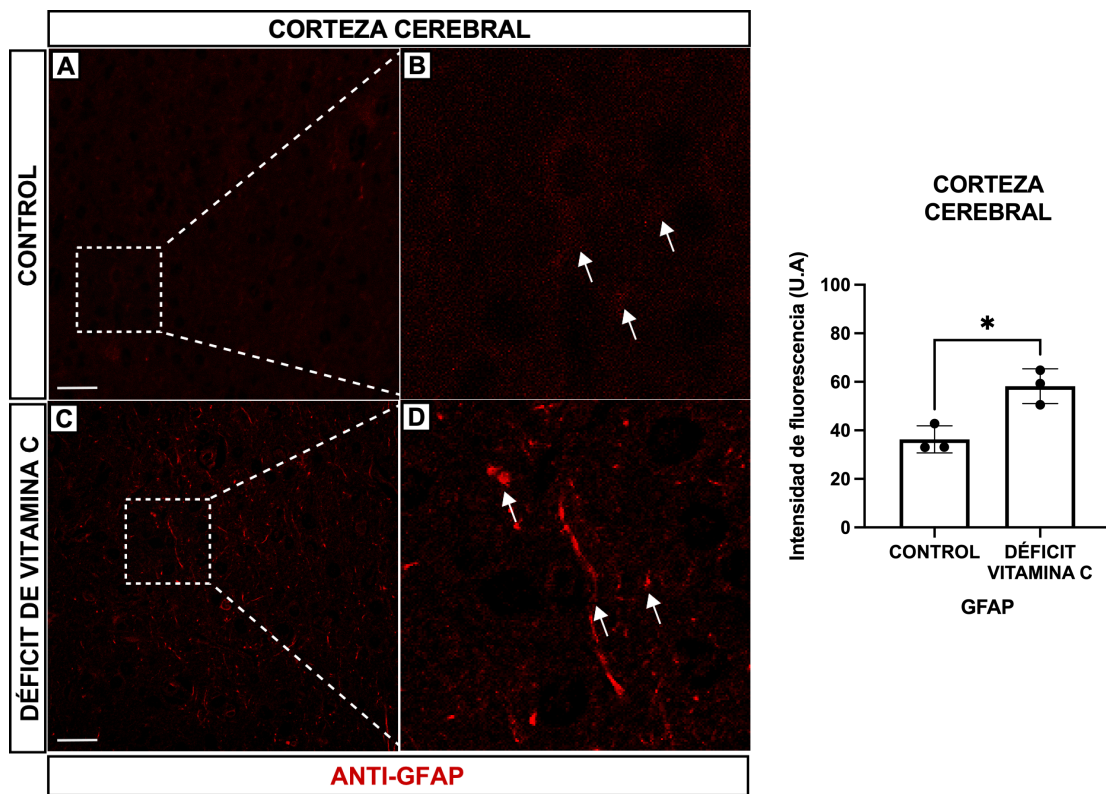


Figura 6-14. Análisis de inmunofluorescencia con GFAP en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GFAP (1:200) para muestras de corteza cerebral (A, C) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (B, D) se observan una amplificación del contenido astrocítico GFAP positivo (flechas blancas). Se observa un aumento de marcaje de astrocitos en corteza cerebral en las muestras de los animales con deficiencia de vitamina C. Esto fue corroborado a través de un análisis cuantitativo donde se midió la intensidad de fluorescencia. Estas mediciones revelaron un aumento significativo en las muestras provenientes de los cobayos con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un $n=3$ por condición. $*p<0,05$. Barra de tamaño = 20 μm .

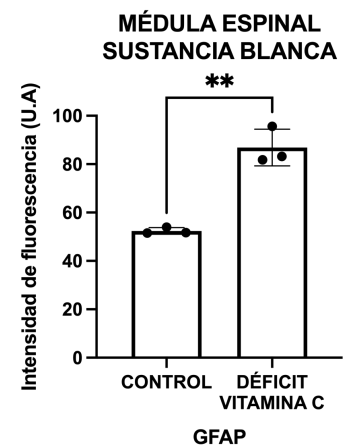
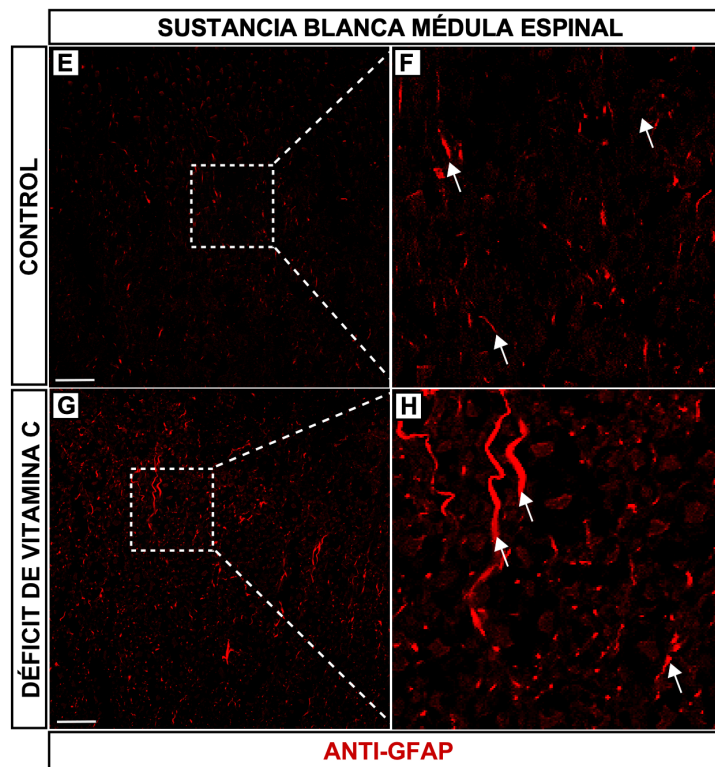
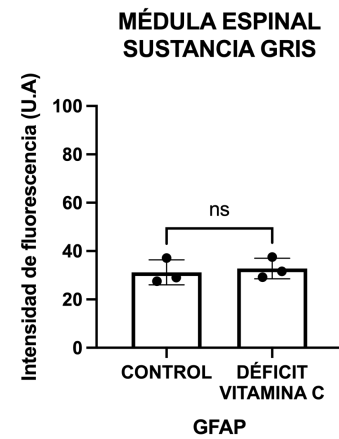
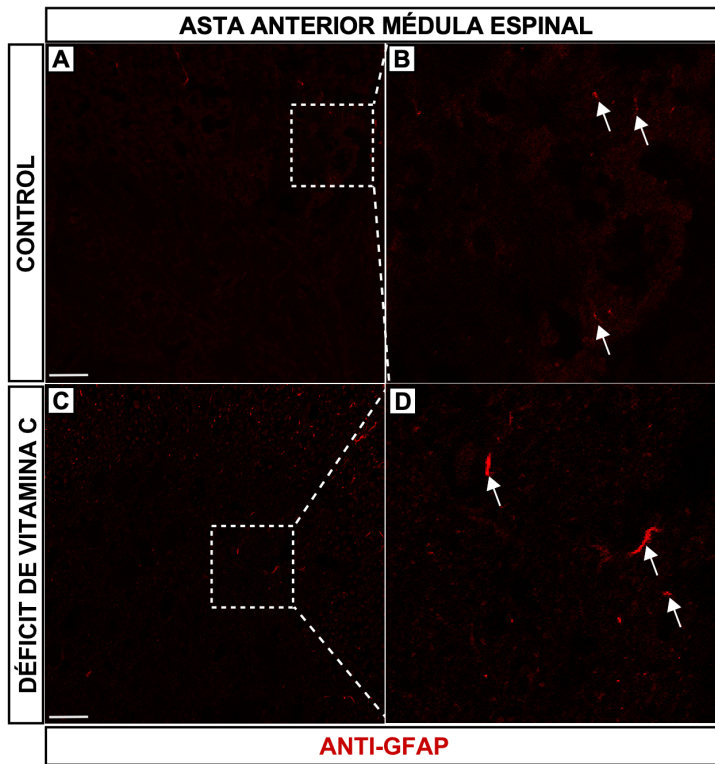


Figura 6-15. Análisis de inmunofluorescencia con GFAP en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GFAP (1:200) para muestras de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C. En este análisis se evaluó tanto la sustancia gris (A, C) como la sustancia blanca (E, G) de la médula espinal. En los insertos (B, D, F, H) se observa una amplificación del contenido astrocítico GFAP positivo (flechas blancas). Se observó un leve aumento en el marcaje de los astrocitos presentes en la sustancia gris de la médula, mientras que el aumento de marcaje astrocítico en la sustancia blanca fue más notorio. Esto fue corroborado a través de un análisis cuantitativo donde se midió la intensidad de fluorescencia. Estas mediciones revelaron que el leve aumento de GFAP observado en la sustancia gris de la médula no corresponde a un cambio significativo. Por otro lado, las mediciones el marcaje en la sustancia blanca revelaron un importante aumento de GFAP en los animales con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un n=3 por condición. **p<0,01; ns=no significativo. Barra de tamaño = 20 μ m.

El análisis de inmunofluorescencia reveló un incremento en el marcaje de GFAP (flechas blancas) tanto en la corteza cerebral como en la sustancia blanca de la médula espinal de las muestras de cobayos con deficiencia de vitamina C. Para cuantificar esta diferencia de marcaje se realizó una medición de la intensidad de fluorescencia de las muestras. Los resultados del análisis cuantitativo revelaron un aumento significativo en la corteza cerebral (Fig. 6-14 A, C) y, especialmente, sustancia blanca de la médula espinal (Fig. 6-15. E, G). No obstante, en la sustancia gris no se detectaron diferencias de marcaje relevantes en comparación con las muestras control (Fig. 6-15. A, C). Estos resultados corroboran las observaciones previamente obtenidas a través del análisis inmunohistoquímico.

Si bien en este análisis de inmunofluorescencia se evaluó principalmente la corteza cerebral y médula espinal, también se observaron alteraciones en la expresión de GFAP (flechas blancas) a nivel del tronco encefálico junto con el marcador Vimentina (Fig. 6-16). Este análisis reveló una fuerte reacción astrocítica para GFAP (Fig. 6-16. B, E) en las muestras de los animales con déficit de vitamina C, donde también se observaron astrocitos Vimentina positivos. Para corroborar estas observaciones se realizó una cuantificación de intensidad de fluorescencia. A partir de este análisis se determinó un incremento significativo en la expresión de GFAP, sugiriendo que en condición deficiente de vitamina C se estaría produciendo una astrocitosis en el tronco encefálico.

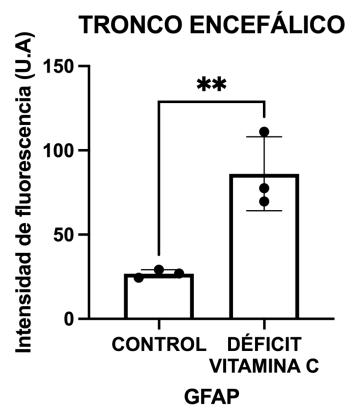
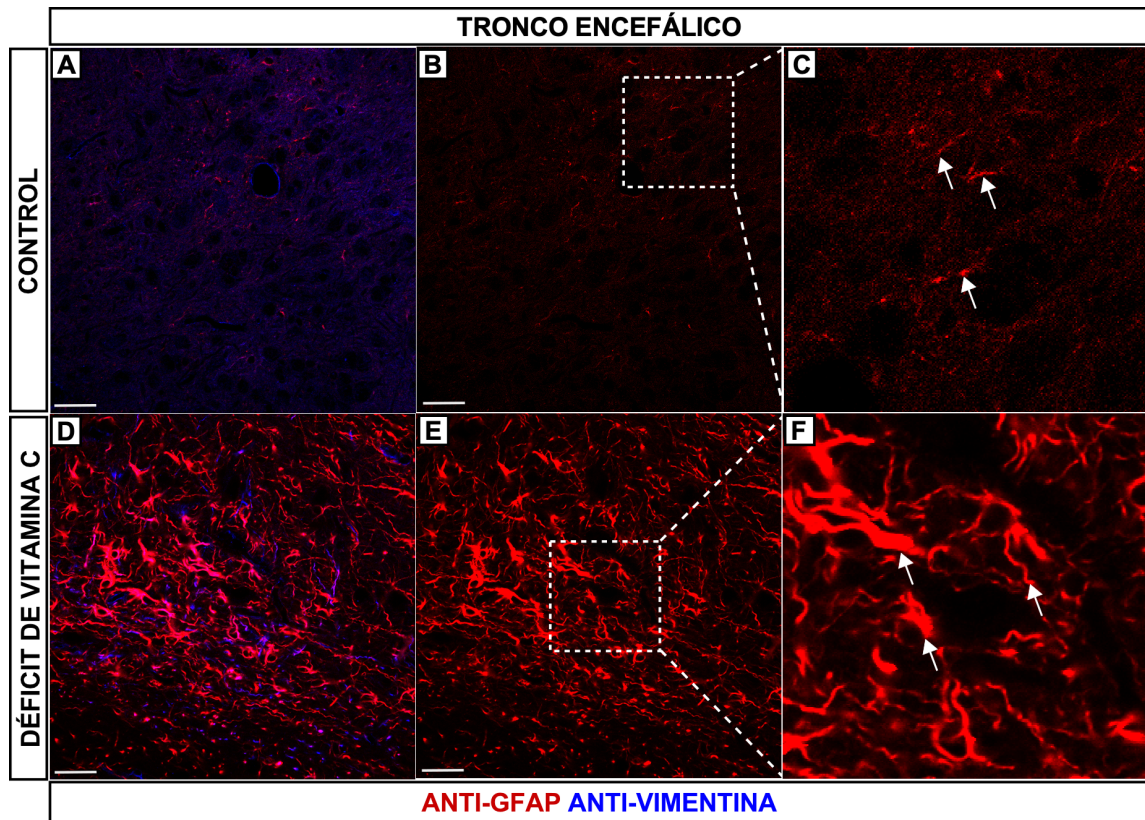


Figura 6-16. Análisis de inmunofluorescencia con GFAP y Vimentina en tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GFAP (1:200) y anti-Vimentina (1:400) para muestras de tronco encefálico (A, B, D, E) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (C, F) se observa una amplificación del contenido astrocítico GFAP positivo (flechas blancas). Se observó un importante incremento de GFAP, así como también Vimentina en las muestras de los animales con déficit de vitamina C en comparación a las muestras control, indicando una astrocitosis en esta zona. Esto fue corroborado a través de un análisis cuantitativo donde se midió la intensidad de fluorescencia. Estas mediciones revelaron un aumento significativo de GFAP en los animales con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un $n=3$ por condición. $**p<0,01$. Barra de tamaño = 20 μm .

6.5 Expresión de proteínas de muerte celular

La muerte celular programada es un proceso activo en organismos multicelulares, se produce con el fin de mantener la homeostasis del tejido y la eliminación de agentes patógenos que pudieran ser perjudiciales para el organismo. La apoptosis y la necroptosis son dos de los principales tipos de muerte celular programada. Estos procesos pueden ser desencadenados por múltiples estímulos como el daño y el estrés celular, así como ciertas condiciones fisiológicas y patológicas de la célula. Sus mecanismos se encuentran regulados por una serie de señales intracelulares y moleculares, lo que involucra múltiples proteínas que facilitan su estudio. Tanto la apoptosis como la necroptosis han sido asociadas a enfermedades neurodegenerativas que involucran la muerte neuronal selectiva, como el ELA.

En este contexto, se realizó un análisis para muestras de médula espinal de cobayos en déficit de vitamina C utilizando la técnica de inmunofluorescencia (Fig. 6-17). Este análisis se realizó utilizando los anticuerpos anti-Caspasa3 clivada, un marcador apoptótico, y anti-MLKL, un marcador de necroptosis, lo que nos permitió evaluar un posible incremento en la expresión de estas proteínas y la activación de las respectivas vías de muerte celular a nivel medular.

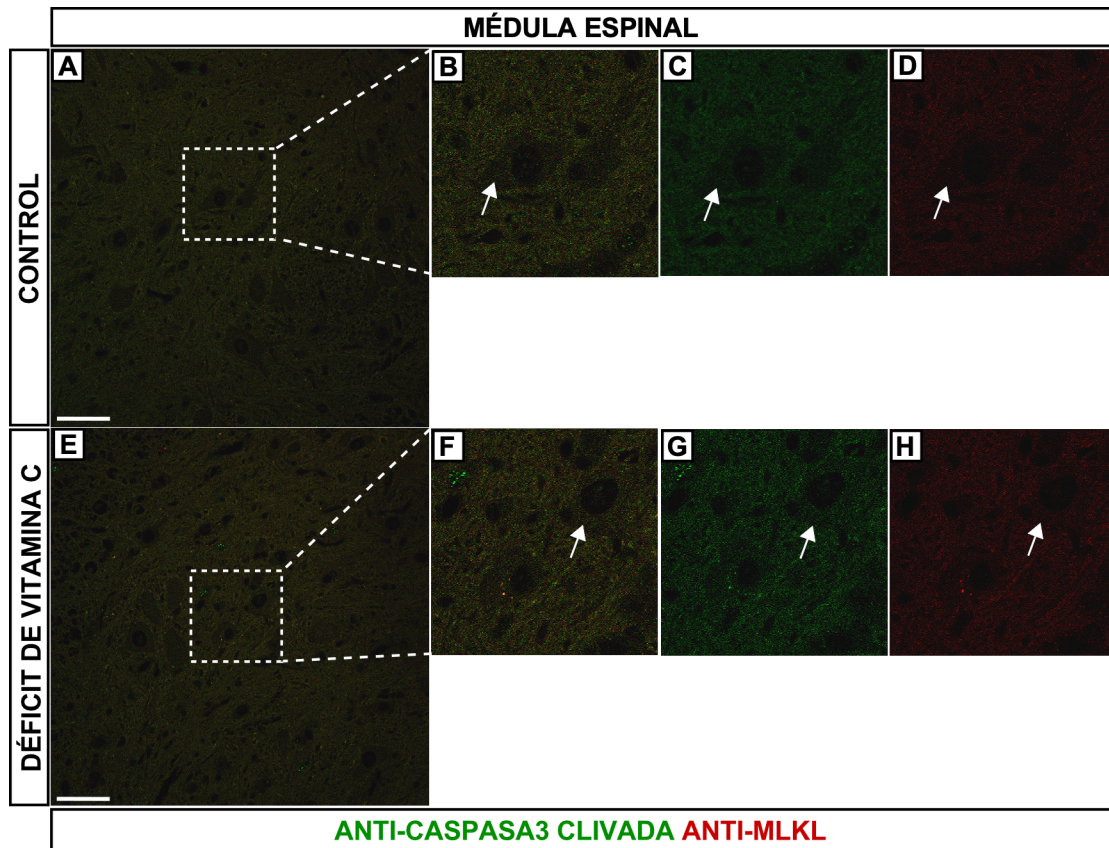


Figura 6-17. Análisis de inmunofluorescencia con Caspasa3 clivada y MLKL en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Caspasa3 clivada (1:50) (A) y anti-MLKL (1:200) (E) para muestras de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (B, C, D, F, G, H) se observa una amplificación de las neuronas motoras con sus respectivos anticuerpos (flechas blancas). Se observa escaso marcaje tanto de Caspasa3 clivada como MLKL, sin presentar diferencias en las muestras de los animales con déficit de vitamina C en comparación con las muestras control. Barra de tamaño = 20 μ m.

El análisis de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de proteínas asociadas a la muerte celular reveló escaso marcaje tanto de Caspasa3 clivada como MLKL en los tejidos (Fig. 6-17. C, D, G, H). Además, no se observaron diferencias significativas o alteraciones en el patrón de marcaje en las muestras de los animales con déficit de vitamina C en comparación con las muestras control. Estos resultados indican que posiblemente no se produzca la activación de la vía apoptótica o necroptótica en los cobayos con deficiencia de vitamina C.

6.6 Expresión de transportadores de vitamina C

En condiciones fisiológicas, el AA ingresa al SNC a través de los transportadores SVCT2 presentes en las células del plexo coroideo y es incorporado a las células neuronales, mientras que DHA ingresa a través de los transportadores GLUT1 y participa en el reciclamiento de AA en los astrocitos. La importancia de estos transportadores en el metabolismo del AA en el SNC nos llevó a evaluar la expresión de SVCT2 y GLUT1 en los cobayos con deficiencia de vitamina C.

En primer lugar, se realizó un análisis de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra el transportador SVCT2 y la vesícula sináptica 2 (SV2) en muestras de tejido de corteza cerebral (Fig. 6-18) y médula espinal (Fig. 6-19) de cobayos con deficiencia de vitamina C. Este análisis se realizó con el fin de evaluar una posible alteración en el marcaje del transportador SVCT2 en las neuronas y procesos neuronales en condiciones de deficiencia de vitamina C. Además, utilizamos el marcador SV2 para delimitar la membrana neuronal y sus procesos, lo que nos permitió examinar con mayor detalle la expresión del transportador bajo estas condiciones.

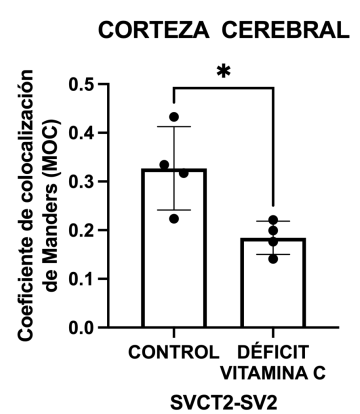
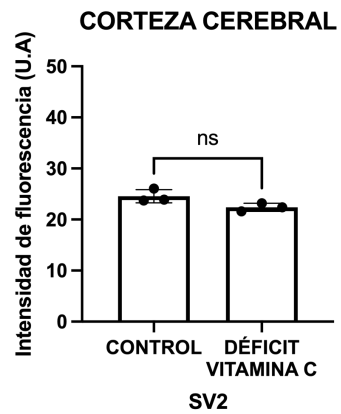
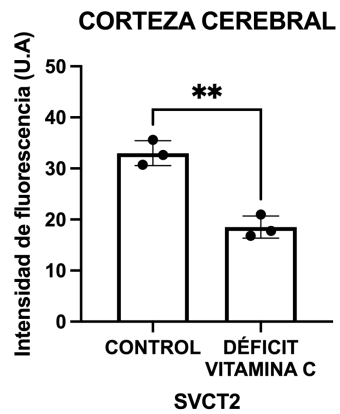
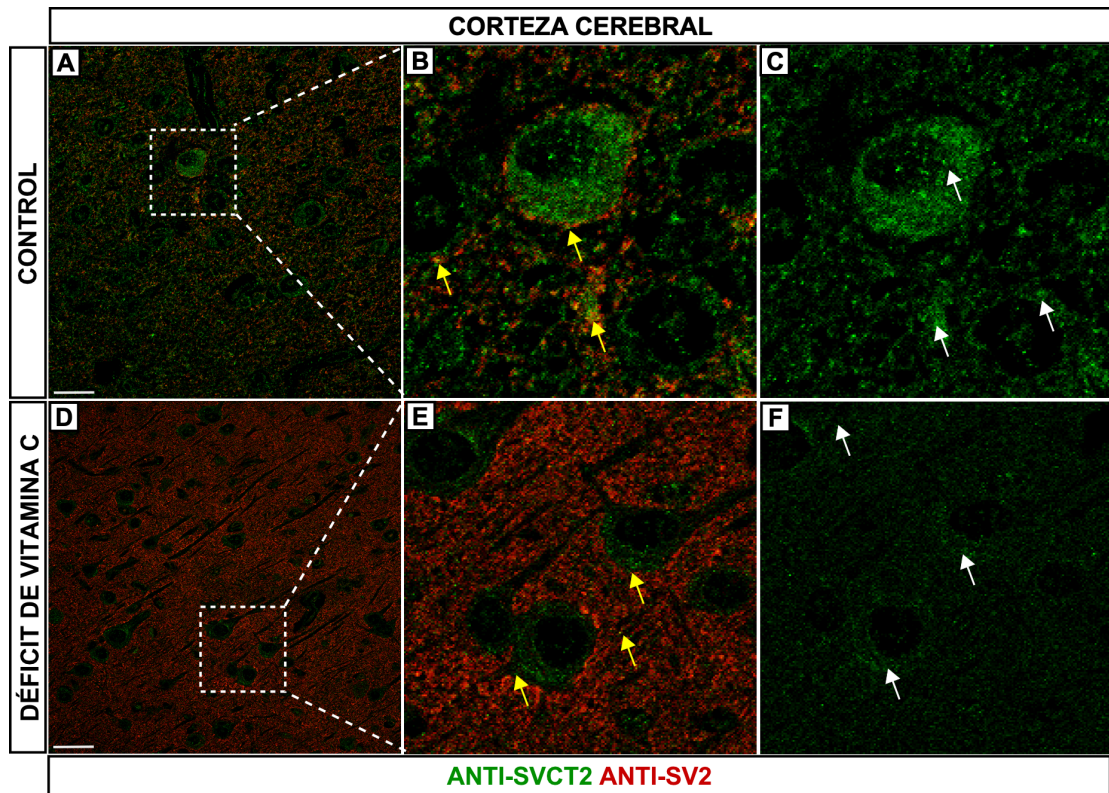


Figura 6-18. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 y SV2 en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 (1:50) y anti-SV2 (1:50) para muestras de corteza cerebral (A, D) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (C, F) se observa una amplificación de las neuronas positivas a SVCT2 (flechas blancas), cuyo marcaje disminuye en las muestras de los animales con deficiencia de vitamina C. Además, en los insertos (B, E) se observa una colocalización entre la expresión de SVCT2 y SV2 en los cuerpos y procesos neuronales (flechas amarillas), la cual se pierde en condición de deficiencia de vitamina C. Esto fue corroborado a través de un análisis cuantitativo donde se midió la intensidad de fluorescencia. Estas mediciones revelaron una disminución significativa en la expresión de SVCT2 en las muestras de cerebro de cobayos con déficit de vitamina C, mientras que SV2 se mantuvo constante. Además, también se realizó un análisis utilizando el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Este análisis reveló una importante colocalización de SVCT2 y SV2 en las muestras control, la cual se pierde en las muestras de los animales con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un n=3 por condición. *p<0,05; **p<0,01; ns=no significativo. Barra de tamaño = 20 μ m.

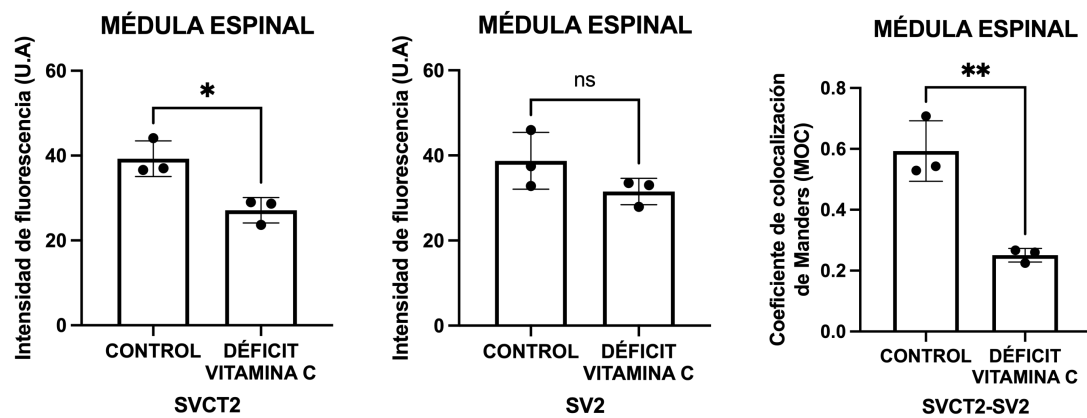
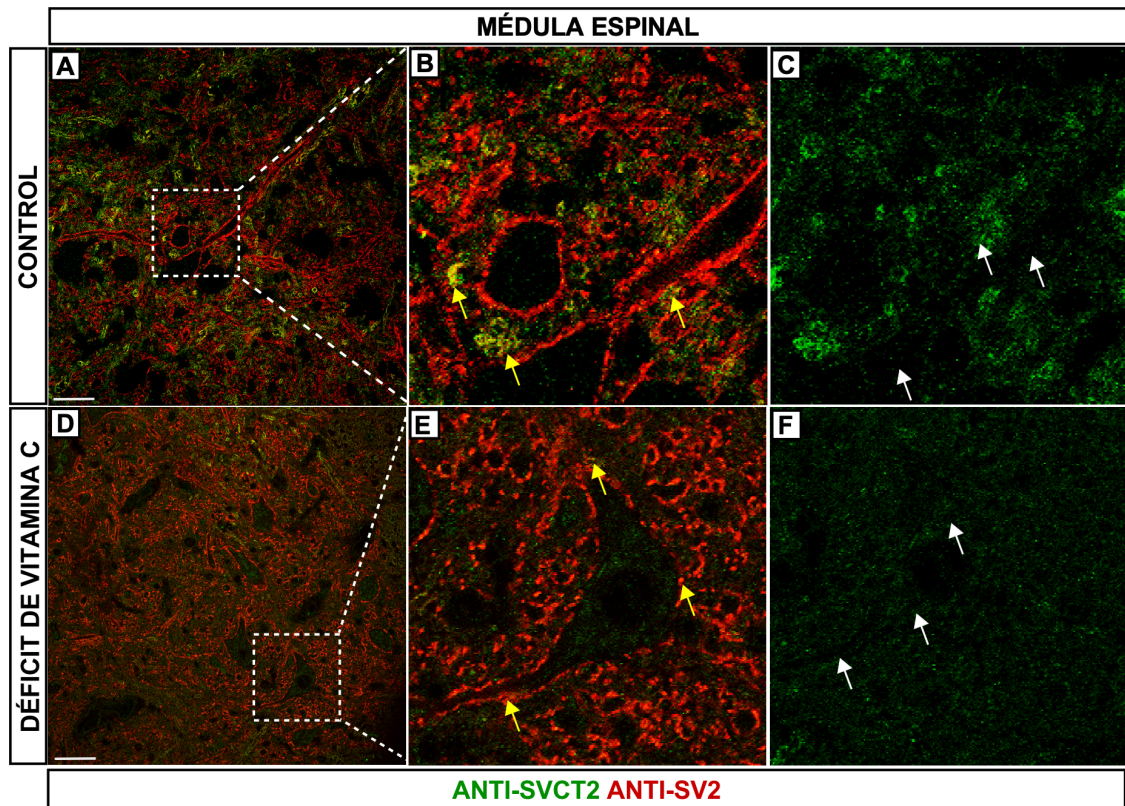


Figura 6-19. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 y SV2 en corteza cerebral de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 (1:50) y anti-SV2 (1:50) para muestras de médula espinal (A, D) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (C, F) se observa una amplificación de las neuronas positivas a SVCT2 (flechas blancas), cuyo marcaje disminuye en las muestras de los animales con deficiencia de vitamina C. Además, en los insertos (B, E) se observa una colocalización entre la expresión de SVCT2 y SV2 en los cuerpos y procesos neuronales (flechas amarillas), la cual se pierde en condición de deficiencia de vitamina C. Esto fue corroborado a través de un análisis cuantitativo donde se midió la intensidad de fluorescencia. Estas mediciones revelaron una disminución significativa en la expresión de SVCT2 en las muestras de médula espinal de cobayos con déficit de vitamina C, mientras que SV2 se mantuvo constante. Además, también se realizó un análisis utilizando el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Este análisis reveló una importante colocalización de SVCT2 y SV2 en las muestras control, la cual se pierde en las muestras de los animales con déficit de vitamina C. El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas con un $n=3$ por condición. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; ns=no significativo. Barra de tamaño = 20 μm .

El análisis de inmunofluorescencia reveló una importante disminución en el marcaje del transportador SVCT2 (flechas blancas) tanto en los somas y procesos neuronales presentes en las muestras de corteza cerebral (Fig. 6-18. C, F) y médula espinal (Fig. 6-19. C, F) de los animales con deficiencia de vitamina C. Por otro lado, la expresión del marcador SV2 se mantuvo constante en todas las muestras analizadas. Además, se observó una colocalización en el marcaje entre SVCT2 y SV2 (flechas amarillas), principalmente en los procesos neuronales tanto a nivel cortical (Fig. 6-18. B, E) como medular (Fig. 6-19. B, E) en las muestras control, sin embargo, esta colocalización se pierde en las muestras de los animales con deficiencia de vitamina C. Para precisar y cuantificar esta diferencia de marcaje, se procedió a realizar una medición de la intensidad de fluorescencia en las muestras, así como también un ensayo de colocalización. Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo indicaron una disminución significativa en la expresión de SVCT2 tanto en las muestras de corteza cerebral como médula espinal en los cobayos con déficit de vitamina C en comparación con las muestras control, sugiriendo una alteración en la expresión de SVCT2 en el SNC en condiciones de deficiencia de vitamina C. Adicionalmente, se observó el marcaje de SVCT2 en tronco encefálico (Fig. 6-20). En este análisis se evidencio, principalmente, un marcaje positivo para astrocitos reactivos (flechas blancas) en las muestras provenientes de animales con deficiencia de vitamina C, sugiriendo una fuerte reacción astrocítica en esta zona.

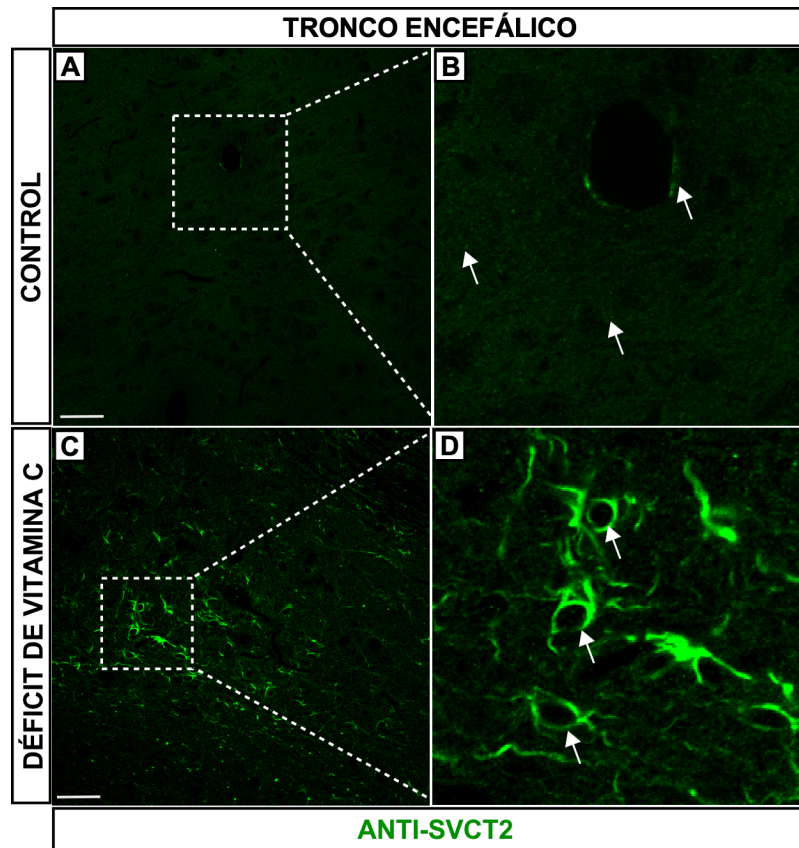


Figura 6-20. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 en tronco encefálico de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 (1:50) para muestras de tronco encefálico (A, B) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (B, D) se observa una amplificación de astrocitos positivos a SVCT2 (flechas blancas) presentes en los animales con deficiencia de vitamina C, sugiriendo una importante activación astrocítica en esta zona. Barra de tamaño = 20 μm .

En segundo lugar, se realizó un análisis de inmunofluorescencia para evaluar la expresión del transportador GLUT1. Este análisis se realizó utilizando el anticuerpo anti-GLUT1, junto con el anticuerpo anti-Vimentina, en muestras de tejido de médula espinal de cobayos con deficiencia de vitamina C (Fig. 6-21). El análisis de inmunofluorescencia reveló un importante marcaje de GLUT1 en células endoteliales (flechas blancas) presentes en vasos sanguíneos de mayor y menor calibre, sin embargo, no se observaron cambios o alteraciones en la expresión de este transportador en condiciones de deficiencia de vitamina C en comparación con las muestras control.

Adicionalmente, se examinó el marcaje de SVCT2 y Vimentina en estas muestras, donde se observó una marcada positividad de estos anticuerpos en las células endoteliales de vasos sanguíneos de mayor y mediano calibre, característica que también pudo ser evidenciada en muestras de corteza cerebral (Fig. 6-22). Este análisis reveló que, a diferencia de la expresión de Vimentina, el marcaje de SVCT2 se observaba principalmente en la cara luminal del vaso sanguíneo (flechas blancas). No se observaron alteraciones o cambios en la expresión de estos marcadores en los cobayos con deficiencia de vitamina C en comparación con las muestras control.

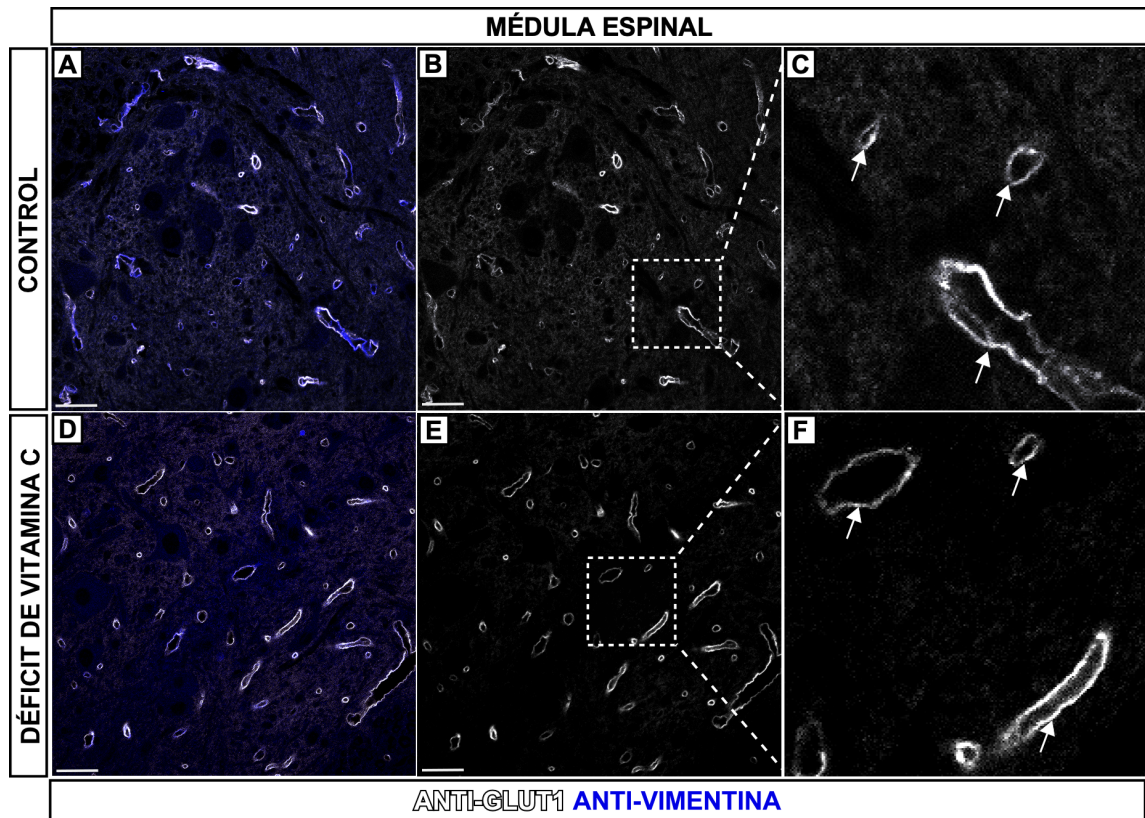


Figura 6-21. Análisis de inmunofluorescencia con GLUT1 en médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GLUT1 (1:200) y anti-Vimentina (1:400) para muestras de médula espinal (A, B, D, E) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (C, F) se observa una amplificación de los vasos sanguíneos positivos a GLUT1 (flechas blancas). Se observó un importante marcaje para GLUT1 en vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre, sin cambio aparente en las muestras los animales con déficit de vitamina C en comparación con las muestras control. Barra de tamaño = 20 μ m.

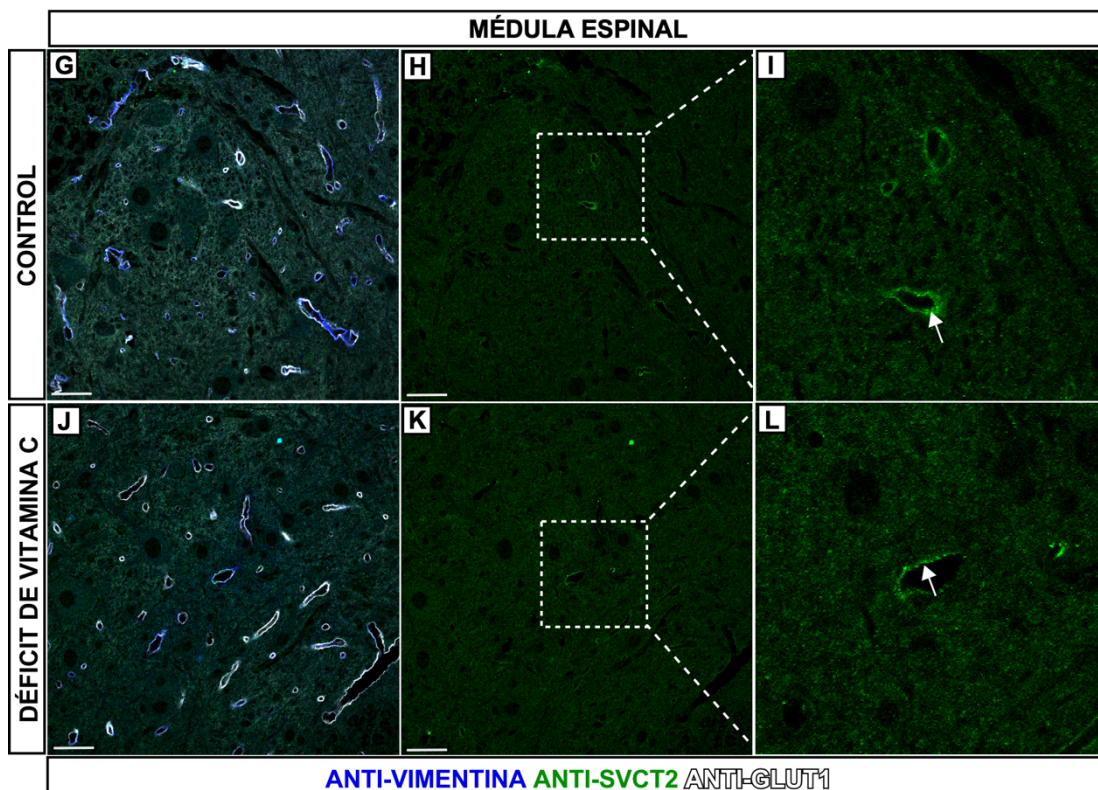
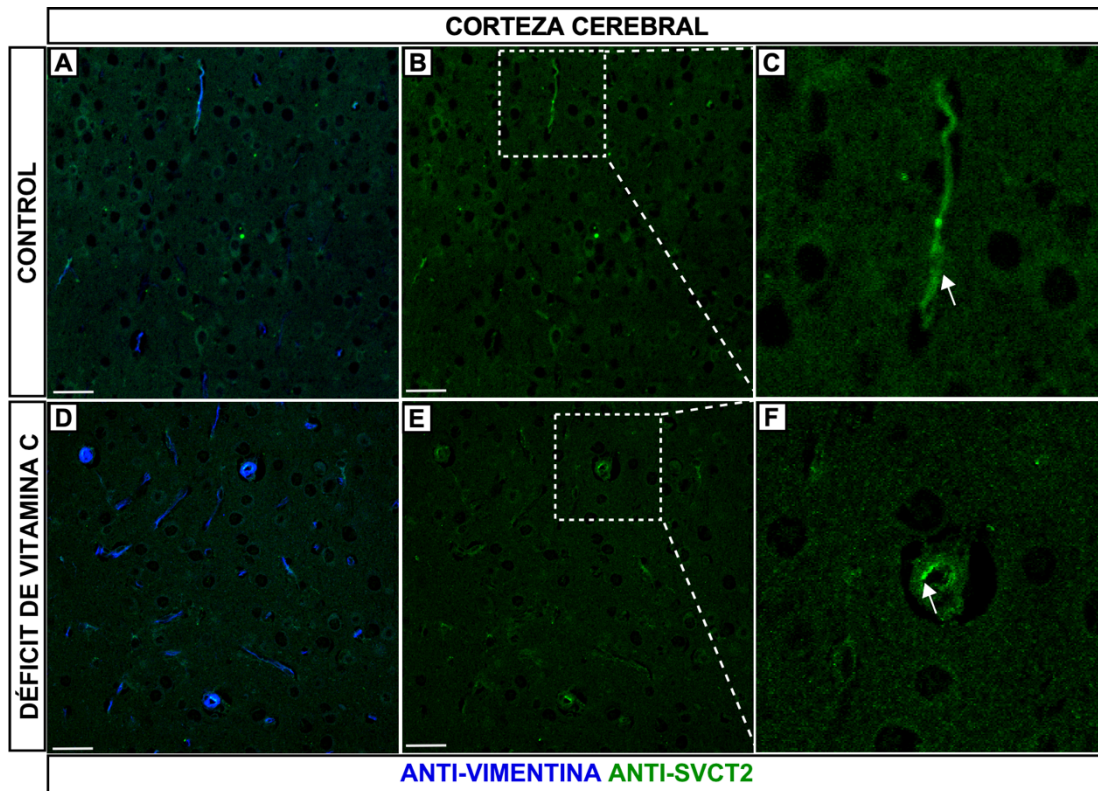


Figura 6-22. Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 y Vimentina en corteza cerebral y médula espinal de cobayos deficientes en vitamina C. Análisis con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Vimentina (1:400) y anti-SVCT2 (1:50) para muestras de corteza cerebral (A, B, D, E) y médula espinal (G, H, J, K) de cobayos con deficiencia de vitamina C. En los insertos (C, F, I, L) se observa una amplificación de los vasos sanguíneos SVCT2 positivos (flechas blancas). A diferencia del marcaje de Vimentina, la expresión del transportador SVCT2 se observa principalmente en el lumen del vaso. No se observan cambios o alteraciones en las muestras de los animales con deficiencia de vitamina C en comparación con las muestras control. Barra de tamaño = 20 μm .

7. DISCUSIÓN

En esta tesis se evaluaron características morfológicas y moleculares de cobayos con deficiencia de vitamina C como un posible modelo para el estudio de ELA. Contrario a lo esperado, no se evidenció degeneración neuronal en los animales con déficit de vitamina C; sin embargo, si se observaron alteraciones en la organización de los procesos neuronales corticales, una activación astrocítica principalmente en el tronco encefálico y alteraciones subcelulares relacionadas al RE de las neuronas. Además, se observó una disminución del transportador de vitamina C SVCT2 tanto en el soma de las neuronas como en los procesos neuronales en condiciones de deficiencia de vitamina C.

7.1 Alteración en la vía motora corticobulbar y corticoespinal de cobayos con deficiencia de vitamina C

Nuestro trabajo inició a partir de los análisis histológicos de Hematoxilina-Cromotrope y tinción de Nissl que buscaban indicios de degeneración neuronal. Sin embargo, los análisis morfológicos que se realizaron utilizando estas tinciones nos indicaron que, en los cobayos con déficit de vitamina C, no se produce muerte neuronal. La tinción de Hematoxilina y Cromotrope nos sugirió que las neuronas corticales y medulares presentaban una morfología normal. De

igual manera, la tinción de Nissl no presento alteraciones morfológicas que indicaran neurodegeneración, aunque si se observaron algunas características diferentes, como un aumento en la tinción de las sustancias de Nissl y una distribución particular de estas en las neuronas del tronco encefálico y la médula espinal lumbar, esto será analizado más adelante. En este contexto, los resultados obtenidos contradicen nuestra hipótesis inicial que planteaba que el cobayo con deficiencia de vitamina C podría reproducir las características morfológicas que se observan en ELA, donde la degeneración de las neuronas de las vías corticobulbares y corticoespinales son una característica clave en la enfermedad.

Asimismo, los resultados obtenidos en el análisis de inmunofluorescencia utilizando los marcadores de apoptosis y necroptosis, caspasa-3 clivada y MLKL, sugieren que no se produce la activación de ninguna de estas vías de muerte celular en deficiencia de vitamina C. En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (datos por publicar), se ha evaluado la activación de la vía necroptótica estudiando la expresión de MLKL y RIPK1 en tejido de médula espinal de ratones transgénicos G93A. Estos análisis revelaron un aumento significativo de la proteína RIPK1 y un leve aumento de MLKL a los 90 días, lo cual coincide con el inicio de la patología. Estos resultados sugieren la activación de vías de muerte celular necroptótica en el modelo de ELA, lo cual difiere con los resultados obtenidos en el cobayo con déficit de vitamina C.

Como mencionamos previamente, nuestros resultados sugieren que, bajo las condiciones de déficit de vitamina C, no se produce neurodegeneración. En este sentido, nuestros hallazgos también difieren de las observaciones descritas por den Hartog Jager y colaboradores en 1985. En ese estudio, se reportaron indicios de pérdida y degeneración de neuronas en el asta anterior de la médula espinal y desmielinización en el tracto piramidal de cobayos con escorbuto (den Hartog Jager, 1985). Oriá y colaboradores, en 2003, retomaron este modelo de cobayos deficientes en vitamina C, basándose en la investigación de den Hartog Jager. Su estudio se centró en evaluar la atrofia muscular y desmielinización reportada anteriormente. Los resultados de esta investigación revelaron una reducción significativa del cuerpo celular y la presencia de inclusiones hialinas en las neuronas motoras de la médula espinal en cobayos con escorbuto; sin embargo, el tracto piramidal se reportó intacto. Además, mencionaron la evaluación de otras regiones del SNC, como la corteza cerebral, donde no se observaron diferencias significativas, sugiriendo que las alteraciones debido a la deficiencia de vitamina C se restringen principalmente a la médula espinal. Si bien en este estudio identificaron algunos cambios asociados al escorbuto, refutaron lo descrito por den Hartog Jager, quien relacionaba el escorbuto a una afección de la neurona motora (Oriá *et al.*, 2003).

Es importante considerar que, si bien en nuestro estudio no fue posible observar la muerte de las neuronas motoras, esto no quiere decir que no puedan verse afectadas funcionalmente por una deficiencia de vitamina C (Fig. 7-1).

Nuestros análisis se realizaron utilizando tejidos de cobayos, los cuales fueron sometidos a una dieta carente de vitamina C por 2 a 3 semanas. Se ha evidenciado que, durante este periodo de tiempo, se produce una disminución importante en los niveles de vitamina C en el LCR. Jara y colaboradores, utilizando cromatografía líquida de alta resolución, determinaron que después de 3 semanas con una dieta carente de vitamina C, los niveles de esta vitamina en el LCR de los cobayos control eran de 105 μM , mientras que los cobayos en deficiencia presentaban 13 μM (Jara *et al.*, 2021). Estos resultados reflejan la rapidez con la que se manifiesta el efecto severo de la deficiencia de vitamina C en los cobayos, lo cual, además, conduce a la muerte del animal en solo 3 a 4 semanas, después de iniciar la dieta carente en esta vitamina.

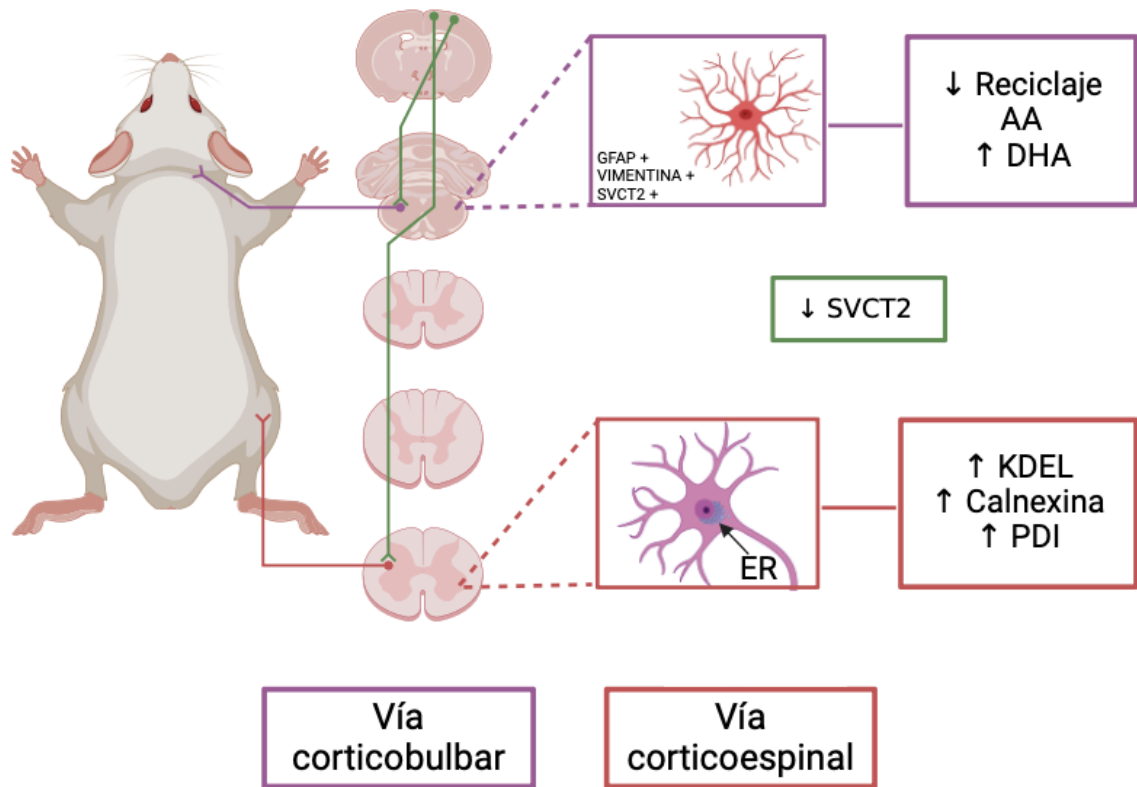


Figura 7-1. Alteraciones en las vías corticoespinales y corticobulbares en cobayos con deficiencia de vitamina C. En esta figura se señalan las principales alteraciones descritas en nuestro estudio, incluyendo una fuerte astrocitosis en el tronco encefálico, una disminución en la expresión de SVCT2 tanto a nivel cortical como medular, y la alteración observada en el RE. Esquema creado en BioRender.com.

En nuestro estudio, no se llevaron a cabo mediciones de los niveles séricos de vitamina C. En su lugar, se determinó el impacto de la dieta deficiente de esta vitamina en los cobayos a través de su comportamiento y los signos de enfermedad (previamente observados en nuestro laboratorio). En estos animales, luego de 2 a 3 semanas, es posible observar signos de escorbuto, los cuales consisten principalmente en una movilidad reducida del animal, pérdida de peso y apetito, y cambios o caída de su pelaje. Sugiriendo que si bien, no hay pérdida neuronal aparente, si es posible que exista una eventual alteración en la función de las neuronas que se traduce en alteraciones en la homeostasis del organismo, principalmente considerando la innervación de ciertos músculos asociados a la masticación, la respiración y el movimiento del animal. Como veremos mas adelante, si bien estas alteraciones no describen la enfermedad de ELA, si es posible observar una alteración principalmente en el tronco encefálico, abriendo la posibilidad que este cuadro pueda eventualmente asociarse a una afección motora relacionada principalmente a esta zona, como la parálisis bulbar progresiva.

7.2 Alteraciones celulares en deficiencia de vitamina C

7.2.1 Procesos neuronales

Luego de evaluar la morfología de las neuronas motoras a través de tinciones histológicas, las muestras fueron analizadas a través de técnicas inmunohistoquímicas, donde pudimos examinar otros aspectos como los vasos

sanguíneos y procesos neuronales a nivel cerebral y medular. Para ello, utilizamos anticuerpos específicos, incluyendo NeuN, Vimentina, MAP2 y P220. Sin embargo, el marcador nuclear NeuN mostro un marcaje en células oligodendrocíticas en lugar de los núcleos celulares, por lo que estos resultados no fueron considerados en esta tesis. Respecto al análisis con Vimentina, no se observaron alteraciones en los vasos sanguíneos en condiciones de deficiencia respecto a los controles. Además, los análisis con los marcadores citoesqueléticos, MAP2 y P220, presentaron una baja reactividad, por lo que se optó por utilizar otro anticuerpo, Tubulina β III (TUJ1), para evaluar los procesos neuronales. Este marcador de citoesqueleto ya había sido utilizando en nuestro laboratorio en muestras de cobayo, por lo que su análisis resultó satisfactorio y fue posible observar cambios, principalmente en relación a la organización de los procesos neuronales de la corteza cerebral. Para el análisis con este marcador se utilizaron las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con una posterior reconstrucción 3D del tejido neuronal. Los resultados obtenidos mostraron una desorganización, o bien, una pérdida en la organización perpendicular de las neuronas y procesos neuronales observada en las muestras de corteza control.

En el SNC, las neuronas transmiten y procesan señales mediante mecanismos sinápticos que involucran la generación de ROS. Aunque se ha determinado que ROS es esencial en la señalización intracelular relacionada a la plasticidad

neuronal, una acumulación de ROS en el cerebro puede provocar estrés oxidativo, el cual es dañino para las neuronas (Beckhauser *et al.*, 2016). Las neuronas exhiben una marcada polarización celular, caracterizada por la presencia de un único axón y múltiples dendritas que facilitan la transmisión de información y comunicación con otras neuronas y células gliales (Barnes y Polleux, 2009). Esta morfología distintiva está íntimamente relacionada con la dinámica de los microfilamentos de actina, microtúbulos y neurofilamentos, los cuales son particularmente susceptibles a la oxidación (Wilson y González-Billault, 2015). En este sentido, el exceso de ROS puede influir en el citoesqueleto neuronal de forma directa mediante la modificación redox de proteínas estructurales o de manera indirecta al alterar proteínas o vías de señalización que regulan su dinámica (Oswald *et al.*, 2018). En 2015, Huang y colaboradores evaluaron los cambios en la arbolización dendrítica de las neuronas hipocámpales, las cuales son particularmente sensibles a fluctuaciones del equilibrio redox cerebral. En estas neuronas un aumento del estrés oxidativo o un desequilibrio en el nivel de oxidación a nivel cerebral se vio reflejado en la perturbación tanto de la estructura como la complejidad celular de las dendritas del hipocampo (Huang *et al.*, 2015).

Es importante señalar que, en condiciones fisiológicas, el ROS no alcanza concentraciones dañinas para las neuronas, ya que el organismo posee mecanismos antioxidantes que proporcionan un equilibrio entre la generación y

eliminación del ROS, evitando su acumulación o exceso (Bardaweel *et al.*, 2018). Sin embargo, como ya se mencionó, uno de los mecanismos antioxidantes más relevantes que posee el SNC es el AA. En este sentido, una deficiencia de vitamina C podría producir un eventual incremento de ROS producto del desequilibrio redox causado por la disminución de AA. A su vez, el aumento de ROS extracelular podría producir la oxidación del AA remanente a DHA, el cual presenta propiedades tóxicas para las neuronas (García-Krauss *et al.*, 2016). En 2020, Espinoza y colaboradores describieron que el crecimiento de neuritas se veía afectado por una acumulación de DHA y un ambiente oxidativo (Espinoza *et al.*, 2020). Estas observaciones sugieren un efecto negativo producto del incremento de DHA sobre el citoesqueleto, el cual se ha asociado a modificaciones de proteínas, como el aumento de carboximetil-lisina (CML) y la producción de AGEs (proteínas de glicación avanzada) (Scheffler *et al.*, 2018).

Nuestros hallazgos sugieren que esta disminución de AA en cobayos produce un eventual aumento de ROS y DHA, el cual afecta negativamente a la distribución de las neuronas de la corteza cerebral, induciendo una pérdida de organización dendrítica y axonal.

7.2.2 Astrocitosis reactiva

Otra alteración celular que fue posible observar en condiciones de deficiencia de vitamina C fue la activación astrocítica. Como ya fue mencionado, la activación de los astrocitos alrededor de las neuronas superiores e inferiores, así como también en las fibras descendentes de los tractos corticoespinales, es una de las principales características observadas en procesos neurodegenerativos en el SNC (Pehar *et al.*, 2017).

Siguiendo la comparación entre el cobayo con deficiencia de vitamina C y modelos de estudio ELA, la literatura señala que una de las características más destacadas de ELA es la activación astrocítica en la sustancia gris o las astas de la médula espinal (Schiffer *et al.*, 1996; Yamanaka y Komine, 2018). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (datos por publicar), han evidenciado el desarrollo de astrocitosis en la médula espinal de ratones transgénicos G93A. En estos ratones, la astrocitosis se manifiesta en las etapas iniciales de la enfermedad, una vez que ya se observan neuronas en degeneración. Sin embargo, una vez más, los resultados obtenidos en el presente análisis no coincidieron con las expectativas previas. Nuestros resultados indican que, si bien en corteza cerebral y médula espinal fue posible observar una reacción astrocítica, el aumento significativo más relevante se encontró en el tronco encefálico. En esta zona, se observó la presencia de astrocitos GFAP, Vimentina y SVCT2 positivos, lo que sugiere una activación astrocítica importante. A

diferencia de las neuronas, la mayoría de los astrocitos no expresan el transportador SVCT2, lo que impide la captación de AA (Nualart *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha constatado que, en condiciones patológicas, el ARNm del transportador SVCT2 se induce en los astrocitos de ciertas áreas del parénquima cerebral, presentando astrocitos reactivos que expresan SVCT2 (Salazar *et al.*, 2017).

La vitamina C desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis redox en el cerebro. Una deficiencia de AA podría comprometer la función antioxidante que protege a las neuronas debido a una menor captación de la vitamina por parte de estas (Nualart *et al.*, 2014). Una disminución de AA podría, eventualmente, producir un incremento de ROS extracelular y la oxidación de AA a DHA. Tanto las neuronas como los astrocitos expresan los transportadores GLUT1 y GLUT3. Por lo tanto, en condiciones elevadas de DHA, este podría ingresar a las neuronas a través de los transportadores GLUT3, lo que potencialmente aumentaría el estrés oxidativo neuronal (Rumsey *et al.*, 1997; García-Krauss *et al.*, 2016). Para combatir esto, los astrocitos deberían incrementar el transporte de DHA, pero en el caso de algunos astrocitos de ELA, ellos aumentarían la expresión de SVCT2, probablemente disminuyendo el reciclamiento por tener un exceso de AA intracelular.

Estos hallazgos sugieren que el tronco encefálico es una de las zonas más afectadas por la deficiencia de vitamina C. Esto podría estar relacionado a las características de comportamiento y signos de enfermedad observados en los cobayos, donde se produce una disminución en la movilidad de los animales, entre otras características asociadas al decaimiento.

7.3 Alteraciones subcelulares en deficiencia de vitamina C

7.3.1 RE

La tinción histológica de Nissl proporcionó un primer indicio de una posible alteración reticular. Esta tinción es una de las más empleadas en el estudio de la morfología y patología neuronal, y se basa en la interacción de colorantes básicos, como el violeta de cresilo, con el ácido nucleico contenido en el ADN de los núcleos celulares, así como con el ARN, que se encuentra en altas concentraciones en el RE rugoso y los ribosomas o sustancias de Nissl presentes en el citoplasma de las neuronas (Kádár *et al.*, 2009). El análisis de la tinción de Nissl en tejido de corteza cerebral, tronco encefálico y médula espinal de cobayo deficiente en vitamina C no reveló indicios de una alteración morfológica neuronal de muerte celular. Sin embargo, se logró evidenciar un aumento en la tinción de las granulaciones o la sustancia de Nissl en el citoplasma y el RE adyacente al núcleo neuronal. Este incremento en la tinción nos llevó a considerar la posibilidad de alguna alteración a nivel reticular en los animales con déficit de vitamina C.

En este contexto, el siguiente paso consistió en utilizar un marcador reticular específico con las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Para ello, utilizamos el marcador anti-KDEL. KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) corresponde a una secuencia peptídica que se encuentra unida y sirve como una señal de retención para las proteínas residentes del RE. Es una de las primeras secuencias de retención reticular identificadas y se ha determinado que está presente en importantes proteínas chaperonas como Bip/GRP78, GRP94 y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Wires *et al.*, 2021). El análisis realizado con KDEL permitió observar y cuantificar un aumento significativo en la expresión de este marcador tanto en las neuronas de la corteza cerebral como del tronco encefálico y la médula espinal de los cobayos deficientes en vitamina C, especialmente en la sustancia de Nissl presente en estas neuronas.

El RE contiene proteínas chaperonas encargadas de la modificación postraducciona, el plegamiento y el control de calidad de proteínas recién sintetizadas. En condiciones de estrés, el RE toma distintas medidas para regresar a un estado fisiológico, como la regulación positiva en la transcripción coordinada de proteínas chaperonas y enzimas encargadas del plegamiento (Ma y Hendershot, 2004). Este aumento de proteínas chaperonas tiene como fin evitar la agregación de proteínas mal plegadas y promover su correcto plegamiento y ensamblaje (Ma y Hendershot, 2004). Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las proteínas chaperonas del RE presentan la secuencia KDEL. Por

lo tanto, un aumento en la expresión de KDEL sugiere un incremento en la actividad del RE en estas células, lo que puede ser indicativo de un estímulo fisiológico o patológico. Por un lado, este aumento podría atribuirse a un incremento en la síntesis proteica. Sin embargo, también podría ser una respuesta a una situación de estrés en el RE. En este contexto y como se mencionó previamente, una deficiencia de AA podría provocar un eventual aumento de ROS y DHA, el cual podría ser incorporado a las neuronas, generando un cuadro de estrés oxidativo que altera los distintos orgánulos presentes en ella, incluido el RE. Estudios sugieren que alteraciones crónicas en el retículo podría afectar su actividad y provocar una disminución en la síntesis de proteínas sinápticas (Woehlbier *et al.*, 2016). A su vez, esto podría conducir a un deterioro cognitivo y motor en el organismo, e incluso, en ciertas condiciones, eventualmente desencadenar una disfunción neuronal o muerte celular, como se observa en casos de ELA (Woehlbier *et al.*, 2016).

A continuación, para nuestro estudio, se llevó a cabo un análisis preliminar de inmunofluorescencia utilizando los marcadores anti-PDI y anti-Calnexina. Estas proteínas, residentes del retículo, son chaperonas que participan en el correcto plegamiento y el control de calidad de las proteínas sintetizadas en el RE (Wang *et al.*, 1998; Paskevicius *et al.*, 2023). Mediante el análisis de inmunofluorescencia se observó un importante incremento en la expresión de PDI en la sustancia blanca y de Calnexina en los cuerpos celulares de las

neuronas motoras en la médula espinal de los cobayos con deficiencia de vitamina C.

Se ha determinado que alteraciones en la función de la enzima PDI están presentes en varias patologías neurodegenerativas asociadas a la agregación proteica, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y el ELA (Andreu *et al.*, 2012). Las PDIs son una familia de proteínas plegadoras que tienen función como chaperonas en el RE, donde catalizan la formación, ruptura y reordenamiento de los enlaces disulfuro de proteínas recién sintetizadas, lo cual tiene consecuencias importantes en su estructura final y función biológica (Castillo *et al.*, 2015; Woehlbier *et al.*, 2016). Aunque PDI es considerada principalmente una proteína reticular, se ha descrito su ubicación en otras estructuras intracelulares como las mitocondrias, el núcleo y el citosol; sin embargo, esta localización varía según la célula y el contexto fisiopatológico (Laurindo *et al.*, 2012). Por otro lado, la Calnexina es una proteína integral de la membrana del RE que desempeña un papel crucial como chaperona en el plegamiento y control de calidad de las proteínas N-glicosiladas (Paskevicius *et al.*, 2023). Estudios han demostrado que niveles elevados de Calnexina están asociados al estrés del RE, activando un mecanismo de inducción de la vía apoptótica (Guérin *et al.*, 2008).

Nuestros hallazgos sugieren que una deficiencia de vitamina C produce una alteración en la homeostasis redox en el SNC, lo cual se ve reflejado, subcelularmente, en una alteración en el RE de las neuronas, ya sea por un incremento en la biosíntesis de proteínas o un estrés reticular, el cual de manera prolongada podría eventualmente producir una disminución en la síntesis de proteínas sinápticas y alterar la función neuronal.

7.3.2 Transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1

Finalmente, en nuestro estudio evaluamos la expresión de los transportadores de vitamina C, SVCT2 y GLUT1. En primer lugar, se evaluó la expresión del transportador SVCT2 en tejido de corteza cerebral y médula espinal de cobayos con déficit de vitamina C. Bajo estas condiciones, el análisis de inmunofluorescencia y posterior cuantificación reveló una significativa disminución en la expresión de SVCT2 en el soma y los procesos de las neuronas de la vía corticoespinal. Esta alteración fue más evidente a nivel cortical, mientras que, en la médula espinal, la expresión de SVCT2 fue relativamente escasa. Asimismo, también se identificó una colocalización entre SVCT2 y SV2 tanto en las muestras corticales como medulares.

El transportador SVCT2 desempeña un papel crucial en el transporte de vitamina C en el SNC. En condiciones fisiológicas, este transportador facilita la entrada de

AA al cerebro y su distribución hacia las neuronas. Sin embargo, en condiciones patológicas, como en el caso del ELA, donde se produce un aumento de estrés oxidativo y la generación de ROS, la protección antioxidante proporcionada por la vitamina C podría verse comprometida debido a una disminución en la captación de AA en las neuronas y un incremento de DHA extracelular. La expresión de SVCT2 ha sido previamente evaluada en nuestro laboratorio en ratones transgénicos G93A (por publicar). Estos resultados muestran una internalización y posterior disminución del transportador en las neuronas motoras de la médula espinal, en los ratones con ELA.

Nuestros resultados sugieren que esta disminución de SVCT2, producto de una disminución de AA, en el soma y procesos neuronales positivos a SV2 que participan en la innervación de las neuronas motoras del asta anterior podría eventualmente comprometer la totalidad de la estructural neuronal de la vía corticoespinal. Esta posible alteración en la innervación de las motoneuronas podría eventualmente estar relacionado a la pérdida de movilidad de los cobayos con deficiencia de vitamina C.

En segundo lugar, se evaluó la expresión del transportador GLUT1 a nivel medular en cobayos con deficiencia de vitamina C. Mediante análisis de inmunofluorescencia se observó un notable marcaje en vasos sanguíneos de

diversos calibres. Sin embargo, no se lograron observar diferencias en la expresión de este transportador entre las muestras de los animales con deficiencia de vitamina C y las muestras control. Este transportador ya había sido evaluado previamente en el laboratorio en cobayos deficiencias de vitamina C, sin embargo, este análisis solo fue a nivel cerebral. En dicho estudio, a través de un análisis de inmunofluorescencia, se evidencio un marcaje positivo para GLUT1 en la mayoría de los vasos sanguíneos, sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de estrés transportador entre los cobayos con déficit de vitamina C y los controles (Jara Mendoza, N. 2016). Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que, al igual que lo observado a nivel cerebral, no se producen alteraciones en la expresión del transportador GLUT1 frente a una deficiencia de vitamina C.

A continuación, se investigó la expresión del transportador SVCT2 en vasos sanguíneos presentes en corteza cerebral y médula espinal. Estos análisis de inmunofluorescencia se realizaron junto con el anticuerpo Vimentina. Se observó que la mayoría de los vasos sanguíneos de mediano y mayor calibre resultaron positivos a Vimentina, sin embargo, solo a algunos de ellos expresaron SVCT2. Además, fue posible observar que el marcaje de SVCT2 se localizaba principalmente en la cara luminal de estos vasos. No se observaron diferencias en la expresión de SVCT2 a nivel cortical o medular entre los animales con déficit de vitamina C y las muestras control. Estas observaciones habían sido descritas

previamente por un estudio realizado en nuestro laboratorio, donde se evaluó la expresión de SVCT2 en vasos sanguíneos de muestras de cobayos deficientes en vitamina C mediante análisis de inmunofluorescencia. Este estudio reveló que la expresión de SVCT2 en los vasos sanguíneos se produce de forma discontinua, principalmente en capilares sanguíneos (Vimentina negativas) y en arterias medianas (Vimentina positivas). Adicional a esto, este estudio realizó un análisis ultraestructural para los vasos sanguíneos donde se determinó que las células endoteliales positivas a SVCT2 también presentaban una compartimentalización del transportador (Jara Mendoza, N. 2016). Nuestros hallazgos sugieren que la expresión de SVCT2 en vasos sanguíneos a nivel medular podría seguir el patrón que fue observado anteriormente en cerebro de cobayo.

Nuestros hallazgos sugieren que, por un lado, el transportador GLUT1 no se muestra alterado bajo una deficiencia de AA; sin embargo, por otro lado, el transportador SVCT2 disminuye significativamente bajo estas condiciones. La disminución de SVCT2 podría eventualmente referir a un proceso adaptativo a esta deficiencia de vitamina C, sin embargo, desconocemos los mecanismos asociados a este proceso.

8. CONCLUSIONES

- 1) El cobayo con deficiencia de vitamina C no puede ser utilizado como un modelo de estudio de ELA.
- 2) La deficiencia de vitamina C no produce neurodegeneración en las vías corticobulbares y corticoespinales; sin embargo, si se observa una importante activación astrocitaria a nivel del tronco encefálico, sugiriendo que esta zona probablemente se ve más afectada por el déficit de AA. Esta astrocitosis, acompañada de un incremento de SVCT2 en los astrocitos, sugiere una alteración en el reciclaje de AA, lo cual a su vez podría estar causando un eventual aumento de DHA.
- 3) Subcelularmente, la deficiencia de AA pareciera alterar el funcionamiento del RE, sugiriendo un aumento o dilatación de este organelo. También se observó el incremento en la expresión de ciertas proteínas como PDI y Calnexina, sugiriendo una alteración redox en el RE de las neuronas.
- 4) En condiciones de deficiencia de vitamina C se produce una disminución importante del transportador SVCT2 en neuronas y procesos neuronales de la vía corticoespinal, lo cual podría eventualmente afectar su estructura e inervación.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., & Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS letters*, 586(18), 2826–2834.
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., & Horne, M. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 30(3), 400–407.
- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., Estévez, A. G., & Beckman, J. S. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Brain research reviews*, 47(1-3), 263–274.
- Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free radical biology & medicine*, 48(5), 629–641.
- Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., ALSalamat, H. A., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *The Eurasian journal of medicine*, 50(3), 193–201.
- Barnes, A. P., & Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience*, 32, 347–381.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(3), 205–214.

- Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R. (2016). Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *Journal of experimental neuroscience*, 10(Suppl 1), 23–48.
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172.
- Castillo, V., Oñate, M., Woehlbier, U., Rozas, P., Andreu, C., Medinas, D., Valdés, P., Osorio, F., Mercado, G., Vidal, R. L., Kerr, B., Court, F. A., & Hetz, C. (2015). Correction: Functional Role of the Disulfide Isomerase ERp57 in Axonal Regeneration. *PloS one*, 10(10), e0140200.
- 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.
- Chen, X., Guo, C., & Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 7(5), 376–385.
- Chevin, M., & Sébire, G. (2021). Necroptosis in ALS: a hot topic in-progress. *Cell death discovery*, 7(1), 79.
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a020370.
- Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Martínez, F., Fernandez, E., Ferrada, L., Oyarce, K., Salazar, K., Bolaños, J. P., & Nualart, F. (2014). The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *Journal of neurochemistry*, 129(4), 663–671.
- Clarke, B. E., & Patani, R. (2020). The microglial component of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 143(12), 3526–3539.

- Dasuri, K., Zhang, L., & Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free radical biology & medicine*, 62, 170–185.
- Davis, L. E., & Pirio Richardson, S. (2015). Disorders of the Brainstem and Cerebellum. *Fundamentals of Neurologic Disease*, 91–101.
- den Hartog Jager W. A. (1985). Experimental amyotrophic lateral sclerosis in the guinea-pig. *Journal of the neurological sciences*, 67(2), 133–142.
- Duly, A. M. P., Kao, F. C. L., Teo, W. S., & Kavallaris, M. (2022). β III-Tubulin Gene Regulation in Health and Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 851542.
- El Mendili, M. M., Querin, G., Bede, P., & Pradat, P. F. (2019). Spinal Cord Imaging in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Historical Concepts-Novel Techniques. *Frontiers in neurology*, 10, 350.
- Espinoza, F., Magdalena, R., Saldivia, N., Jara, N., Martínez, F., Ferrada, L., Salazar, K., Ávila, F., & Nualart, F. (2020). Vitamin C Recycling Regulates Neurite Growth in Neurospheres Differentiated In Vitro. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1276.
- Fang, F., Ingre, C., Roos, P., Kamel, F., & Piehl, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology*, 181.
- Figuerola-Méndez, R., & Rivas-Arancibia, S. (2015). Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Frontiers in physiology*, 6, 397.
- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)*, 400(10360), 1363–1380.

- Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11.
- Gandhi, M., Elfeky, O., Ertugrul, H., Chela, H. K., & Daglilar, E. (2023). Scurvy: Rediscovering a Forgotten Disease. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 11(2), 78.
- García-Krauss, A., Ferrada, L., Astuya, A., Salazar, K., Cisternas, P., Martínez, F., Ramírez, E., & Nualart, F. (2016). Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. *Molecular neurobiology*, 53(9), 5847–5863.
- Garman R. H. (2011). Histology of the central nervous system. *Toxicologic pathology*, 39(1), 22–35.
- Goncharova, P. S., Davydova, T. K., Popova, T. E., Novitsky, M. A., Petrova, M. M., Gavriilyuk, O. A., Al-Zamil, M., Zhukova, N. G., Nasyrova, R. F., & Shnayder, N. A. (2021). Nutrient Effects on Motor Neurons and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nutrients*, 13(11), 3804.
- Grad, L. I., Rouleau, G. A., Ravits, J., & Cashman, N. R. (2017). Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(8), a024117.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 30(2), 119–129.
- Guérin, R., Arseneault, G., Dumont, S., & Rokeach, L. A. (2008). Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Molecular biology of the cell*, 19(10), 4404–4420.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., & Deng, H. X. (1994). Motor

neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5166), 1772–1775.

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17071.

Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free radical biology & medicine*, 46(6), 719–730.

Hee, J., & Keun, J. (2013). Multiple Routes of Motor Neuron Degeneration in ALS. Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Huang, T. T., Leu, D., & Zou, Y. (2015). Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 576, 2–7.

Jara Mendoza, N (2016) Estructura de la zona subventricular del cerebro de cobayo y el efecto de la vitamina C en la neurogénesis y progresión tumoral en esta región. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Jara, N., Ramirez, E., Ferrada, L., Salazar, K., Espinoza, F., González-Chavarría, I., & Nualart, F. (2021). Vitamin C deficient reduces proliferation in a human periventricular tumor stem cell-derived glioblastoma model. *Journal of cellular physiology*, 236(8), 5801–5817.

Jara, N., Ramirez, E., Ferrada, L., Salazar, K., Espinoza, F., González-Chavarría, I., & Nualart, F. (2021). Vitamin C deficient reduces proliferation in a human periventricular tumor stem cell-derived glioblastoma model. *Journal of cellular physiology*, 236(8), 5801–5817.

Jara, N., Cifuentes, M., Martínez, F., González-Chavarría, I., Salazar, K., Ferrada, L., & Nualart, F. (2022). Vitamin C Deficiency Reduces Neurogenesis and

Proliferation in the SVZ and Lateral Ventricle Extensions of the Young Guinea Pig Brain. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(10), 2030.

Jin, H., Komita, M., & Aoe, T. (2017). The Role of BiP Retrieval by the KDEL Receptor in the Early Secretory Pathway and its Effect on Protein Quality Control and Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10.

Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., & Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of neuroscience methods*, 184(1), 115–118.

Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature neuroscience*, 1(8), 683–692.

Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325–340.

Kocot, J., Luchowska-Kocot, D., Kielczykowska, M., Musik, I., & Kurzepa, J. (2017). Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders?. *Nutrients*, 9(7), 659.

Komine, O., & Yamanaka, K. (2015). Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya journal of medical science*, 77(4), 537–549.

Kreilaus, F., Guerra, S., Masanetz, R., Menne, V., Yerbury, J., & Karl, T. (2020). Novel behavioural characteristics of the superoxide dismutase 1 G93A (SOD1^{G93A}) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis include sex-dependent phenotypes. *Genes, brain, and behavior*, 19(2), e12604.

Laurindo, F. R., Pescatore, L. A., & Fernandes, D.deC. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free radical biology & medicine*, 52(9), 1954–1969.

- Leichsenring, A., Linnartz, B., Zhu, X. R., Lübbert, H., & Stichel, C. C. (2006). Ascending neuropathology in the CNS of a mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research*, 1096(1), 180–195.
- Levine, J. B., Kong, J., Nadler, M., & Xu, Z. (1999). Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia*, 28(3), 215–224.
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of chemical neuroanatomy*, 28(1-2), 51–65.
- Masrori, P., & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European journal of neurology*, 27(10), 1918–1929.
- Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 2013–2054.
- Mattsson, P., Lönnstedt, I., Nygren, I., & Askmark, H. (2012). Physical fitness, but not muscle strength, is a risk factor for death in amyotrophic lateral sclerosis at an early age. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 83(4), 390–394.
- Moretti, M., Fraga, D. B., & Rodrigues, A. L. S. (2017). Preventive and therapeutic potential of ascorbic acid in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(12), 921–929.
- Morrice, J. R., Gregory-Evans, C. Y., & Shaw, C. A. (2017). Necroptosis in amyotrophic lateral sclerosis and other neurological disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 347–353.
- Nualart, F. J., Rivas, C. I., Montecinos, V. P., Godoy, A. S., Guaquil, V. H., Golde, D. W., & Vera, J. C. (2003). Recycling of vitamin C by a bystander effect. *The Journal of biological chemistry*, 278(12), 10128–10133.

- Nualart, F., Mack, L., García, A., Cisternas, P., Bongarzone, E. R., Heitzer, M., Jara, N., Martínez, F., Ferrada, L., Espinoza, F., Baeza, V., & Salazar, K. (2014). Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *Journal of stem cell research & therapy*, 4(5), 209.
- Ni, M., & Lee, A. S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters*, 581(19), 3641–3651.
- Oriá, R. B., Costa, C. M. de C., Santos, T. de J. T., & Vieira, C. M. de A. G. (2003). Pharmacological, morphological and behavioral analysis of motor impairment in experimentally vitamin C deficient guinea pigs. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 61(1), 25–33.
- Oswald, M. C. W., Garnham, N., Sweeney, S. T., & Landgraf, M. (2018). Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS letters*, 592(5), 679–691.
- Paidi, M. D., Schjoldager, J. G., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2014). Chronic vitamin C deficiency promotes redox imbalance in the brain but does not alter sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression. *Nutrients*, 6(5), 1809–1822.
- Paskevicius, T., Farraj, R. A., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2023). Calnexin, More Than Just a Molecular Chaperone. *Cells*, 12(3), 403.
- Pehar, M., Harlan, B. A., Killoy, K. M., & Vargas, M. R. (2017). Role and Therapeutic Potential of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current pharmaceutical design*, 23(33), 5010–5021.
- Portugal C. C. (2024). Ascorbate and its transporter SVCT2: The dynamic duo's integrated roles in CNS neurobiology and pathophysiology. *Free radical biology & medicine*, 212, 448–462.

- Raffaele, S., Boccazzi, M., & Fumagalli, M. (2021). Oligodendrocyte Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 10(3), 565.
- Ramírez, E., Jara, N., Ferrada, L., Salazar, K., Martínez, F., Oviedo, M. J., Tereszczuk, J., Ramírez-Carbonell, S., Vollmann-Zwerenz, A., Hau, P., & Nualart, F. (2022). Glioblastoma Invasiveness and Collagen Secretion Are Enhanced by Vitamin C. *Antioxidants & redox signaling*, 37(7-9), 538–559.
- Reiner, A., Medina, L., Figueredo-Cardenas, G., & Anfinson, S. (1995). Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Experimental neurology*, 131(2), 239–250.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., & Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62.
- Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D. E., & Volterra, A. (2008). Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell death and differentiation*, 15(11), 1691–1700.
- Rowland, L. P., & Shneider, N. A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine*, 344(22), 1688–1700.
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 272(30), 18982–18989.
- Rusina, R., Vandenberghe, R., & Bruffaerts, R. (2021). Cognitive and Behavioral Manifestations in ALS: Beyond Motor System Involvement. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(4), 624.

- Salazar, K., Cerda, G., Martínez, F., Sarmiento, J. M., González, C., Rodríguez, F., García-Robles, M., Tapia, J. C., Cifuentes, M., & 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.
- Salazar, K., Martínez, F., Pérez-Martín, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., Espinoza, F., Saldivia, N., Bertinat, R., Forman, K., Oviedo, M. J., López-Gamero, A. J., Bonansco, C., Bongarzone, E. R., & Nualart, F. (2018). SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Molecular neurobiology*, 55(7), 5439–5452.
- Salazar, K., Jara, N., Ramírez, E., de Lima, I., Smith-Ghigliotto, J., Muñoz, V., Ferrada, L., & Nualart, F. (2023). Role of vitamin C and SVCT2 in neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 17, 1155758.
- Sasaki S. (2010). Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(4), 346–355.
- Scheffler, J., Bork, K., Bezold, V., Rosenstock, P., Gnanapragassam, V. S., & Horstkorte, R. (2019). Ascorbic acid leads to glycation and interferes with neurite outgrowth. *Experimental gerontology*, 117, 25–30.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., & Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 139 Suppl, 27–33.
- Sheng, Y., Chattopadhyay, M., Whitelegge, J., & Valentine, J. S. (2012). SOD1 aggregation and ALS: role of metallation states and disulfide status. *Current topics in medicinal chemistry*, 12(22), 2560–2572.
- Smith, R., Myers, K., Ravits, J., & Bowser, R. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: Is the spinal fluid pathway involved in seeding and spread?. *Medical hypotheses*, 85(5), 576–583.

- Stevenson, R., Samokhina, E., Rossetti, I., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2020). Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 278.
- Stoyanov, G. S., Dzhenkov, D. L., & Petkova, L. (2021). Histomorphology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Autopsy Case Report. *Cureus*, 13(5), e14999.
- 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.
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(1), 79–94.
- Talbott, E. O., Malek, A. M., & Lacomis, D. (2016). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handbook of clinical neurology*, 138, 225–238.
- Ulloa, V., Saldivia, N., Ferrada, L., Salazar, K., Martínez, F., Silva-Alvarez, C., Magdalena, R., Oviedo, M. J., Montecinos, H., Torres-Vergara, P., Cifuentes, M., & Nualart, F. (2019). Basal Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions. *Scientific reports*, 9(1), 14422.
- Vahsen, B. F., Gray, E., Thompson, A. G., Ansorge, O., Anthony, D. C., Cowley, S. A., Talbot, K., & Turner, M. R. (2021). Non-neuronal cells in amyotrophic lateral sclerosis - from pathogenesis to biomarkers. *Nature reviews. Neurology*, 17(6), 333–348.
- Valentine, J. S., Doucette, P. A., & Zittin Potter, S. (2005). COPPER-ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 563–593.

- Wang C. C. (1998). Isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are both required for its function as a foldase. *Biochemistry. Biokhimiia*, 63(4), 407–412.
- Wilson, J. X. (2005). REGULATION OF VITAMIN C TRANSPORT. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 105–125.
- Wilson, C., & González-Billault, C. (2015). Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 381.
- Wires, E. S., Trychta, K. A., Kennedy, L. M., & Harvey, B. K. (2021). The Function of KDEL Receptors as UPR Genes in Disease. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5436.
- Woehlbier, U., Colombo, A., Saaranen, M. J., Pérez, V., Ojeda, J., Bustos, F. J., Andreu, C. I., Torres, M., Valenzuela, V., Medinas, D. B., Rozas, P., Vidal, R. L., Lopez-Gonzalez, R., Salameh, J., Fernandez-Collemani, S., Muñoz, N., Matus, S., Armisen, R., Sagredo, A., Palma, K., ... Hetz, C. (2016). ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *The EMBO journal*, 35(8), 845–865.
- Xu, J., Su, X., Burley, S. K., & Zheng, X. F. S. (2022). Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(2), 427.
- Yamanaka, K., & Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience research*, 126, 31–38.
- Zhao, J., Wang, X., Huo, Z., Chen, Y., Liu, J., Zhao, Z., Meng, F., Su, Q., Bao, W., Zhang, L., Wen, S., Wang, X., Liu, H., & Zhou, S. (2022). The Impact of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 11(13), 2049.