



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

**EFFECTO DE ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE
RIPK1, DURANTE LA DEGENERACIÓN DE NEURITAS**

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

ROCÍO FERNANDA MAGDALENA PARRA
CONCEPCIÓN-CHILE
2024

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

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Francisco Nualart

Guía de Tesis

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ariel Castro

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Fabián Segovia

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Marco Fuenzalida

Evaluador Externo

Universidad de Valparaíso

Dr. Ariel Castro

Director

Programa Doctorado en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

Tesis de doctorado financiada por:

Beca ANID para tesis doctoral #21191803

Beca ANID gastos operacionales (2021)

Beca ANID extensión COVID (2023)

Beca ANID extensión por escritura de tesis (2023)

Beca Proyecto EDPG

Proyecto FONDECYT Regular Francisco Nualart #1181243 (2018-2022)

Proyecto FONDECYT Regular Francisco Nualart #1221147 (2023-presente)

ECM-12-PIA-CONICYT

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo al Dr. Nualart por recibirme en su laboratorio hace ya tantos años, por su confianza, su apoyo y su eterna paciencia durante el desarrollo de esta tesis (y la anterior). Agradezco también a la Dra. Salazar, el Dr. Martínez, la Dra. Barahona y el Dr. Ferrada, por el apoyo científico brindado durante este período. Muchas gracias a toda la Fuerza Trabajadora del LNB: Isa, Eder, Javi (Feña), Vale, Montse, Seba y la profe Xime (miembro honorario), por las risas (y los llantos), los cafecitos (y las donuts), las palabras de aliento y las discusiones científicas.

Muchas gracias a las Ratitas: Fran, Nati, Feña, Vic, Eder y Cote, cuyo apoyo he sentido desde que era un pollo científico por allá por el 2016. Gracias por enseñarme de ciencia, pero también por enseñarme de la vida. Agradezco nuevamente a quienes han sido mis grandes amigos en estos años: Eder y Cote, a quienes más de una vez he dicho que sin ellos esta tesis no se habría logrado.

Finalmente agradezco a mi familia, mis papás Jessica y Fernando y mi hermano Felipe, que me han brindado su infinito amor y paciencia toda la vida. A mi pareja Bernardo, por acompañarme y apoyarme en todas las cosas que se me ocurren. A mis amigas y amigos, Pollo, Pauli, Romi, Cata, Angy y Diego, por su cariño y preocupación siempre.

A todos ustedes, muchas gracias.

1. INDICE DE CONTENIDO

Contenido

1. INDICE DE CONTENIDO	v
2. INDICE DE TABLAS	x
3. INDICE DE FIGURAS	xi
4. ABREVIATURAS	xv
5. RESUMEN	xix
6. ABSTRACT	xxi
7. INTRODUCCIÓN	1
7.1. Vitamina C	1
7.1.1. Síntesis y biodisponibilidad	1
7.1.2. Transporte y reciclamiento en el sistema nervioso central	2
7.1.1. Modificaciones inducidas por DHA	7
7.2. RIPK1, señalización de muerte y rol de DHA	9
7.2.1. RIPK1	9
7.2.2. Señalización de muerte celular	10
7.2.3. Rol de DHA	15
7.3. Esclerosis lateral amiotrófica	16

7.3.1. Aspectos clínicos.....	16
7.3.2. Características celulares y moleculares	18
7.3.3. Efectos en astrocitos	22
7.4. RIPK1 y degeneración axonal.....	25
7.5. DHA y pérdida de neuritas	27
8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
9. HIPÓTESIS.....	32
10. OBJETIVO GENERAL	32
11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
12. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
12.1. Animales de experimentación	33
12.2. Cultivo celular.....	33
12.2.1. Cultivo primario de NE	33
12.2.2. Siembra de NE.....	34
12.2.3. Cultivo de células madre pluripotentes inducidas	34
12.2.4. Cultivo de células AF22	36
12.2.5. Obtención de motoneuronas espinales a partir de iPSCs.....	36
12.2.6. Obtención de sMNs a partir de células AF22.....	37
12.2.7. Suplementación y tratamientos.....	38

12.3. Análisis de pluripotencia en iPSCs	39
12.4. RT-PCR convencional	39
12.4.1. Extracción de ARN	39
12.4.2. RT-PCR	39
12.4.3. PCR convencional.....	40
12.4.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	40
12.5. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)	41
12.6. Genotipificación de animales.....	43
12.7. Medición del score neurológico	43
12.8. Perfusión vascular y fijación	45
12.9. Inmunofluorescencia	45
12.10. Western Blot.....	46
12.11. Análisis de crecimiento neurítico	47
12.12. Cuantificación de varicosidades	47
12.13. Determinación de AA intracelular	47
12.14. Tinción mitocondrial.....	48
12.15. Análisis de potencial de membrana mitocondrial	48
12.16. Transporte de DHA.....	52
12.17. Implantación de cánulas e inyección intracerebroventricular	52

12.18. Rotarod acelerado	53
13. RESULTADOS.....	54
13.1. Capítulo 1: Analizar el efecto de DHA sobre las neuritas, en NE generadas desde células troncales de rata <i>in vitro</i> y evaluar el rol de RIPK154	
13.1.1. Caracterización del modelo de NE.....	54
13.1.2. Análisis de crecimiento neurítico en presencia de AA.....	60
13.1.3. Estudio de crecimiento de neuritas en presencia de DHA	65
13.1.4. Análisis de dinámica mitocondrial en NE	70
13.1.5. Expresión de RIPK1 en NE adheridas <i>in vitro</i>	75
13.1.6. Crecimiento neurítico en presencia de DHA y Nec-1s	79
13.1.7. Activación temprana de RIPK1	85
13.1.8. Expresión de MLKL en NE <i>in vitro</i>	88
13.1.9. Estudio de crecimiento neurítico en presencia de DHA y zVAD	91
13.2. Capítulo 2: Definir la expresión y función de SVCT2/GLUT1 en neuronas motoras diferenciadas desde células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs) <i>in vitro</i> y demostrar si el tratamiento con DHA daña los procesos neuríticos.....	96
13.2.1. Caracterización de MNs.....	96
13.2.2. Caracterización de iPSCs	108

13.2.3.	Efecto de DHA en MNs y NE derivadas de células AF22	111
13.2.4.	Efecto de DHA en MNs y NE derivadas de iPSCs <i>C9ORF72</i> ..	116
13.3.	Capitulo 3: Caracterizar los cambios celulares y la expresión de SVCT2/GLUT1 <i>in situ</i> en ratones SOD1 WT y SOD1 G93A y definir si la acumulación de DHA incrementa la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica <i>in vivo</i>	125
13.3.1.	Caracterización del modelo animal SOD1 G93A	125
13.3.2.	Expresión de marcadores en la médula espinal	128
13.3.3.	Análisis de la expresión y localización de SVCT2 en MNs de la médula espinal en animales SOD1 WT y G93A	132
13.3.4.	Análisis de la expresión y localización de SVCT2 en astrocitos de la médula espinal en animales SOD1 WT y G93A	141
13.3.5.	Efecto de la inyección intracerebroventricular de DHA en animales SOD1 WT y G93A.....	149
13.3.6.	Expresión de marcadores de las vías apoptótica y necroptótica en médulas espinales de animales SOD1 WT y G93A.....	158
14.	DISCUSIÓN	170
15.	CONCLUSIONES	201
16.	REFERENCIAS	203

2. INDICE DE TABLAS

Tabla I: Partidores	42
Tabla II: Score neurológico.....	44
Tabla III: Anticuerpos	49

3. INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reciclamiento de vitamina C.	6
Figura 2: Señalización de TNFR	14
Figura 3: Expresión de marcadores celulares y transportadores de vitamina C en NE.....	58
Figura 4: Transporte de DHA en NE <i>in vitro</i>	59
Figura 5: Efecto de AA en el crecimiento neurítico en cultivos de NE.	64
Figura 6: Efecto de concentraciones crecientes de DHA en el largo de neuritas y puntos de <i>branching</i> en NE.....	69
Figura 7: Análisis de dinámica mitocondrial en NE <i>in vitro</i>	73
Figura 8: Análisis de potencial de membrana mitocondrial en NE expuestas a DHA por 18h.	74
Figura 9: Expresión y localización de RIPK1 en NE <i>in vitro</i>	78
Figura 10: Efecto de Nec-1s sobre el largo de neuritas en NE.	82
Figura 11: Efecto de Nec-1s sobre los puntos de <i>branching</i> en NE.....	84
Figura 12: Expresión de RIPK1 fosforilada en NE luego del tratamiento con DHA y Nec-1s por 1h.....	87
Figura 13: Expresión de MLKL en NE <i>in vitro</i>	90
Figura 14: Efecto de zVAD-FMK sobre el largo de neuritas en NE <i>in vitro</i>	94
Figura 15: Efecto de zVAD-FMK sobre el número de puntos de <i>branching</i> en NE <i>in vitro</i>	95
Figura 16: Expresión de marcadores en MNs derivadas de células HUES9. ...	98

Figura 17: Diferenciación de neuronas motoras a partir de línea celular HUES9.	100
Figura 18: Expresión de marcadores celulares en hiMNs derivadas de iPSCs <i>TDP43</i>	101
Figura 19: Caracterización de hiMNs derivadas de iPSCs <i>TDP43</i>	105
Figura 20: Caracterización de marcadores celulares en MNs espinales derivadas de células AF22.	107
Figura 21: Expresión de marcadores y potencial de diferenciación en iPSCs <i>C9ORF72</i>	110
Figura 22: Análisis de varicosidades en MNs derivadas de células AF22.	114
Figura 23: Análisis de varicosidades en NE derivadas de células AF22.....	118
Figura 24: Análisis de varicosidades en MNs derivadas de iPSCs <i>C9ORF72</i> .122	
Figura 25: Análisis de varicosidades en NE derivadas de iPSCs <i>C9ORF72</i> . .	124
Figura 26: Caracterización de animales SOD1 G93A.....	127
Figura 27: Expresión de marcadores celulares en la médula espinal de animales SOD1 WT.....	131
Figura 28: Expresión y localización de SVCT2 en MNs de animales SOD1 WT.	133
Figura 29: Expresión y localización de SVCT2 en MNs de animales SOD1 G93A.	137
Figura 30: Intensidad de fluorescencia y distribución intracelular para SVCT2 en MNs de la médula espinal lumbar en animales SOD1 WT y G93A.	139

Figura 31: Localización intracelular de SVCT2 en MNs de la médula espinal lumbar en animales SOD1 G93A.....	140
Figura 32: Expresión y localización de SVCT2 en astrocitos de animales SOD1 WT.	144
Figura 33: Expresión y localización de SVCT2 en astrocitos de animales SOD1 G93A.....	146
Figura 34: Análisis de la intensidad de fluorescencia y área para GFAP y SVCT2 en astrocitos de la médula espinal de animales SOD1 WT y G93A.	148
Figura 35: Función locomotora en animales SOD1 WT y G93A canulados....	153
Figura 36: Caracterización inmunohistoquímica de animales SOD1 WT y G93A canulados.....	155
Figura 37: Análisis de la intensidad de fluorescencia para GFAP, NF y SVCT2 en animales SOD1 WT y G93A canulados.	157
Figura 38: Expresión de marcadores de la vía necroptótica en la médula espinal de animales SOD1 WT.	162
Figura 39: Expresión de marcadores de la vía necroptótica en la médula espinal de animales SOD1 G93A.....	164
Figura 40: Análisis de la intensidad de fluorescencia para RIPK1-P en MNs de animales SOD1 WT y G93A	165
Figura 41: Expresión de caspasa-3 clivada en la médula espinal de animales SOD1 WT.....	167

Figura 42: Expresión de caspasa-3 clivada en la médula espinal de animales SOD1 G93A.....	169
Figura 43: Regulación de RIPK1 mediada por DHA.	180
Figura 44: Pérdida del reciclamiento de vitamina C durante la progresión de ALS.	200

4. ABREVIATURAS

AA	: Ácido ascórbico
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ALS	: Esclerosis lateral amiotrófica
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero
BHE	: Barrera hematoencefálica
BSA	: Albúmina de suero bovino
C9ORF72	: Marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9
cDNA	: Ácido desoxirribonucleico copia
ChAT	: Colina acetiltransferasa
DIV	: Día(s) <i>in vitro</i>
DHA	: Ácido dehidroascórbico
DMSO	: Dimetil sulfóxido
dNTPs	: Desoxirribonucleótidos
DPRs	: Proteínas de repetición de dipéptidos
E8	: Essential 8

EDTA	: Ácido etilendiamintetraacético
FDA	: Administración de alimentos y medicamentos
FTD	: Demencia frontotemporal
GAPDH	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GEF	: Intercambiador de nucleótidos de guanina
GFAP	: Proteína ácida fibrilar de la glia
GLUT	: Transportador de glucosa
GSH	: Glutación reducido
GTPasa	: Guanosina trifosfatasa
iPSCs	: Células madre pluripotentes inducidas
KDEL	: Secuencia Lys-Asp-Glu-Leu
K _m	: Constante de Michaelis
K.O	: <i>Knock out</i>
MEFs	: Fibroblastos embrionario de ratón
MNs	: Motoneuronas/neuronas motoras
Nec-1	: Necrostatina-1
Nec-1s	: Necrostatina-1s

NE	: Neurosfemas
NeuN	: Núcleo neuronal
NF	: Neurofilamentos
NO	: Óxido nítrico
NSC	: Célula madre neural
OPTN	: Optineurina
PBS	: Tampón fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	: Paraformaldehído
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	: Dodecil sulfato de sódio
SNC	: Sistema nervioso central
SOD1	: Superóxido dismutasa 1
SV2	: Vesícula sináptica 2
SVCT	: Transportador de sodio-ascorbato
TAE	: Buffer Tris-acetato-EDTA

TDP-43 : Proteína de unión a ADN TAR

TMRM : Tetrametilrodamina

Tris : 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Var : Varicosidades

WT : *Wild type*

zVAD-FMK : Carboxibenzoxi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilcetona

5. RESUMEN

En el SNC, la vitamina C se encuentra fundamentalmente como ácido ascórbico (AA), su forma reducida, molécula que actúa como agente antioxidante en el cerebro y cuya homeostasis se mantiene debido al acoplamiento neurona-astrocito, donde AA ingresa a las neuronas y es oxidado a ácido dehidroascórbico (DHA), el cual es liberado al medio extracelular y reciclado por los astrocitos, permitiendo la mantención de las concentraciones de vitamina C en el parénquima cerebral. Sin embargo, condiciones patológicas agudas que incrementen los niveles de especies oxidantes pueden favorecer la generación extracelular de DHA, cuya acumulación lleva a modificaciones en el metabolismo neuronal y la muerte necroptótica, dada por la activación de RIPK1, proteína de andamiaje fuertemente regulada y que ha sido asociada a la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS); sin embargo, se desconoce si bajo estas condiciones crónicas, DHA puede llevar a la activación de RIPK1 y a la pérdida de neuritas y axones.

Utilizando neuroesferas *in vitro*, evaluamos el efecto de DHA sobre las neuritas, detectando una reducción significativa en su largo y ramificación, efecto prevenido tanto por la inhibición de RIPK1 como de caspasas, sugiriendo la activación de una vía apoptótica dependiendo de RIPK1. De forma similar, en neuronas motoras diferenciadas desde hiPSCs control y con una mutación en el gen *C9ORF72*, asociado a ALS, DHA incrementó la formación de varicosidades

axonales, lo cual es prevenido por la inhibición de RIPK1, indicando un efecto que es reproducible en células humanas. Finalmente, utilizando el modelo animal de ALS, SOD1 G93A, observamos la presencia de astrogliosis reactiva en las astas ventrales de la médula espinal, evento asociado a un incremento en la expresión del transportador de AA, SVCT2, en astrocitos, y a la internalización del mismo en neuronas motoras, sugiriendo una pérdida del reciclamiento de vitamina C. Sin embargo, la inyección de DHA en el IV ventrículo de los animales disminuyó la expresión de SVCT2 en astrocitos, apuntando a una pérdida de características de gliosis reactiva que no está asociada a una mejora en la función motora. Por último, el análisis de marcadores de muerte mostró un incremento en la fosforilación de RIPK1 y el clivaje de caspasa-3 en neuronas motoras de médulas SOD1 G93A, junto con la ausencia de la proteína efectora de la necroptosis, MLKL, sugiriendo que la vía necroptótica sería prescindible para la progresión de ALS y, por el contrario, que la muerte neuronal observada en esta patología estaría asociada a la activación de una vía apoptótica dependiente de RIPK1.

6. ABSTRACT

In the CNS, vitamin C is mainly found as ascorbic acid (AA), its reduced form, a molecule that acts as an antioxidant agent and whose homeostasis is maintained through the neuron-astrocyte coupling, in which AA enters neurons and it is oxidized to dehydroascorbic acid (DHA), which is liberated to the extracellular media and is recycled by astrocytes, thus maintaining vitamin C concentrations in brain parenchyma. However, acute pathological conditions that increase the levels of oxidant species may favor the extracellular generation of DHA, whose accumulation leads to modifications in neuronal metabolism and necroptotic cell death, due to the activation of RIPK1, scaffolding protein highly regulated and that has been associated to the development and the progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS); however, it is unknown whether under these conditions, DHA can lead to RIPK1 activation and the loss of neurites and axons.

Using neurospheres *in vitro*, we evaluated the effect of DHA on neurites, detecting a significant decrease on their length and ramifications, an effect that was prevented by both RIPK1 and caspases inhibition, suggesting the activation of a RIPK1-dependent apoptotic pathway. Similarly, in motor neurons differentiated from control and *C9ORF72*-mutated (ALS-associated) hiPSCs, DHA increased the formation of axonal varicosities, which is prevented by RIPK1 inhibition, indicating an effect that is reproducible in human cells. Finally, using the ALS animal model, SOD1 G93A, we observed the presence of reactive astrogliosis in

the ventral horns of the spinal cord, an event associated to an increase in the expression of AA transporter, SVCT2, in astrocytes, and its internalization in motor neurons, suggesting a loss of vitamin C recycling. However, DHA injection in the IV ventricle of the animals decreased SVCT2 expression in astrocytes, pointing to a loss of reactive gliosis characteristics that is not associated with an improvement of motor function. Finally, the analysis of cell death markers showed an increase in RIPK1 phosphorylation and the cleavage of caspase-3 in motor neurons of SOD1 G93A spinal cords, together with the absence of necroptosis effector protein, MLKL, suggesting that the necroptotic pathway is dispensable for ALS progression and, on the other hand, that the cell death observed in this pathology is associated to the activation of a RIPK1-dependent apoptotic pathway.

7. INTRODUCCIÓN

7.1. Vitamina C

7.1.1. Síntesis y biodisponibilidad

La vitamina C es un micronutriente esencial para las funciones metabólicas normales del organismo. Su deficiencia genera escorbuto, patología caracterizada por un déficit en la síntesis de colágeno, proceso en que la vitamina C actuaría como un cofactor de las enzimas prolina hidroxilasa y lisina hidroxilasa (Carr y Frei, 1999).

En la mayoría de los mamíferos, la vitamina C es sintetizada en el hígado a partir de D-glucosa, en una vía derivada de la ruta de síntesis del ácido glucurónico; sin embargo, en humanos, primates y cobayos se ha perdido la capacidad de síntesis de esta vitamina debido a la inactividad del gen codificante para la enzima L-gulono- γ -lactona oxidasa, que participa en la última etapa de su síntesis (Nishikimi y Yagi, 1991). De esta forma, la vitamina C solo puede ser obtenida mediante su consumo en la dieta. Si bien se le conoce fundamentalmente por su rol antioxidante, esta también actúa como cofactor en la síntesis de catecolaminas, carnitina, colesterol, aminoácidos y hormonas peptídicas (Carr y Frei, 1999; Harrison y May, 2009).

En humanos, la vitamina C es absorbida desde el intestino delgado, alcanzando concentraciones de aproximadamente 50 μ M en el plasma sanguíneo, principalmente como ácido ascórbico (AA), su forma reducida, mientras que solo

un 5-10% (2-5 μM) se encuentra como ácido dehidroascórbico (DHA), su forma oxidada. Desde aquí es distribuida a todo el organismo, concentrándose en distintos tejidos mediante transporte contra un gradiente de concentración, entre los que destacan el hígado, músculo esquelético y cerebro (Padayatty y Levine, 2016).

7.1.2. Transporte y reciclamiento en el sistema nervioso central

El transporte de vitamina C ocurre mediante dos mecanismos de captación diferentes, dependiendo del estado redox de la molécula. La captación de AA ocurre a través de los transportadores de sodio-ascorbato (SVCTs). Las primeras isoformas en ser clonadas fueron SVCT1 y SVCT2 (Tsukaguchi et al., 1999) y corresponden a transportadores dependientes de sodio, pertenecientes a la familia de transportadores de ascorbato (Nualart et al., 2014; Savini et al., 2008). SVCT1 es una proteína codificada por el gen *SLC23A1* y compuesta por 604 aminoácidos, cuya expresión ha sido observada en intestino, riñón e hígado; así, su función se asocia fundamentalmente a la mantención de la homeostasis corporal de vitamina C, mediante su absorción desde la dieta y su reabsorción renal (Castro et al., 2008; Harrison y May, 2009; Nualart et al., 2013; Savini et al., 2008). Recientemente, utilizando microscopía electrónica criogénica, se ha dilucidado la estructura de SVCT1 en mamíferos: este transportador formaría un homodímero, donde cada subunidad constaría de 14 segmentos transmembrana. En este sentido, el dominio transmembrana estaría espacialmente separado en

un dominio de compuerta, que formaría la interfase dimérica, y un dominio central, que contendría el sitio de unión a vitamina C (Wang et al., 2023).

Por otro lado, SVCT2 está codificada por el gen *SLC23A2*, la componen 592 aminoácidos y tiene una masa de aproximadamente 50 kDa. Adicionalmente, posee una K_m de 20 μM y tiene alta afinidad por el ácido L-ascórbico, con baja capacidad de transporte (Daruwala et al., 1999; Nualart et al., 2003; Savini et al., 2008). Se considera un transportador dependiente de cationes divalentes y es activado por iones sodio, con una estequiometría sodio-ascorbato de 2:1 (Godoy et al., 2007). A nivel cerebral, su expresión ha sido observada fundamentalmente en neuronas corticales, hipocampales, hipotalámicas y cerebelares (Astuya et al., 2005; Castro et al., 2001; Salazar et al., 2014), no siendo observada su expresión en astrocitos (Pastor et al., 2013).

El segundo mecanismo de transporte permite la movilización de DHA, que debido a su similitud estructural con la glucosa se mueve por la membrana plasmática a través de los transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs) (Vera et al., 1993), siendo descritos GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 y GLUT10 como capaces de captar DHA (Corpe et al., 2013; Nemeth et al., 2016; Nualart et al., 2003; Rumsey et al., 2000; Rumsey et al., 1997) y codificados por los genes *SLC2A1*, *SLC2A2*, *SLC2A3*, *SLC2A4*, *SLC2A8* y *SLC2A10*, respectivamente (Barron et al., 2016). En particular, GLUT1 y GLUT3 son los encargados del transporte de DHA en el cerebro (Bondy et al., 1992): GLUT1 es expresado

fundamentalmente en células endoteliales y astrocitos (Astuya et al., 2005; Maurer et al., 2006; Nualart et al., 1999) y moviliza DHA con una Km de 1,1 mM (Rumsey et al., 1997); por otro lado, GLUT3 corresponde al principal transportador de hexosas presente en neuronas (Castro et al., 2007; Maher et al., 1991; Maurer et al., 2006), cuya Km para el transporte de DHA es de 1,7 mM (Castro et al., 2001; Rumsey et al., 1997).

En el cerebro, el ingreso de vitamina C está limitado por dos barreras que impiden el paso de moléculas hidrofílicas al sistema nervioso central (SNC): la barrera hematoencefálica (BHE) y los plexos coroideos. Se ha reportado la expresión de SVCT2 en la cara basolateral de las células epiteliales que forman los plexos (Ulloa et al., 2013; Ulloa et al., 2019), sugiriendo que estas células transportan AA al cerebro. Una vez al interior de la célula del plexo, AA ingresa al líquido cefalorraquídeo a través de GLUT12 (Miyata et al., 2022) y atraviesa por difusión hacia el fluido extracelular, alcanzando concentraciones de 200-400 μ M (Nualart et al., 2014). Una vez en el parénquima cerebral, AA es compartimentalizado diferencialmente entre neuronas y astrocitos, alcanzando concentraciones de 10 mM y 1 mM, respectivamente (Rice, 2000).

Se ha propuesto un mecanismo de reciclamiento de vitamina C en el cerebro adulto, el cual permitiría mantener las concentraciones intracelulares de esta molécula (Astuya et al., 2005; Nualart et al., 2003; Nualart et al., 2014; Salazar et al., 2023) (**Figura 1**). Una vez que AA ingresa a la neurona mediante SVCT2, su

alta tasa metabólica favorece la oxidación a DHA, molécula que es liberada al fluido extracelular mediante GLUT3 y que debe ser reducida para mantener niveles constantes de vitamina C (Cisternas et al., 2014). Esta función la cumplen los astrocitos, células que poseen un alto poder reductor y por lo tanto pueden captar y reducir DHA intracelularmente, liberando AA al medio (Nualart et al., 2014).

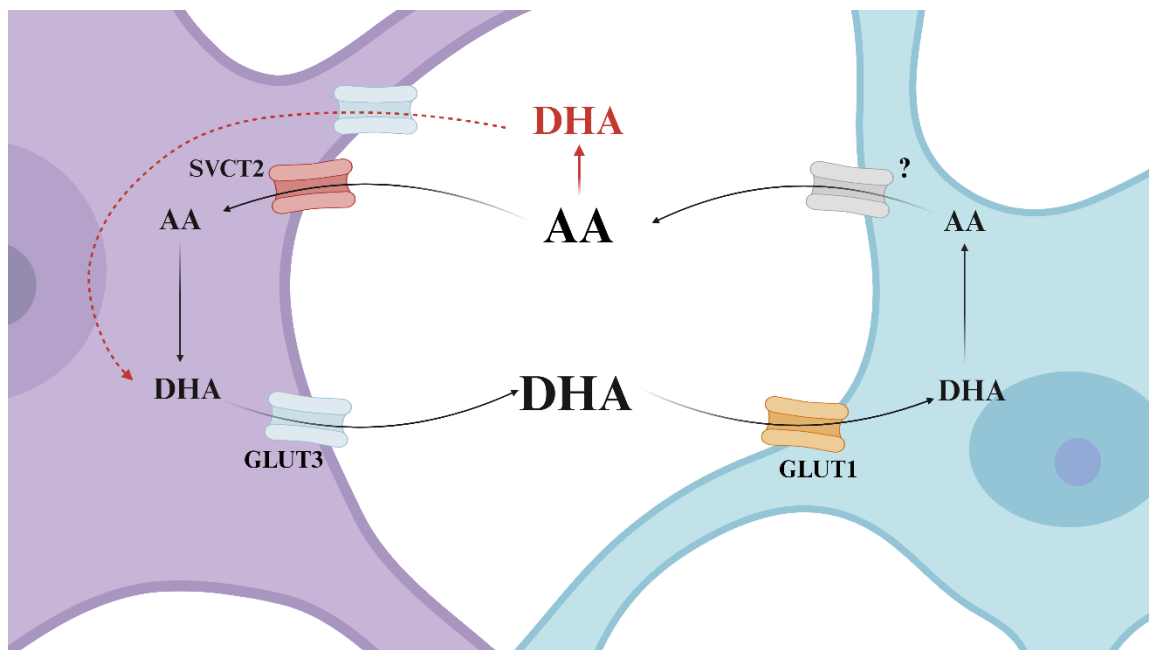


Figura 1: Reciclamiento de vitamina C.

El AA extracelular ingresa a las neuronas (izquierda) vía SVCT2, donde es intracelularmente oxidada a DHA, molécula que luego es liberada al medio vía GLUT3 y captada por los astrocitos (derecha) a través de GLUT1. DHA es reducido a AA, molécula que nuevamente es transportada al medio extracelular por un mecanismo aún desconocido. Condiciones patológicas que aumenten la producción de especies oxidantes podrían favorecer la generación de DHA extracelular, el que podía ingresar y acumularse en neuronas. Modificado de (Nualart et al., 2014).

7.1.1. Modificaciones inducidas por DHA

El alto metabolismo oxidativo neuronal favorece una rápida oxidación de AA a DHA (Cisternas et al., 2014). Por otro lado, los elevados niveles de glutatión reducido (GSH) otorgan un alto poder reductor a los astrocitos (Daskalopoulos et al., 2002), permitiendo tomar el DHA del medio y reducirlo intracelularmente hacia AA (Korcok et al., 2003), manteniendo las concentraciones constantes de vitamina C en el parénquima cerebral. Sin embargo, el desarrollo de ciertas condiciones patológicas puede aumentar significativamente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el cerebro (Sbodio et al., 2019), favoreciendo la producción de DHA a velocidades que exceden la capacidad reductora de los astrocitos (**Figura 1**), pudiendo esta molécula ingresar nuevamente a las neuronas y comprometer su estado redox (Song et al., 2001) y metabólico. En este sentido, estudios previos realizados en neuronas corticales expuestas a concentraciones crecientes de DHA, han mostrado una disminución significativa en los niveles de GSH, evento asociado a una menor tasa glicolítica y a un aumento en la actividad de la vía de las pentosas fosfato, esencial para la regeneración de GSH (Cisternas et al., 2014). De manera similar, análisis metabolómicos realizados en las células de cáncer colorectal (*KRAS – BRAF*) tratadas con vitamina C, mostraron la acumulación de todos los intermediarios glicolíticos río arriba de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mientras que todos los metabolitos río abajo estaban depletados,

sugiriendo la inhibición de esta enzima (Yun et al., 2015) y la activación de una respuesta protectora frente a la depleción de glutatión.

Por otro lado, DHA también ha sido asociado a eventos de muerte celular. Estudios en neuronas corticales expuestas a DHA en condiciones de estrés oxidativo de tipo infarto (en ausencia de glucosa) han mostrado una baja viabilidad celular, situación que es prevenida al inhibir el transporte de DHA (Garcia-Krauss et al., 2016). Es más, la menor viabilidad celular observada en células N2a, HN33.11 y neuronas corticales frente al tratamiento combinado con AA y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (para inducir la formación de DHA) estuvo asociada a un aumento en la expresión de la proteína de andamiaje RIPK1 (*receptor interacting serine-threonine kinase 1*) (Ferrada et al., 2020), esencial en la respuesta inflamatoria y de muerte celular. En este sentido, la muerte inducida por la oxidación de AA fue prevenida al utilizar el inhibidor específico de RIPK1, Necrostatina-1s (Nec-1s), mientras que el inhibidor pan-caspasa, y por lo tanto de las vías apoptóticas, zVAD.FMK, no tuvo efectos (Ferrada et al., 2020). En conjunto, esta evidencia sugiere que la generación de DHA en condiciones de estrés oxidativo puede inducir la activación de un tipo de muerte celular no apoptótica, denominada necroptosis, que depende de la actividad de RIPK1.

7.2. RIPK1, señalización de muerte y rol de DHA

7.2.1. RIPK1

RIPK1 fue descrita por primera vez en el año 1995 por Stanger y colaboradores (Stanger et al., 1995) a partir del *screening* de una librería de cDNAs de interactores de la proteína Fas, con el objetivo de comprender cómo se ejecutan los programas de muerte celular. RIPK1 forma parte de la familia de proteínas quinasa Ser/Thr de interacción con receptor, conformada por 7 miembros (RIPK1-7) (Cuny y Degterev, 2021). Además, es una proteína constituida por 671 aminoácidos y posee un peso molecular de 76 kDa (Pati et al., 2023). Su estructura, cristalizada por primera vez en el año 2013 por Xie y colaboradores (Xie et al., 2013), se compone de un dominio quinasa N-terminal, un dominio intermedio que contiene un motivo de interacción homotípico RIP (RHIM, *RIP homotypic interaction motif*), y un dominio de muerte C-terminal (Delanghe et al., 2020; Mifflin et al., 2020; Stanger et al., 1995). RIPK1 es una proteína altamente regulada, con roles en la respuesta de inflamación y muerte. Como proteína de andamiaje tiene un rol clave en la supervivencia celular, al promover la activación de la vía NF- κ B (Li y Yuan, 2023), mientras que la activación de su actividad quinasa desencadena mecanismos de muerte y la producción de citoquinas proinflamatorias (Delanghe et al., 2020; Li y Yuan, 2023). Adicionalmente, cabe destacar que RIPK1 es una proteína que ha sido ampliamente asociada a patologías del SNC (Degterev et al., 2019; Yuan et al., 2019).

Hasta la fecha, el único sustrato de RIPK1 que ha sido identificado es si misma. Si bien han sido descritos varios sitios de autofosforilación (Delanghe et al., 2020; Ofengeim y Yuan, 2013; Wu y Stork, 2020), solo se han reportado efectos en la inducción de muerte celular frente a la fosforilación en Ser161 y Ser166 (Laurien et al., 2020; Zhang et al., 2017). En este sentido, el primer inhibidor descrito para RIPK1 fue Necrostatina-1 (Nec-1) (Degterev et al., 2008; Degterev et al., 2005); sin embargo, posteriormente se observó que Nec-1 también puede actuar como un inhibidor del modulador inmune indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), y se sugirió el uso de Necrostatina-1s (Nec-1s), mucho más activo y específico contra RIPK1 (Takahashi et al., 2012; Vandenabeele et al., 2013).

7.2.2. Señalización de muerte celular

La activación de vías de muerte celular depende de la presencia de moléculas que puedan iniciar la cascada de señalización, siendo la más conocida y estudiada TNF α (Croft et al., 2013), cuya unión a su receptor (TNFR) en la superficie celular estimula el ensamblaje de un complejo multiproteico en la membrana plasmática, conocido como Complejo I, y que está formado por las proteínas adaptadoras TRADD (*tumor necrosis factor type-1 associated death domain*), TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) y RIPK1 (Delanghe et al., 2020; Mifflin et al., 2020). Adicionalmente, a este complejo se unen las proteínas ubiquitina ligasas cIAP1/2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2*) y LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*), encargadas de generar largas cadenas de ubiquitina que se asocian a RIPK1 y reprimen su actividad quinasa (Annibaldi

et al., 2018). La presencia de estas cadenas permite la unión de diversas proteínas quinasa: por una parte, las cadenas de ubiquitina generadas por cIAP1/2 favorecen el reclutamiento de la proteína TAK1 (*transforming growth factor β -activated kinase 1*), encargada de fosforilar inhibitoriamente a RIPK1 (Geng et al., 2017), pero también de reclutar y activar a p38 MAPK y con ello a MK2 (*MAP kinase-activated protein kinase 2*) quinasa, que fosforila de forma inhibitoria a un *pool* citosólico de RIPK1 (Dondelinger et al., 2017; Jaco et al., 2017). De forma paralela, las cadenas de ubiquitina generadas por LUBAC permiten el reclutamiento de la proteína adaptadora NEMO (*NF- κ B essential modulator*) y con ello a IKK α/β (*I κ B kinase α and β*) y TBK1/IKK ϵ (*TANK-binding kinase 1/non-canonical I κ B kinase ϵ*) (Heger y Dixit, 2018). Aquí, TBK1/IKK ϵ fosforila de forma inhibitoria a RIPK1 en el Complejo I (Lafont et al., 2018); al mismo tiempo, TAK1 activa a IKK α/β , quinasas que también fosforilan inhibitoriamente a RIPK1 (Dondelinger et al., 2015) y además activan la vía de NF- κ B. Esta última constituye la respuesta canónica activada por TNF α y resulta en la expresión de genes proinflamatorios y de supervivencia (Heger y Dixit, 2018).

El desensamble de los componentes del Complejo I en la membrana plasmática permite la formación de un segundo complejo multiproteico en el citosol denominado Complejo II, donde el reclutamiento de procaspasa-8 y FADD (*Fas-associated protein with death domain*) al adaptador TRADD (Complejo IIa) induce la activación de caspasa-8 y el clivaje de RIPK1, desencadenando una vía de muerte apoptótica independiente de RIPK1 (Zhao et al., 2015). Por otra parte,

condiciones que afecten la inhibición de RIPK1 pueden favorecer su activación por autofosforilación y la consecuente formación del Complejo IIb, reclutando a FADD y procaspasa-8 e induciendo una apoptosis RIPK1-dependiente (Delanghe et al., 2020). Sin embargo, bajo condiciones en que caspasa-8 esté inhibida o ausente, RIPK1 autofosforilada recluta y activa a RIPK3 y con ello a MLKL (*mixed-lineage kinase domain-like*), formando el Necrosoma, que transloca a la membrana plasmática y genera poros en ella, activándose así la necroptosis (Zhao et al., 2015).

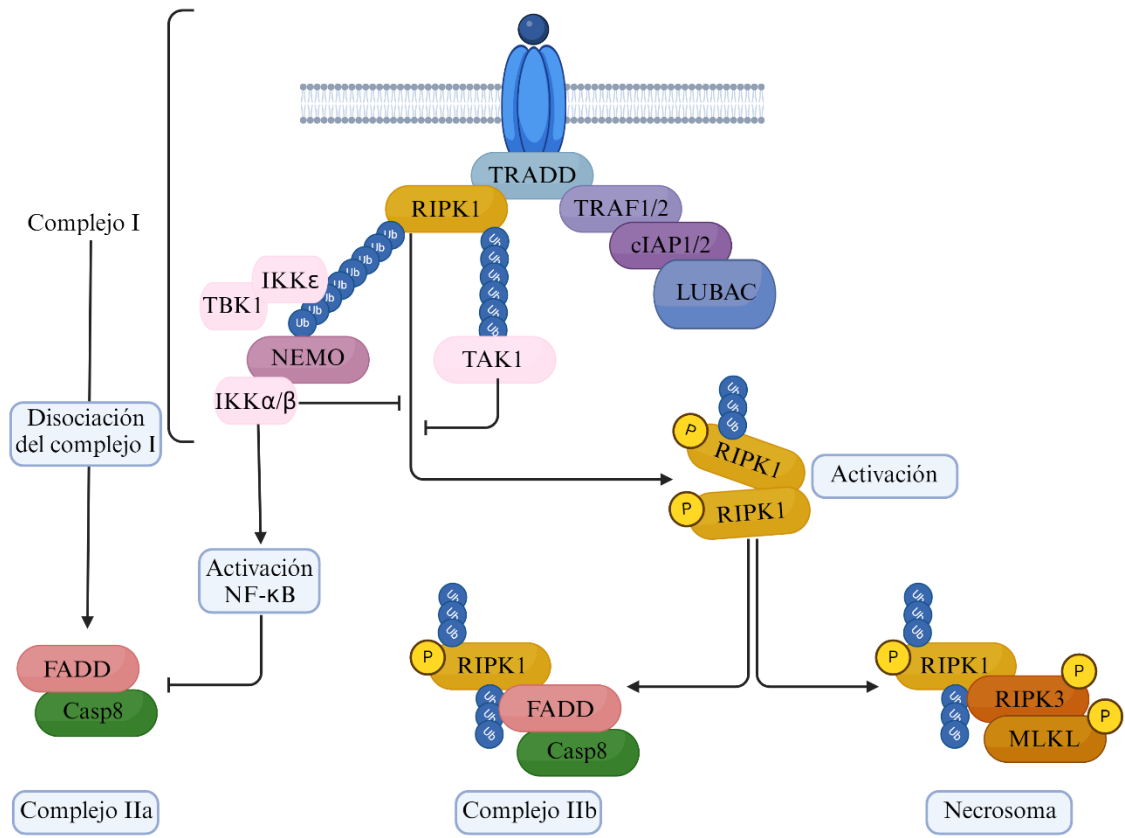


Figura 2: Señalización de TNFR

La unión de TNF α a su receptor en la membrana plasmática induce la formación del complejo I (superior), en donde el reclutamiento e inhibición de RIPK1 permiten la activación de la vía NF- κ B. La disociación de los componentes del complejo I favorecen la formación del complejo IIa (inferior izquierda), que implica el clivaje de RIPK1 y la activación de apoptosis RIPK1-independiente. Cuando la inhibición de RIPK1 se ve afectada ocurre el ensamblaje del complejo IIb (inferior centro), caracterizado por el reclutamiento de RIPK1 y procaspasa-8 y la activación de apoptosis RIPK1-dependiente. En condiciones en las que caspasa-8 está inhibida o ausente se forma el necrosoma (inferior derecha), donde RIPK1 activada recluta y activa a RIPK3 y MLKL, activando la muerte necroptótica. Esferas azules indican ubiquitinación, esferas amarillas indican fosforilación. Modificado de (Mifflin et al., 2020).

7.2.3. Rol de DHA

La información descrita previamente indica la presencia de varios puntos de control que regulan a RIPK1 y sugiere que, la represión de las proteínas que inhiben su actividad, podría modificar la respuesta celular e inducir la activación de vías de muerte. Ha sido previamente descrito que DHA es capaz de inhibir directamente la actividad quinasa de IKK α e IKK β (Carcamo et al., 2002; Carcamo et al., 2004), encargadas de reprimir la actividad quinasa de RIPK1, y cuya inhibición genética o farmacológica en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) favorece la co-inmunoprecipitación de RIPK1 con FADD y caspasa-8, luego de la estimulación con TNF α , efecto que es reprimido por Nec-1 (Dondelinger et al., 2015). También se demostró que DHA puede inhibir la fosforilación de p38 y, además, inhibe directamente su actividad quinasa *in vitro* (Carcamo et al., 2004). Así, ya que la fosforilación de p38 está dada por la actividad de TAK1, y la proteína MK2 es directamente activada por la actividad de p38 (Dondelinger et al., 2017; Jaco et al., 2017), esto sugiere que DHA podría actuar como un inhibidor directo e indirecto de las actividades de TAK1 y MK2, respectivamente, dos puntos de control claves de RIPK1 (Dondelinger et al., 2017; Geng et al., 2017; Jaco et al., 2017). En este sentido, la inhibición farmacológica de TAK1 en MEFs *RIPK1*^{-/-} ha mostrado prevenir la muerte inducida por TNF α y disminuir el procesamiento de caspasas-3 y -8, indicando una menor activación de la vía apoptótica RIPK1-dependiente (Dondelinger et al., 2013); por otro lado, si bien la inhibición farmacológica de MK2 no es suficiente

para activar la muerte celular inducida por TNF α en MEFs, la inhibición de caspasas bajo estas condiciones sensibiliza a las células a la necroptosis, apoyando el rol regulador de MK2 (Dondelinger et al., 2017).

En conjunto, la literatura apunta a DHA como una posible molécula reguladora de la actividad de RIPK1, lo cual podría tener importancia patológica.

7.3. Esclerosis lateral amiotrófica

7.3.1. Aspectos clínicos

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*) es un desorden neurodegenerativo multisistémico caracterizado principalmente por la pérdida progresiva de neuronas motoras (MNs) superiores (craneales) e inferiores (espinales) (Liu et al., 2022), ubicadas en la corteza motora y el tronco encefálico y médula espinal, respectivamente (Ragagnin et al., 2019). Su nombre proviene de la combinación de las palabras: “esclerosis”, que se refiere a la gliosis (“cicatriz”) observada en la médula espinal; “lateral”, que apunta a la zona dorsolateral de la médula espinal, por donde descienden los axones de las motoneuronas superiores que se ven afectadas (tracto corticospinal); y “amiotrófica”, que se refiere a la denervación de las células musculares, lo que genera atrofia (Ragagnin et al., 2019). Aproximadamente un 10% de los casos de ALS son familiares, de herencia autosómica dominante, mientras que el otro 90% se consideran casos esporádicos, es decir, sin un historial familiar previo (Brown y Al-Chalabi, 2017).

Clínicamente, la patología se presenta como una combinación de disfunciones en las MNs superiores e inferiores, pudiendo afectar diferentes zonas del sistema motor. Un 35% de los casos es de inicio bulbar, cuyo fenotipo se caracteriza por debilidad en los músculos que controlan el habla y la deglución (disartria y disfagia), mientras que un 30% de los casos es de inicio espinal, caracterizado por la debilidad progresiva de los músculos voluntarios involucrados en el movimiento de las extremidades (Feldman et al., 2022); el otro 35% de los casos corresponden a otras variantes de ALS menos comunes. Usualmente, el inicio de la debilidad muscular es focal y se propaga a regiones del cuerpo adyacentes, lo cual se corresponde con la propagación neuroanatómica de la degeneración en la médula espinal y corteza motora (Ravits y La Spada, 2009). Es importante destacar que en aproximadamente un 50% de los pacientes que padecen ALS, el proceso de degeneración puede extenderse hacia los lóbulos frontal y temporal, pudiendo afectar su cognición: de este porcentaje, a un 10-15% de los pacientes se les puede realizar un diagnóstico de demencia frontotemporal (FTD, *frontotemporal dementia*). Así, actualmente ALS y FTD se consideran dos extremos de un espectro, debido a la superposición en los mecanismos asociados a ambas patologías (Masrori y Van Damme, 2020).

Los dos tratamientos actualmente aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para ALS son riluzol (Bensimon et al., 1994) y edaravone (Writing y Edaravone, 2017). Si bien los mecanismos de acción exactos de estos fármacos son desconocidos (Jaiswal, 2019), riluzol corresponde a un agente

excitotóxico que inhibiría la liberación de glutamato en el SNC (Martin et al., 1993; Mizoule et al., 1985), posiblemente mediante la interacción con canales de sodio dependientes de voltaje (Benoit y Escande, 1991). Por otro lado, edaravone actuaría como un *scavenger* de ROS y radicales peroxilo (Perez-Gonzalez y Galano, 2011; Yamamoto et al., 1996).

7.3.2. Características celulares y moleculares

Los mecanismos asociados al desarrollo y progresión de ALS son múltiples y complejos; adicionalmente, al menos 25 genes y sus diferentes variantes han sido asociados a la patología (Brown y Al-Chalabi, 2017). De forma interesante, estos genes asociados al desarrollo de ALS parecieran agruparse en 3 principales vías que se ven afectadas en la patología: alteraciones en la proteostasis y control de calidad proteica, fallas en el metabolismo del ARN y alteraciones en la dinámica del citoesqueleto y transporte axonal (Masrori y Van Damme, 2020; Taylor et al., 2016). Sin embargo, la característica más común de la patología es la agregación y acumulación de inclusiones proteicas ubiquitinadas en MNs (Leigh et al., 1988; Lowe et al., 1988). En particular, se ha identificado al factor nuclear, TDP-43 (*TAR DNA-binding protein*) como la principal proteína asociada a estas inclusiones (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006).

Una de las causas más comunes de ALS y una de las más estudiadas, son las mutaciones en *SOD1* (Rosen et al., 1993), gen que codifica para la enzima

superóxido dismutasa, de expresión ubicua y encargada de la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y O₂. Si bien son múltiples las mutaciones asociadas a SOD1 (Boillee et al., 2006; Rosen et al., 1993), a partir de este descubrimiento surgió el modelo *in vivo* más utilizado para el estudio de ALS, los ratones SOD1 G93A (Gurney et al., 1994), que sobreexpresan una isoforma activa de SOD1 humana, con la sustitución Gly⁹³→Ala. Utilizando este modelo, se observó una disminución significativa en el número de neuronas motoras en las astas ventrales de la médula espinal, y en los axones mielinizados en las raíces ventrales, lo cual no fue detectado en animales control SOD1 WT (*wild type*) (Gurney et al., 1994). Resultados similares fueron observados en animales expresando hSOD1 G37R (que mantiene su actividad enzimática), con un menor número de MNs en la zona lumbar de la médula espinal y destacándose la presencia de vacuolas en dendritas, axones y algunos somas de estas células, a lo largo de todo el tejido (Wong et al., 1995). Por otro lado, la expresión de una forma inactiva de SOD1 (hSOD1 G85R) mostró un aumento progresivo en el número y tamaño de inclusiones positivas a SOD1 y ubiquitina en MNs ventrales de la médula espinal (Bruijn et al., 1997), sugiriendo una agregación anormal de SOD1. En este sentido, se ha descrito que la presencia de agregados de esta proteína es una característica común en el desarrollo de ALS, independientemente de la mutación presente (Bruijn et al., 1998); además, no se ha detectado una correlación entre un aumento o disminución en la funcionalidad de SOD1 y la progresión de ALS (Bruijn et al., 1998). En conjunto, estos datos

sugieren que la toxicidad de SOD1 en el desarrollo de la patología está asociada a propiedades intrínsecas de las proteínas mutadas y no a la actividad dismutasa de la enzima. De forma interesante, un estudio reciente que evaluó la severidad de diferentes mutaciones en SOD1 mediante técnicas *in silico* sugirió que serían estructuras intermedias del plegamiento de SOD1 la principal fuente de conformaciones tóxicas en ALS (Berdynski et al., 2022).

Pese a lo descrito anteriormente, estudios más recientes han mostrado que la causa genética más común de ALS/FTD corresponde a una expansión en la repetición del hexanucleótido GGGGCC (G_4C_2) en el gen *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame 72*) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011), que codifica la proteína C9orf72, de ubicación citoplasmática en neuronas (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Con respecto a su función, en el año 2016 se demostró que C9orf72 forma un complejo con las proteínas SMCR8 y WDR41, el cual actuaría como un intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para las GTPasas Rab8a y Rab39b, que participan en eventos de autofagia (Sellier et al., 2016). Es más, en el mismo año también se demostró que C9orf72 participaría en el inicio de la autofagia al reclutar Rab1a, proteína asociada a la regulación de la autofagia, al complejo ULK1, favoreciendo su translocación al fagóforo en formación (Webster et al., 2016).

Mediante *splicing* alternativo se generan 3 diferentes transcritos de *C9ORF72*, llevando a la expresión de 2 isoformas de la proteína codificada. En este contexto,

la repetición G₄C₂ se encuentra ubicada entre los dos primeros exones (1a y 1b) no codificantes (DeJesus-Hernandez et al., 2011); de esta forma, la expansión de G₄C₂ se ubicaría en la región promotora (para uno de los transcritos) o bien en el primer intrón (para las otras dos variantes) (DeJesus-Hernandez et al., 2011). La mayoría de los individuos sanos presenta alrededor de 20 repeticiones de G₄C₂, mientras que en pacientes ALS/FTD se han observado desde cientos hasta miles (Balendra y Isaacs, 2018).

La patogénesis de ALS mediada por C9orf72 ha sido asociada a mecanismos de pérdida y de ganancia de función: en el primer caso, la expansión en la repetición del hexanucleótido modificaría el patrón de expresión de la proteína endógena, detectándose una reducción en los niveles de su ARNm en neuronas diferenciadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de pacientes ALS (Donnelly et al., 2013; Shi et al., 2018) y en muestras *post-mortem* de corteza y cerebelo (DeJesus-Hernandez et al., 2011; van Blitterswijk et al., 2015), en relación a muestras de pacientes sanos. Consecuentemente, la menor expresión de C9orf72 también estaría asociada a una disminución en la tasa de autofagia y la acumulación de agregados proteicos positivos a p62 y TDP-43 (Sellier et al., 2016; Webster et al., 2016). Por otro lado, los mecanismos de ganancia de función estarían asociados a la formación de foci de ARN y la presencia de proteínas de repetición de dipéptidos (DPRs, *dipeptide repeat proteins*). Los foci de ARN son acumulaciones intracelulares de expansiones de repeticiones nucleotídicas, los cuales están dados por la formación de estructuras

secundarias que mediarían el secuestro y depleción de proteínas de unión a ARN (Balendra y Isaacs, 2018) y que han sido detectados en los núcleos de neuronas derivadas de iPSCs (Donnelly et al., 2013) y en células en la corteza frontal y médula espinal de pacientes ALS (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Las DPRs están dadas por la traducción bidireccional de la repetición G₄C₂ mediante un mecanismo no convencional, denominado traducción no-ATG asociada a repeticiones (Lai y Ichida, 2019), llevando a la producción de 5 DPRs: poli-GR, poli-GP, poli-GA, poli-PR y poli-PA, las cuales formarían agregados positivos a p62 y negativos a TDP-43 (Al-Sarraj et al., 2011; Mori, Weng, et al., 2013) y cuya expresión ha sido observada en neuronas cerebelares e hipocampales de pacientes ALS (Ash et al., 2013; Mori, Arzberger, et al., 2013; Mori, Weng, et al., 2013). De forma interesante, solo se ha detectado de forma escasa la presencia de DPRs en neuronas motoras de la médula espinal (Gomez-Deza et al., 2015; Mori, Arzberger, et al., 2013), sugiriendo que la presencia de estos dipéptidos no contribuiría a la degeneración de las MNs inferiores.

7.3.3. Efectos en astrocitos

Los astrocitos corresponden al tipo celular más abundante en el SNC adulto, cuyas funciones abarcan el tamponamiento iónico, reciclamiento de neurotransmisores y regulación de la sinapsis, captación de nutrientes, entre otros (Miller, 2018; Sofroniew y Vinters, 2010). Para un organismo sano, los astrocitos usualmente son clasificados de acuerdo a su localización y morfología: astrocitos protoplasmáticos de la sustancia gris, y astrocitos fibrosos de la

sustancia blanca (Sofroniew y Vinters, 2010). Por otro lado, en estados fisiopatológicos del SNC, se han descrito múltiples cambios asociados a estas células dependiendo del contexto celular. En este sentido, la astrogliosis reactiva se describe como un espectro de cambios moleculares, morfológicos y funcionales en los astrocitos, que ocurren en respuesta a cualquier tipo de daño o patología del SNC (Escartin et al., 2021). Cabe destacar que, si bien frente a un estímulo externo no existe polarización de los astrocitos hacia un único fenotipo, en la literatura se ha sugerido la presencia de dos poblaciones de células reactivas: astrocitos citotóxicos o A1 y neuroprotectores o A2 (Lawrence et al., 2023; Miller, 2018). En este contexto, se ha descrito que la activación de las células microgliales y la consecuente liberación de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ y componente del complemento 1q (C1q) modificarían la actividad transcripcional de los astrocitos no-reactivos, favoreciendo un fenotipo neurotóxico (Liddelow et al., 2017).

En el contexto de ALS, en el año 2008 se describió un aumento en la astrogliosis reactiva en secciones lumbares de médula espinal de ratones SOD1 G93A, con respecto a animales control (Rossi et al., 2008). Adicionalmente, describieron la presencia de células astrogliales con una morfología esférica, inmunoreacción positiva a caspasa-3 activa y una tinción para el marcador astrocítico GFAP débil y de apariencia descompactada, junto a la detección de un fragmento de bajo peso molecular para esta misma proteína, sugiriendo que durante la progresión de ALS también existe una población de astrocitos que degenera (Rossi et al.,

2008). Por otro lado, muestras *post-mortem* de corteza motora han mostrado un incremento significativo en el porcentaje de astrocitos positivos para el componente 3 del complemento (C3), gen que de forma característica aumenta su expresión en astrocitos de fenotipo neurotóxico (Liddel et al., 2017). De manera adicional, estudios en animales SOD1 G93A *TNF α ^{-/-}*, *IL-1 α ^{-/-}* y *C1q^{-/-}* han mostrado que la delección de estos 3 genes es capaz de disminuir significativamente los niveles de astrocitos reactivos y del marcador C3 en la médula espinal, e incluso una extensión del 50% en la vida de los ratones, sugiriendo que la inhibición de la gliosis reactiva enlentece la progresión de ALS (Guttenplan et al., 2020).

Por otro lado, también ha sido descrito un rol tóxico de los astrocitos para las neuronas motoras durante la progresión de la patología, observándose una disminución significativa en el número de estas células en cultivo, cuando están en presencia de astrocitos corticales derivados de ratones SOD1 G93A (Di Giorgio et al., 2008); es más, se ha observado un aumento del 50% en la velocidad de muerte de neuronas motoras cultivadas con medio condicionado por astrocitos derivados de pacientes ALS, versus el tratamiento con medio derivado de astrocitos control (Haidet-Phillips et al., 2011), sugiriendo la secreción de factores tóxicos por parte de las células astrogiales. En este sentido, recientemente se ha descrito que sería polifosfato (polyP), polímero inorgánico presente en todos los tipos celulares, la molécula secretada por los astrocitos y la causante de la toxicidad a motoneuronas (Arredondo et al., 2022). Así, se ha

observado un incremento en los niveles de polyP en medio condicionado por astrocitos primarios, de ratones con mutaciones en *SOD1* (G93A), *TDP43* y *C9ORF72*, además de una disminución significativa en la supervivencia de motoneuronas, cuando cultivos primarios de médula espinal de rata son expuestas a este medio, efecto que se ve revertido al incubar el medio condicionado con la enzima exopolifosfatasa, que cataliza la hidrólisis de polyP (Arredondo et al., 2022).

En conjunto, estos datos sugieren que la presencia de astrocitos reactivos constituye un elemento clave en la progresión de ALS.

7.4. RIPK1 y degeneración axonal

Como ya se ha mencionado anteriormente, en patologías neurodegenerativas es común la presencia de moléculas proinflamatorias como TNF α en el SNC. Esto tiene particular importancia durante la degeneración axonal, evento clave en la progresión de ALS (Yuan et al., 2019). De forma interesante, la literatura sugiere que estos eventos de degeneración podrían ocurrir en un proceso de “muerte hacia atrás” (“*dying back*”), en el que el axón se degenera progresivamente, iniciando en la región más distal y avanzando en dirección al cuerpo celular (Raff et al., 2002); más aún, reportes previos han sugerido que el mecanismo que conlleva a la pérdida del axón puede no ser el mismo que lleva a la muerte del soma neuronal (Hernandez et al., 2018; Raff et al., 2002), e incluso que la degeneración axonal sería suficiente para causar la patología (Fischer-Hayes et

al., 2013). En este sentido, en el año 2004 se realizaron análisis a múltiples edades en ratones SOD1 G93A y observaron que, mientras a los 48 días de vida ya un 40% de los terminales (en las uniones neuromusculares) se encontraban denervados, al día de vida 80 se detectó una marcada reducción en la densidad de axones motores en las raíces ventrales, y solo al día 100 se observó una disminución en el número de neuronas motoras en la médula espinal (Fischer et al., 2004), apoyando así un mecanismo de muerte que iniciaría en la parte más distal del axón y finalizaría en el cuerpo celular.

Si bien son pocos los reportes que relacionan RIPK1 con la degeneración de axones, estudios de degeneración axonal *in vivo* en los que el nervio ciático de ratones ha sido aplastado, han mostrado que la inyección de Nec-1 en este nervio previene la pérdida de los axones, sugiriendo un rol importante para RIPK1 en la degeneración (Arrazola et al., 2019). En el contexto de ALS, se han observado niveles significativamente menores de TAK1 en cerebros de pacientes que padecen esta patología con respecto a controles sanos, lo cual podría favorecer la activación de RIPK1 (Xu et al., 2018). Adicionalmente, optineurina (OPTN), proteína que se une a las cadenas de ubiquitina asociadas a RIPK1 (Zhu et al., 2007) y regula negativamente su activación (Nakazawa et al., 2016), también ha sido asociada a ALS: en ratones *OPTN*^{-/-} se ha observado una reducción significativa en el número de axones motores en la médula espinal, sin verse afectado el número o morfología de los cuerpos neuronales, lo cual es prevenido en animales *OPTN*^{-/-}*RIPK3*^{-/-} y *OPTN*^{-/-}*RIPK1*^{D138N/D138N} (*kinase-dead*) o bien por

el tratamiento con Nec-1s (Ito et al., 2016), lo que en conjunto apunta a un posible rol de RIPK1 en la pérdida de neuritas y axones. Cabe destacar que, si bien se ha observado un aumento en la expresión de las proteínas de la vía necroptótica, RIPK1, RIPK3 y MLKL, en médulas espinales de ratones SOD1 G93A (Ito et al., 2016), y que este mecanismo de muerte ha sido previamente asociado a ALS (Re et al., 2014), estudios posteriores han revelado la ausencia de efectos en la función motora o el número de motoneuronas en la médula espinal de animales G93A frente a la delección de RIPK3 (Dermentzaki et al., 2019); de forma similar, no se observaron diferencias en el peso corporal, disfunción motora o supervivencia de ratones SOD1 G93A frente a la delección genética de la proteína efectora, MLKL (Wang, Perera, et al., 2020); más aún, la expresión de RIPK3 o MLKL no fue detectada en la médula espinal o corteza cerebral de animales SOD1 WT o G93A (Wang, Perera, et al., 2020), sugiriendo que la vía necroptótica sería dispensable para la neurodegeneración observada durante la progresión de ALS.

7.5. DHA y pérdida de neuritas

Una consecuencia del ambiente proinflamatorio y la alta tasa de especies oxidantes en la neurodegeneración, es la producción de elevadas concentraciones de DHA. En este sentido, si bien no se ha observado una relación directa entre la ingesta de vitamina C y el riesgo de padecer ALS (Fitzgerald et al., 2013), un estudio realizado en pacientes chinos mostró niveles séricos significativamente menores de esta molécula en aquellos pacientes con

ALS con respecto a pacientes control (Wang, Liu, et al., 2020), lo cual apoyaría una hipótesis de oxidación de vitamina C. Bajo este contexto, y como se mencionó previamente, la capacidad recicladora de vitamina C de los astrocitos se vería superada, favoreciendo la acumulación de DHA. En este sentido, y como se ha mencionado anteriormente, ya ha sido descrito el rol de los astrocitos en la degeneración neuronal: cocultivos de MNs sanas con astrocitos derivados de pacientes ALS han mostrado una disminución significativa en el número de neuronas motoras en cultivo (Re et al., 2014); es más, también se ha detectado un aumento en el porcentaje de genes inflamatorios regulados positivamente en estos astrocitos, siendo uno de los principales interactores el complejo de señalización NF- κ B (Haidet-Phillips et al., 2011), que en conjunto con lo anterior, habla de una patología en la que las células astrogliales están fuertemente involucradas y en donde es factible suponer que estas características patológicas llevarían a una incapacidad para reciclar DHA, el cual podría ingresar a las neuronas y favorecer la pérdida de neuritas.

En el año 2019, ensayos de crecimiento neurítico en células PC12 han mostrado que la suplementación de cultivos con DHA disminuye significativamente el crecimiento de procesos (Scheffler et al., 2019). Mas recientemente, estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento prolongado de neuroesferas (NE) con AA, en un sistema que permite la acumulación de los productos de oxidación (como DHA), disminuiría significativamente el volumen de neuritas con respecto a una condición control (Espinoza et al., 2020) sin verse

afectada la viabilidad celular; es más, la sobreexpresión del transportador de AA, SVCT2, en neuronas corticales también induce una disminución significativa en el porcentaje de neuronas con procesos (Salazar et al., 2021), efectos que son prevenidos por la presencia de una célula recicladora, como la línea celular U87 o los astrocitos (Espinoza et al., 2020; Salazar et al., 2021). Esto también tendría importancia *in vivo*, pues la inhibición de GLUT1, transportador de DHA en astrocitos, prevendría la formación de neuritas en la corteza cerebral (Salazar et al., 2021). En conjunto, estos datos apuntan a la oxidación de AA y consecuente generación de DHA, como la responsable de los efectos sobre las neuritas.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias presentadas anteriormente indican que DHA es capaz de modificar el metabolismo neuronal e inducir necroptosis, muerte celular caracterizada por la activación de RIPK1, proteína de andamiaje fuertemente regulada por mecanismos de ubiquitinación y fosforilación. En este sentido, la literatura muestra que DHA es capaz de inhibir al menos tres puntos de control de RIPK1, apuntando hacia un rol como molécula reguladora de esta proteína. Por otro lado, RIPK1 y los mecanismos necroptóticos han sido asociados al crecimiento y/o mantención de neuritas. Además, RIPK1 también se ha visto implicada en procesos de neurodegeneración en patologías como ALS, donde la degeneración de axones y neuritas constituyen un evento clave para su progresión. En este contexto, reportes previos han indicado que la pérdida de los axones durante los procesos neurodegenerativos ocurriría previo a la muerte del cuerpo celular; de manera interesante, estudios en nuestro laboratorio han mostrado que la acumulación de DHA regula el crecimiento de neuritas, y crónicamente induciría una disminución significativa en el volumen de procesos en NE y neuronas corticales, sin disminuir la viabilidad de las células; además, en condiciones de estrés oxidativo agudo, también se ha detectado un aumento en la expresión de RIPK1 en modelos neuronales.

Actualmente sabemos que, bajo un entorno de estrés agudo, caracterizado por una rápida producción de altas cantidades de oxidantes y elevadas

concentraciones de DHA, la muerte celular ocurre mediante la vía necroptótica. Sin embargo, desconocemos si la acumulación de DHA en condiciones crónicas como una patología neurodegenerativa, dadas por una acumulación lenta de oxidantes, puede ayudar a activar a RIPK1 y generar la pérdida de procesos neuríticos.

9. HIPÓTESIS

La acumulación de ácido dehidroascórbico en neuronas activa a RIPK1 y detiene el crecimiento y/o mantención de neuritas, condición que acelera los síntomas asociados a ALS.

10. OBJETIVO GENERAL

Demostrar si la acumulación de DHA en neuronas activa mecanismos dependientes de RIPK1, que regulen la degeneración de procesos neuríticos, y analizar los cambios estructurales en ratones SOD1 G93A y SOD1 WT, para estudiar si la acumulación de DHA incrementa la progresión de ALS *in vivo*.

11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir si DHA detiene el crecimiento de neuritas, en NE generadas desde células troncales de rata *in vitro*, activando RIPK1.
2. Definir la expresión y función de SVCT2/GLUT1 en neuronas motoras diferenciadas desde células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs) *in vitro* y demostrar si el tratamiento con DHA afecta la mantención de los procesos neuríticos.
3. Definir si existen cambios en la expresión y distribución celular de SVCT2/GLUT1 *in situ*, en ratones SOD1 WT y SOD1 G93A, y definir si la acumulación de DHA incrementa la progresión de ALS *in vivo*.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 17 días de gestación y ratones adultos de las cepas B6SJLF1/J, B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J y B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J, de ambos sexos, los cuales se mantuvieron a temperaturas entre 20-25°C, fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad y recibieron acceso a comida y agua *ad libitum*. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las normas de bioética del National Institute of Health (NIH), Bethesda, MD, y según el Manual de Bioseguridad (2008) de CONICYT. Adicionalmente, los protocolos de experimentación animal fueron evaluados y aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

12.2. Cultivo celular

12.2.1. Cultivo primario de NE

La obtención de las células se realizó en un gabinete de seguridad biológica nivel II como ha sido anteriormente descrito (Espinoza et al., 2020). Los cultivos celulares fueron mantenidos en incubadora a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. Los cultivos de NE se obtuvieron a partir de embriones de rata de 17 días de gestación. Una vez aislado el encéfalo se retiraron las cortezas cerebrales, las que fueron sometidas a disgregación mecánica en medio de proliferación para NE (StemCell Technologies Inc), compuesto por NeuroCult® NS-A 25 Proliferation Kit, suplementado con EGF 10 ng/mL, FGF 10 ng/mL y heparina 10

ng/mL (Oyarce et al., 2018). El tejido no disociado fue descartado y el sobrenadante se centrifugó a 100g por 5 minutos. El pellet fue resuspendido y la viabilidad celular fue estimada por el método de exclusión con azul tripán (0,2% p/v). Las células obtenidas se sembraron en frascos de 25 cm² con 5 mL de medio de proliferación y 50 µL Penestrep (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL). Luego de 12 horas las NE se cambiaron de frasco para asegurar la limpieza del cultivo.

12.2.2. Siembra de NE

Para la siembra en condiciones de adherencia se trataron cubreobjetos de 12 mm de diámetro y placas de 100 mm, 6, 24 o 95 pocillos con poli-L-lisina durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se recolectó el medio con NE en suspensión y se sembraron: 18 mL en placas de 100 mm, 2 mL en placas de 6 pocillos, 500 µL en placas de 24 pocillos (con o sin los cubreobjetos previamente tratados) y 125 µL en placas de 96 pocillos.

12.2.3. Cultivo de células madre pluripotentes inducidas

El cultivo y mantención de iPSCs se realizó en una sala de cultivo que posee un gabinete de seguridad biológica clase II con lámparas UV. También posee un sistema de ventilación con flujo negativo y una puerta de acceso que permanece cerrada, además de varias compuertas que separan la zona de trabajo de la zona de preparación. El acceso es restringido al personal autorizado, que debe utilizar guantes, mascarilla, gorro, bata quirúrgica y cubrecalzado. Los cultivos fueron

mantenidos en incubadora a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. Las células utilizadas corresponden a la línea UCLi004-A, derivan de un paciente de sexo masculino con diagnóstico de ALS/FTD y presentan una expansión en la repetición G₄C₂ en el gen *C9ORF72*. Las iPSCs fueron obtenidas en el European Bank for induced pluripotent Stem Cells (EBiSC, www.ebisc.org) y se manejaron según las indicaciones de la empresa. Brevemente, las células fueron cultivadas en placas de 6 wells cubiertas con Matrigel® Growth Factor Reduced (Corning) disuelto en medio DMEM (Gibco), en una concentración final de 0,33 mg proteína/well. Las placas con Matrigel fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y luego equilibradas a temperatura ambiente por 30 minutos. Antes de sembrar, el Matrigel se retiró de placa, la cual fue lavada con 1 mL medio DMEM. Finalmente, las células fueron sembradas en medio Essential 8™ (Gibco) y se les cambió el 95% del medio 6 de los 7 días de la semana, para asegurar la formación y mantención de colonias de iPSCs. Una vez alcanzado un 70-80% confluencia, las células fueron incubadas con EDTA 1 mM (Life Technologies) a 37°C por 3 minutos, luego de lo cual este fue bloqueado con 2 mL medio E8. Las células se centrifugaron a 200 g por 2 minutos y se sembraron en el volumen adecuado de medio. El inhibidor de ROCK, Y-27632 (Sigma-Aldrich), fue utilizado a una concentración final de 10 µM sólo al momento de descongelar, para aumentar la supervivencia de las células.

12.2.4. Cultivo de células AF22

Las células de la línea AF22 fueron mantenidas en incubadora a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad y se cultivaron en condiciones adheridas. Para ello, las placas fueron previamente tratadas con poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich) diluida 1:2 en PBS 1x pH 7,4, a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS 1x y se incubaron con laminina (Invitrogen) 10 µg/mL diluida en PBS 1x, a 4°C toda la noche, o bien a 37°C por 3 horas. La laminina se retiró de la placa justo antes de sembrar. Las células AF22 fueron cultivadas en placas de 100 mm en 10 mL medio DMEM/F12 suplementado con GlutaMAX, 1% N2, 0,1% B27, 10 ng/mL EGF y 10 ng/mL bFGF. El medio se cambió cada dos días.

12.2.5. Obtención de motoneuronas espinales a partir de iPSCs

La obtención de sMNs se realizó en base a lo descrito por Bos y colaboradores (Bos et al., 2019), durante un periodo de diferenciación de 16 días y mediante la formación de cuerpos embrionarios. Una vez alcanzado un 70-80% confluencia (**DIV 0**), las colonias de iPSCs fueron disociadas y sembradas en una placa de baja adherencia, pre-tratada con 3 mL de Anti-Adherence Rinsing Solution (StemCell Technologies) durante 30 minutos a temperatura ambiente, en medio de diferenciación N2B27, compuesto por una mezcla 1:1 de medio Advanced DMEM/F12 y Neurobasal (Life Technologies), suplementado con GlutaMAX 1%, β-mercaptoetanol 0,1%, N2 1%, B27 2% y AA 10 µM. Durante los siguientes 16 días, los cuerpos embrionarios formados fueron tratados con los siguientes factores: **DIV 0-1**: FGF2 10 ng/mL, Y-27632 10 µM (Abcam), SB-431542 20 µM

(SB, Sigma), LDN193189 0,1 μ M (LDN, Stemgent) y CHIR99021 3 μ M (CHIR, Tocris); **DIV 2-6:** SB 20 μ M, LDN 0,1 μ M, CHIR 3 μ M, ácido retinoico 100 nM (AR, Sigma) y agonista de sonic hedgehog 500 nM (SAG, Millipore); **DIV 7-8:** AR 100 nM, SAG 500 nM y BDNF 10 ng/mL (Peprotech); **DIV 9-13:** AR 100 nM, SAG 500 nM, BDNF 10 ng/mL y DAPT 10 μ M (Tocris); **DIV 14-15:** AR 100 nM, SAG 500 nM, BDNF 10 ng/mL, DAPT 10 μ M y GDNF 10 ng/mL (R&D Systems). El DIV 16 los cuerpos embrionarios fueron disociados mediante incubación con 2 mL tripsina 0,125% por 5 minutos a 37°C y posterior trituración mecánica. Finalmente, las neuronas motoras fueron sembradas en placas cubiertas con poli-L-ornitina (100 μ g/mL, Sigma) y laminina (3 μ g/mL, ThermoFisher), en una densidad de 2000 céls/well para una placa de 96 wells. Los cultivos se mantuvieron por 14 días en medio de maduración, compuesto por Neurobasal libre de suero, suplementado con N2 1%, B27 2%, cocktail 1:1 de uridina:fluorodeoxiuridina 1 μ M (Sigma) y GDNF, BDNF, CNTF e IGF-1 (R&D Systems) 10 ng/mL.

12.2.6. Obtención de sMNs a partir de células AF22

La obtención de sMNs desde la línea AF22 se realizó como se describió anteriormente, con algunas modificaciones. El DIV 1, se sembraron las células en una densidad de 40.000 céls/cm², en placas cubiertas con poli-L-ornitina diluida 1:2 en PBS 1x y laminina 10 μ g/mL diluida en PBS 1x, en medio de diferenciación N2B27, y se suplementaron con CHIR 3 μ M. Posteriormente, se siguió el régimen de suplementación: **DIV 2-6:** CHIR 3 μ M, AR 100 nM y SAG

500 nM; **DIV 7-8:** AR 100 nM, SAG 500 nM y BDNF 10 ng/mL; **DIV 9-13:** AR 100 nM, SAG 500 nM, BDNF 10 ng/mL y DAPT 10 μ M; **DIV 14-15:** AR 100 nM, SAG 500 nM, BDNF 10 ng/mL, DAPT 10 μ M y GDNF 10 ng/mL. El DIV 16 las células fueron despegadas de la placa mediante incubación con tripsina 0,125% por 3 minutos a 37°C y posterior centrifugación por 5 minutos a 1200 rpm. Finalmente, las neuronas motoras fueron resuspendidas y sembradas en placas cubiertas con poli-L-ornitina (100 μ g/mL, Sigma) y laminina (3 μ g/mL, ThermoFisher), en una densidad de 2000 céls/well para una placa de 96 wells en medio de maduración. Para la formación de NE, el pellet no resuspendido fue cultivado durante 2 días en suspensión, y fue posteriormente sembrado en placas cubiertas con poli-L-ornitina y laminina. Los cultivos se mantuvieron por 14 días en medio de maduración.

12.2.7. Suplementación y tratamientos

La suplementación se realizó utilizando una concentración final de 100 μ M L-AA (Sigma-Aldrich) o 100, 200 o 400 μ M L-DHA dimérico (Sigma-Aldrich), ambos disueltos en PBS 1x pH 7,4. PBS también fue utilizado como tratamiento control. Adicionalmente y cuando se indique, se realizaron tratamientos con Necrostatina-1s (MedChemExpress) y zVAD.FMK (MedChemExpress) disueltos en DMSO, a una concentración final de 10 μ M y 50 μ M respectivamente. En ambos casos, se utilizó DMSO como tratamiento control. Cabe destacar que el medio de cultivo no fue cambiado durante los tratamientos para permitir la acumulación de DHA.

12.3. Análisis de pluripotencia en iPSCs

Se evaluó la capacidad de las iPSCs de diferenciarse en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) utilizando el Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems), de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

12.4. RT-PCR convencional

12.4.1. Extracción de ARN

Las células fueron lavadas con PBS tibio y tripsinizadas con 300 μ L tripsina/EDTA por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se traspasaron a un tubo de 15 mL y centrifugadas a 100 g por 5 minutos. Se retiró todo el sobrenadante y al pellet obtenido se le agregaron 100 μ L de solución de lisis perteneciente al kit RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher). La extracción de ARN se realizó según las indicaciones del fabricante.

12.4.2. RT-PCR

Para cada muestra, la síntesis de ADNc se realizó utilizando el RevertAid® H Minus Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Para un volumen final de 20 μ L, se utilizaron 2 μ g de ARN total, los cuales se incubaron con tampón para DNAsa y DNAsa I a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción fue incubada con EDTA 25 mM (65°C por 10 minutos), 0,5 μ g OligodT denaturado (70°C por 5 minutos, e inmediatamente después en hielo), mix de reacción (tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT

10 mM), mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U de inhibidor de RNAsa, incubados 5 minutos a 37°C) y 200 U de transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV (42°C por 1 hr). Una vez finalizada la reacción, la muestra se calentó por 10 minutos a 70°C. En el caso de los controles negativos se utilizó el mismo protocolo de transcripción, pero en ausencia de transcriptasa reversa.

12.4.3. PCR convencional

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 12,5 µL en un termociclador ProFlex PCR System (Life Technologies), conteniendo tampón Taq 10x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM (cada uno), partidores específicos 0,2 µM (cada uno), Taq ADN polimerasa 0,31 U (Fermentas) y 1 µL ADNc. El programa de amplificación utilizado fué el siguiente: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los partidores utilizados están descritos en la **Tabla I**.

12.4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para la observación de bandas correspondientes a los productos de amplificación de las muestras se prepararon geles de agarosa a 1,2%, mediante la disolución de agarosa en tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y adición de GelRed 1x. Se utilizaron tampón de carga 6x y 0,5 µg de un estándar de 100 pb (Thermo Scientific). En cada carril se cargaron 15 µL finales de muestra y los geles se sometieron a un campo eléctrico de 100V por 30 minutos, en una cámara

de electroforesis cubierta de tampón TAE. Los resultados fueron visualizados en un transiluminador de luz UV.

12.5. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Para cada muestra, la extracción de ARN total y obtención de ADNc se realizó mediante los protocolos previamente mencionados. Se utilizó el kit Brilliant®SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene), que utiliza SYBR Green para la detección de amplicones, y el equipo Mastercycler Epgradient RealPlex2 (Eppendorf). Para determinar la eficiencia del proceso, se realizaron curvas de calibración utilizando diluciones seriadas de una de las muestras. Para cada gen en estudio, la cuantificación se realizó con respecto al gen de referencia ciclofilina, comparando el número de ciclos requerido para superar el ciclo umbral (Ct), siempre con relación al número de ciclos requerido para amplificar el gen de referencia sobre este umbral. La expresión relativa de los ARNm, con respecto al ARNm de ciclofilina, se calculó en base al método $\Delta\Delta Ct$.

Tabla I: Partidores

Partidor	Secuencia	Sentido	Producto
Ciclofilina	5'-ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC-3'	SN	239 pb
	5'-ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC-3'	AS	
SVCT2	5'-TGTTTCAGGCCAGTGCTTTT-3'	SN	423 pb
	5'-TGTATGCCGTCCATCCTTTTC-3'	AS	
GLUT1	5'-TCAAACATGGAACCAACCGCT-3'	SN	203 pb
	5'-AGAAACCCATAAGCACGGCA-3'	AS	
GLUT3	5'-CGCCTGATTATTGCATCTT-3'	SN	268 pb
	5'-GCAAGAACCTTGGACTCTCG-3'	AS	
RIPK1	5'-TCTCTGGGCCAGTAGCAGAT -3'	SN	238 pb
	5'-CGGGCACAGTTTTTCCACTG -3'	AS	
Casp8	5'-CTGATAAGGTGCTATCTTGGGT-3'	SN	236 pb
	5'-GTCCAAGCACAGGAACCTTGAG-3'	AS	
SOD1	5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3'	SN	236 pb
	5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3'	AS	
IL-2	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'	SN	324 pb
	5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'	AS	

12.6. Genotipificación de animales

Para confirmar la presencia del transgén SOD1 G93A o SOD1 WT en ratones, se realizó la genotipificación a los 15 días de vida de acuerdo a lo descrito en (Lopez, 2012). Brevemente, 2-3 mm de la cola del animal se llevaron a un tubo de PCR conteniendo 60 μ L solución de lisis (NaOH 50 mM) y se incubaron a 95°C por 40 minutos en termociclador. Luego, las muestras fueron centrifugadas brevemente y se tomaron 10 μ L del sobrenadante, llevándose a un nuevo tubo con 40 μ L solución de neutralización (NaCH₃COO 0,3 M pH 5,5). Posteriormente, se realizó la amplificación de los transgenes incluyendo el control interno de amplificación IL-2, utilizando los partidores descritos en la **Tabla I**. El programa de amplificación utilizado consistió en 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de: 95°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y finalmente 72°C por 5 minutos. Las muestras fueron observadas en geles de agarosa al 2%, en donde la presencia de dos bandas (una correspondiente a SOD1 y otra a IL-2) indica que la muestra corresponde a un animal transgénico.

12.7. Medición del score neurológico

La progresión de ALS en animales SOD1 G93A fue estudiada mediante el score neurológico, medida basada en la evaluación de la función neuromuscular de las patas traseras, de acuerdo con lo descrito en la **Tabla II: Score neurológico** **Tabla II** (Hatzipetros et al., 2015).

Tabla II: Score neurológico

Score Neurológico (NS)	Características motoras
0	No hay dificultades motoras.
1	Al levantar al animal desde la cola, la pata trasera se encuentra total o parcialmente colapsada hacia la línea media. La caminata es normal.
2	A levantar al animal desde la cola, la pata trasera se encuentra total o parcialmente colapsada. Al caminar, la pata es utilizada para el movimiento, pero los dedos se curvan hacia abajo.
3	Al levantar al animal desde la cola, la pata trasera está paralizada. El animal camina, pero la pata no es utilizada para la locomoción. Al acostar al animal de lado (izquierdo y derecho), es capaz de enderezarse dentro de 10 segundos.
4	Parálisis total de la pata trasera. El animal no es capaz de caminar ni tampoco de enderezarse (al acostarlo hacia el lado izquierdo y derecho) en un período de 10 segundos. Se considera el punto de sacrificio humanitario.

12.8. Perfusión vascular y fijación

Para la obtención de médulas espinales, los ratones fueron anestesiados con isofluorano al 5% y luego perfundidos de forma transcardial con PBS 1x pH 7,4, seguido de paraformaldehído (PFA) 4%. Posteriormente, se realizaron cortes a la altura de las escapulas y los isquiones para aislar la columna vertebral, la cual se mantuvo inmersa en PFA por 24 horas, luego de lo cual se aisló la médula espinal, manteniéndose inmersa en el fijador por al menos 48 horas. El proceso de corte se realizó en un vibrátomo Vibratome line, Leica VT 10005, obteniéndose cortes de 30 μm . Los análisis fueron realizados utilizando cortes correspondientes a la zona lumbar de la médula espinal.

12.9. Inmunofluorescencia

Las muestras, previamente fijadas en PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, fueron lavadas en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8), incluyendo además un lavado en solución permeabilizante Tritón X-100 0,2% v/v en Tris-fosfato 10 mM. Posteriormente, se incubaron los anticuerpos primarios (**Tabla III**), preparados en Tris-BSA durante 16 horas, según dilución. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron nuevamente las muestras con tampón Tris-fosfato 10 mM y se incubaron por 2 horas, en cámara húmeda y oscuridad, con los anticuerpos secundarios (**Tabla III**) unidos a un marcador de fluorescencia y la tinción nuclear Hoechst 33342 (Invitrogen), todo preparado en Tris-BSA. Finalmente, se realizaron lavados con Tris-fosfato 10 mM y las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako). El análisis de

muestras se realizó mediante microscopía confocal espectral. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss, modelo LSM780. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa Zen 2011 V7.0.7.2 (Zeiss) y para las cuantificaciones se utilizó el software ImageJ. Los servicios de microscopía se encuentran disponibles en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bio-Bio) de la Universidad de Concepción. www.cmabiobio.cl

12.10. Western Blot

Las muestras fueron lisadas con una mezcla de buffer NP-40 (Invitrogen) y un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Cell Signaling) y se cuantificaron mediante el método de Bradford. Posteriormente, entre 30-50 µg proteína fueron separadas mediante SDS-PAGE en un gel en gradiente 5-15%, transferidas a una membrana de PVDF (0,45 µm, Immobilon-P, Merck Millipore) e incubadas toda la noche, a temperatura ambiente y en agitación, con los anticuerpos primarios descritos en la **Tabla III**. Al día siguiente, las membranas se incubaron por 2 horas con los anticuerpos secundarios descritos en la **Tabla III** a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad, y las reacciones fueron reveladas usando el sustrato quimioluminiscente Western Lightning® Plus-ECL (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las intensidades de banda fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ.

12.11. Análisis de crecimiento neurítico

Las NE fueron sembradas en placas de fondo ultra transparente, grado microscópico, de 95 pocillos (Greiner Bio-One). Las imágenes de crecimiento neurítico fueron adquiridas en la plataforma automatizada IncuCyte®S3. El sistema fue configurado para tomar 4 imágenes por well (considerando 4 campos por pocillo y tomando una foto en cada uno) con un aumento de 10x, cada una hora, por 24 horas, solo utilizando el contraste de fases (Ferrada et al., 2023). Las imágenes fueron procesadas utilizando el software IncuCyte S3 y el módulo Neurotrack, que marca las neuritas en color morado. Los análisis incluyeron el largo de neuritas y los puntos de *branching*. IncuCyte®S3 se encuentra disponible en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío).

12.12. Cuantificación de varicosidades

La cuantificación de varicosidades en MNs se realizó de forma manual, utilizando imágenes tomadas en un microscopio invertido con contraste de fases, y contando el número de *beads* en cada proceso neuronal en un radio de 50 μm desde el borde celular.

12.13. Determinación de AA intracelular

Los análisis se realizaron en NE sembradas en placas de 6 pocillos utilizando el kit EnzyChrom™ Ascorbic Acid Assay Kit (BioAssay Systems), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

12.14. Tinción mitocondrial

Los análisis de mitocondrias se realizaron en NEs sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm, las cuales fueron incubadas con la sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos (25 nM, Life Technologies) durante 20 minutos a 37°C, y posteriormente fueron fijadas en PFA 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio de superresolución (SR-SIM), modelo ELYRA S.1 (Zeiss) con objetivo 63x, y fueron procesadas utilizando el software Imaris v 9.1 (Bitplane Inc), disponibles en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío).

12.15. Análisis de potencial de membrana mitocondrial

Los análisis se realizaron el NE adheridas, que fueron incubadas con la sonda fluorescente tetrametilrodamina (TMRM) (100 nM, Thermofisher) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, la sonda fue removida y reemplazada con medio de proliferación para NE, incubándose la placa durante 24 horas en IncuCyte®S3. Los análisis posteriores se realizaron utilizando el módulo básico del software IncuCyte S3.

Tabla III: Anticuerpos

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
α -SVCT2 (G-19)	Cabra	1:25	Santa Cruz Biotech.
α -SVCT2 (T-19)	Cabra	1:25	Santa Cruz Biotech.
α -Tubulina β III	Ratón	1:1000	Promega
α -GFAP	Conejo	1:200	Dako
α -Nestina	Ratón	1:50	Merck Millipore
α -GLUT1	Conejo	1:500	Merck Millipore
α -GLUT3 (M-20)	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotech.
α -Drp1	Ratón	1:300	Santa Cruz Biotech.
α -SOX2	Conejo	1:100	Abcam
α -KDEL	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotech.
α -Piccolo	Conejo	1:1000	Donación
α -SSEA4	Ratón	1:400	Invitrogen
α -ChAT	Cabra	1:300	Merck
α -HB9	Ratón	1:50	D.S. Hybridoma Bank
α -SV2	Ratón	1:100	D.S. Hybridoma Bank
α -NF	Ratón	1:100	Donación

α -NeuN	Ratón	1:500	Merck
α -Brachyury	Cabra	1:10	R&D Systems
α -SOX17	Cabra	1:10	R&D Systems
α -OTX2	Cabra	1:10	R&D Systems
α -Casp3 clivada	Conejo	1:50	Merck Millipore.
α -MLKL 3H1	Rata	1:200/1:2000	Merck
α -fosfoMLKL	Conejo	1:100	Cell Signaling Tech.
α -RIPK1	Conejo	1:100/1:3000	Cell Signaling Tech.
α -fosfoRIPK1	Conejo	1:100/1:1000	Cell Signaling Tech.
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen
α -IgG Conejo Cy5	Mono	1:200	Jackson ImmunoResearch
α -IgG Cabra Alexa Fluor 488	Mono	1:200	Jackson ImmunoResearch
α -IgG Ratón Cy3	Mono	1:200	Jackson ImmunoResearch
α -IgG Conejo HRP	Mono	1:5000	Jackson ImmunoResearch
α -IgG Rata HRP	Mono	1:5000	Jackson ImmunoResearch

α -actina HRP	Ratón	1:5000	Santa Cruz Biotech.
----------------------	-------	--------	---------------------

12.16. Transporte de DHA

Para los ensayos de captación de DHA se utilizaron NE sembradas en placas de 6 pocillos. Los cultivos fueron seleccionados bajo el microscopio para asegurar el uso de placas con crecimiento celular uniforme. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando ácido-L-[¹⁴C]-ascórbico (actividad específica 2,6 mCi/mmol, Perkin Elmer) oxidado con 0,5 U/μL de ascorbato oxidasa durante 5 minutos a 37°C, para obtener [¹⁴C]-DHA a una concentración final de 200 μM. Las células se incubaron con 500 μL/pocillo de tampón de transporte (HEPES 15 mM pH 7,4, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM) por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se retiró el tampón, se agregaron 500 μL del mismo a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos con el sustrato marcado. El proceso de transporte fue detenido con 500 μL de tampón de transporte conteniendo HgCl₂ 0,2 mM. Finalmente, las células fueron lisadas con 400 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, SDS 0,2% p/v) y el lisado se mezcló con 4 mL de líquido de centelleo (EcoScint, National Diagnostics). La incorporación de radiactividad a las células fue medida en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 4810 TR (Cisternas et al., 2014). Además, para cada condición se realizó el recuento celular, utilizando el método de exclusión con azul tripán 0,2% p/v.

12.17. Implantación de cánulas e inyección intracerebroventricular

Las cirugías de implantación se realizaron en ratones adultos SOD1 G93A y SOD1 WT de 50-60 días de vida, de acuerdo con lo descrito en (DeVos y Miller, 2013). Brevemente, los animales fueron anestesiados con isofluorano al 5%, el

que fue mantenido al 3% durante el procedimiento. Mediante estereotaxia, se introdujo una cánula en el IV ventrículo, de acuerdo a las coordenadas: desde el Bregma, -5,79 mm anteroposterior, -3,8 mm dorsoventral, 0,0 mediolateral. La cánula se fijó al cráneo utilizando acrílico dental y posterior al procedimiento se permitió la recuperación de los animales en sus jaulas a 37°C. A contar del día de vida 60, se realizaron inyecciones 2 veces por semana con 5 µL DHA 6 mM.

12.18. Rotarod acelerado

La habilidad motora de los ratones sometidos a inyección ICV se evaluó utilizando el ensayo de rotarod acelerado. Los animales se ubicaron en el equipo de rotarod (IITC Life Science Inc.) y se evaluó el tiempo, en segundos, que estos permanecieron en el equipo (latencia a caer) en movimiento, que aceleró desde 4 hasta 40 rpm en un período de 120 segundos. El ensayo se realizó a lo largo de dos días, cuando los animales cumplieron 120 y 130 días de edad. Para cada ratón, se realizaron 5 ensayos en el día 1 (entrenamiento) y 10 ensayos en el día 2.

13. RESULTADOS

13.1. Capítulo 1: Analizar el efecto de DHA sobre las neuritas, en NE generadas desde células troncales de rata *in vitro* y evaluar el rol de RIPK1

13.1.1. Caracterización del modelo de NE

Para la primera parte de esta tesis se trabajó con un modelo de NE adheridas. Utilizando estas células, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento durante 72 horas con AA disminuye significativamente el volumen de procesos celulares positivos a tubulina β III con respecto a una condición control, evento asociado a un incremento en los niveles de ROS y de proteínas carboniladas, además de una disminución significativa en las concentraciones intracelulares de AA, sugiriendo su oxidación y subsecuente acumulación de DHA (Espinoza et al., 2020). De esta forma, se aislaron células madre neurales (NSCs) desde la corteza cerebral de embriones de rata de 17 días de gestación, las cuales fueron cultivadas durante 2 días en suspensión, para luego adherirse en placas cubiertas con poli-L-lisina (**Figura 3 A**).

Para realizar una caracterización del modelo, las NE fueron suplementadas con 100 μ M AA (o PBS, en el caso de los controles) al tiempo 0, y luego a las 12, 24 y 48 horas, manteniéndose en cultivo por un máximo de 72 horas (**Figura 3 A**). Estas NE extienden largos procesos celulares positivos al marcador neuronal tubulina β III (**Figura 3 B**); adicionalmente, es posible observar la expresión de los 3 transportadores de vitamina C, SVCT2 (**Figura 3 C**), GLUT1 (**Figura 3 D**) y

GLUT3 (**Figura 3 E**). Es importante mencionar que en estas células también pudimos detectar la expresión de marcadores de células inmaduras, tales como el factor de transcripción SOX2 (**Figura 3 F, G**) y la proteína de los filamentos intermedios nestina (**Figura 3 H**), observando la presencia de estos marcadores en células diferentes a aquellas positivas para tubulina β III (**Figura 3 G, F e inset**).

Adicionalmente, evaluamos los cambios en la expresión de los transportadores de vitamina C mediante qPCR, luego del tratamiento de las NE con AA o PBS durante 72 horas. Los análisis mostraron un aumento significativo en el ARNm de GLUT1 (**Figura 3 I**) y GLUT3 (**Figura 3 J**) entre las 12 y 24 horas, seguido de una disminución en su expresión a las 48 y 72 horas. En el caso de SVCT2, detectamos un aumento en la expresión de su ARNm desde las 12 hasta las 48 horas, seguido de una disminución significativa a las 72 horas (**Figura 3 K**). Por otro lado, evaluamos la concentración intracelular de AA en las NE luego del tratamiento con esta molécula. Así, logramos detectar una disminución significativa en los niveles intracelulares de AA entre las 12 y 72 horas de tratamiento y cultivo. Dado que AA es intracelularmente oxidado a DHA, este resultado sugiere que, a medida que la concentración de AA cae, los niveles de DHA aumentan.

Por último, evaluamos la capacidad de las NE de transportar DHA, para lo cual realizamos ensayos de captación *in vitro* en NE tratadas con AA durante 24 y 72 horas. El transporte se realizó durante 15 minutos en presencia de 200 μ M [14 C]-

DHA, observándose captación de esta molécula en ambas condiciones evaluadas, pero sin detectar diferencias significativas (**Figura 4 A**). La capacidad de las células para captar DHA se ve respaldada por una inmunoreacción positiva para el transportador GLUT1 y tubulina β III en todas las condiciones estudiadas (**Figura 4 B-I**).

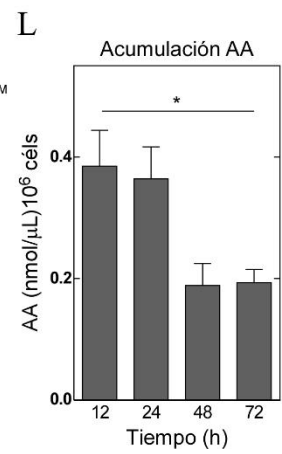
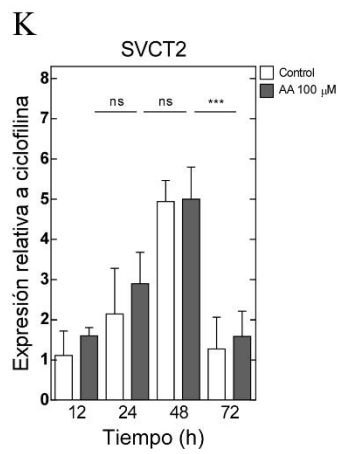
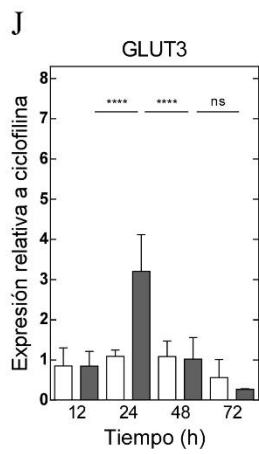
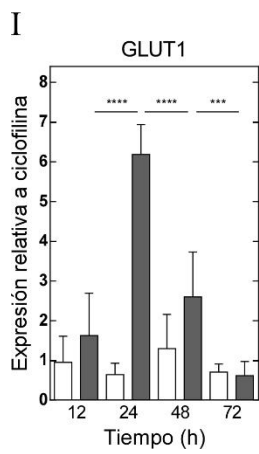
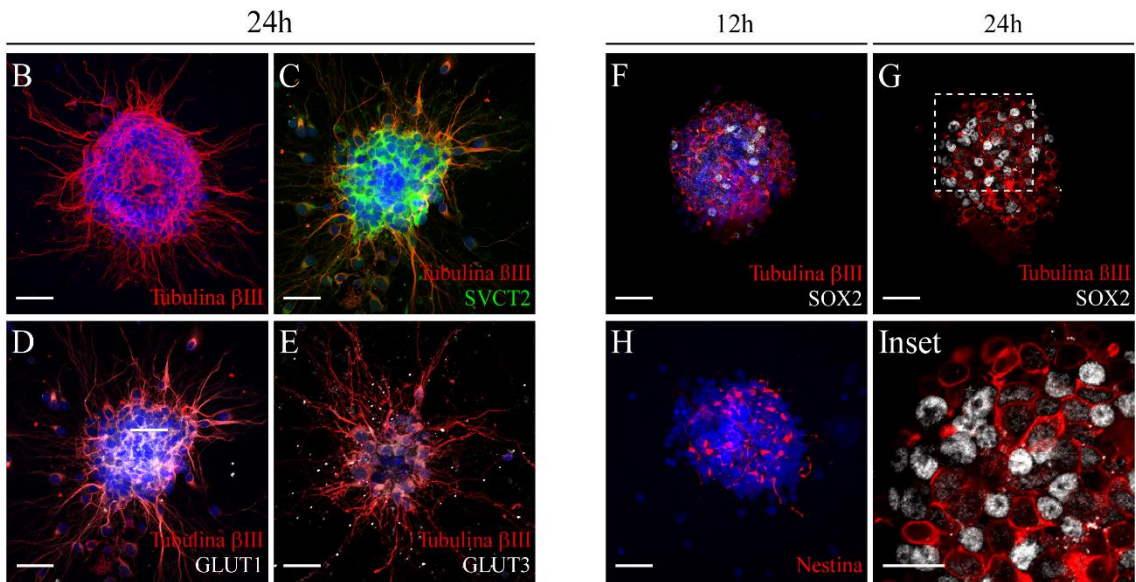
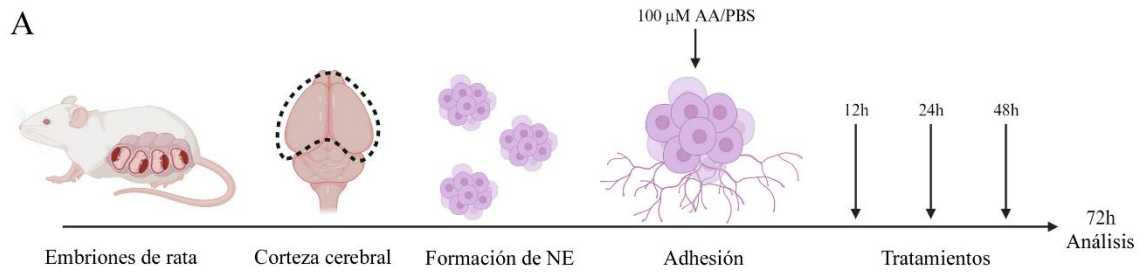


Figura 3: Expresión de marcadores celulares y transportadores de vitamina C en NE.

A. Protocolo para el cultivo de NE, derivadas de NSCs obtenidas de embriones de rata en estadio embrionario 17. **B-E.** Caracterización inmunocitoquímica de NE cultivadas en condiciones control durante 24 horas, utilizando anticuerpos anti-tubulina β III (**B**, rojo), anti-SVCT2 (**C**, verde), anti-GLUT1 (**D**, blanco) y anti-GLUT3 (**E**, blanco). Barra de tamaño: 50 μ m. **F-H.** Análisis por microscopía confocal de NE cultivadas en presencia de 100 μ M AA durante 12 (**F, H**) y 24 (**G**) horas, e incubadas con anticuerpos específicos anti-tubulina β III (**F, G**, rojo), anti-SOX2 (**F, G**, blanco) y anti-nestina (**H**, rojo). Barra de tamaño: 50 μ m. Inset: Análisis detallado de la figura **G**. Barra de tamaño: 20 μ m. Tinción nuclear: Hoechst. **I-K.** Cuantificación de los niveles de ARNm de los transportadores de vitamina C GLUT1 (**I**), GLUT3 (**J**) y SVCT2 (**K**), bajo condiciones control o en presencia de 100 μ M AA, con respecto al gen de referencia ciclofilina. Análisis estadístico ANOVA, Test Tukey *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; N=3). **L.** Ensayo de acumulación intracelular de AA luego de 12-72 horas de tratamiento. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (* $p < 0,05$; N=3). Los datos representan el promedio \pm SD.

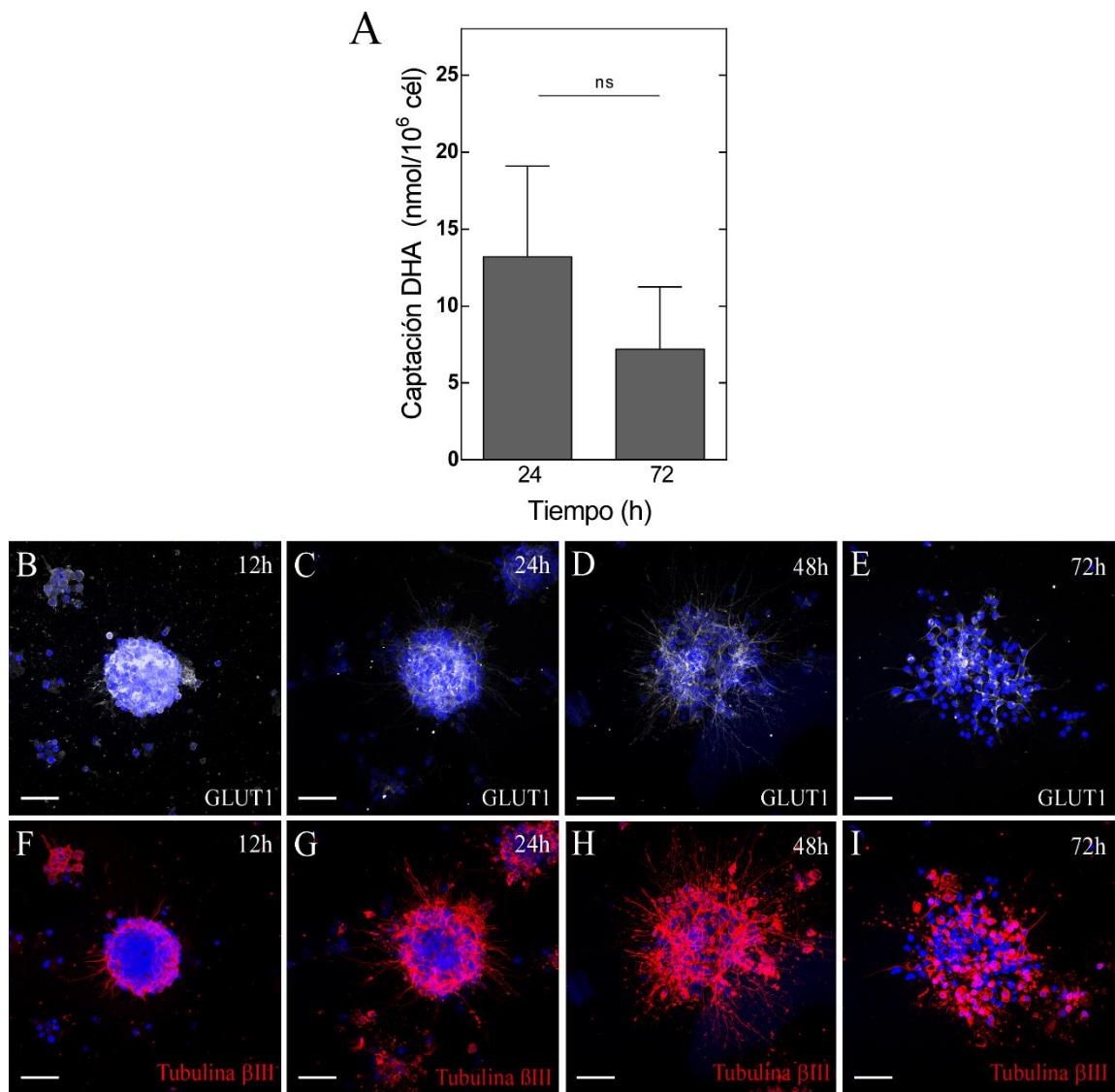


Figura 4: Transporte de DHA en NE *in vitro*.

A. Captación de 200 μ M [¹⁴C]-DHA en un período de 15 minutos, en NE tratadas con 100 μ M AA por 24 y 72 horas. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (N=4).

B-I. Análisis inmunocitoquímico de NE a las 12, 24, 48 y 72 horas utilizando anticuerpos anti-GLUT1 (**B-E**, blanco) y anti-tubulina β III (**F-I**, rojo). Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

13.1.2. Análisis de crecimiento neurítico en presencia de AA

El menor volumen de procesos celulares observados en NE luego del tratamiento prolongado con AA (Espinoza et al., 2020) sugiere que la exposición prolongada a AA, y su posible oxidación hacia DHA, afectaría el crecimiento neurítico. En este trabajo, evaluamos el efecto de AA sobre el crecimiento de neuritas utilizando la plataforma automatizada IncuCyte, que permite realizar análisis en tiempo real, sin mover las células de la placa de cultivo, de esta forma conservando la estructura de las neuritas (Ferrada et al., 2023). Así, se sembraron NE en placas de fondo ultra transparente y se trataron con 100 μM AA o PBS 1x (control) durante 24 horas (**Figura 5 A**); posteriormente, se cuantificó el largo de los procesos neuríticos y el número de ramificaciones (o número de puntos de *branching*).

Con respecto al largo de las neuritas, en el caso de la condición control (**Figura 5 B**, curva negra) observamos un crecimiento constante de los procesos neuríticos, con un largo de $59,24 \pm 5,22 \text{ mm/mm}^2$ a las 24 horas. Por otro lado, al tratar las células con AA se observa un crecimiento de neuritas similar a la condición control durante las primeras 5 horas, luego de lo cual el crecimiento decae, alcanzándose un largo de $32,88 \pm 6,80 \text{ mm/mm}^2$ a las 24 horas (**Figura 5 B**, curva gris). Con los datos entregados por estas curvas se realizaron análisis estadísticos a diferentes horas, no observándose diferencias estadísticas en el largo de neuritas (medido en mm/mm^2) entre la condición control y AA a las 6 horas (**Figura 5 C**), pero si detectando una disminución significativa en el largo

de los procesos en NE tratadas con AA a las 12 y 24 horas, con respecto a la condición control (**Figura 5 D, E** respectivamente).

Resultados similares fueron observados al analizar los puntos de *branching* en las NE, con una curva de crecimiento constante en el caso de la condición control (**Figura 5 F**, curva negra), mientras que, en el caso de la condición tratada con AA, entre las 0 y 5 horas aproximadamente se observa una pendiente mucho mayor que aquella observada luego de las 5 horas (**Figura 5 F**, curva gris), nuevamente indicando que, mientras frente al tratamiento control hay una formación constante de ramificaciones, con $1458 \pm 98,75$ puntos de *branching/mm²* a las 24 horas, en presencia de AA el *branching* es menor, con $958,1 \pm 222,40$ puntos de *branching/mm²* a la hora 24. El análisis estadístico a las 6 y 12 horas no mostró diferencias significativas en los puntos de *branching* entre ambas condiciones (**Figura 5 G, H** respectivamente), mientras que luego de 24 horas de tratamiento con AA, si hubo una disminución significativa en este parámetro frente al tratamiento control (**Figura 5 I**).

Adicional al análisis cuantitativo, se obtuvieron imágenes utilizando el módulo Neurotrack de IncuCyte, el cual marca la zona de interés (las neuritas) de color violeta, permitiendo su análisis solo utilizando contraste de fases. De esta forma, luego de 24 horas de tratamiento control se observan largos y múltiples procesos que emergen de las NE (**Figura 5 J**), mientras que en NE tratadas con 100 μ M AA los procesos son más cortos y menos numerosos (**Figura 5 K**). En conjunto,

estos resultados indican que la exposición prolongada a AA induce un menor crecimiento de neuritas en NE y, sumado a los bajos niveles intracelulares de AA descritos previamente (**Figura 3 L**), sugiere que sería el producto de oxidación de la vitamina C, DHA, la causa de estos cambios.

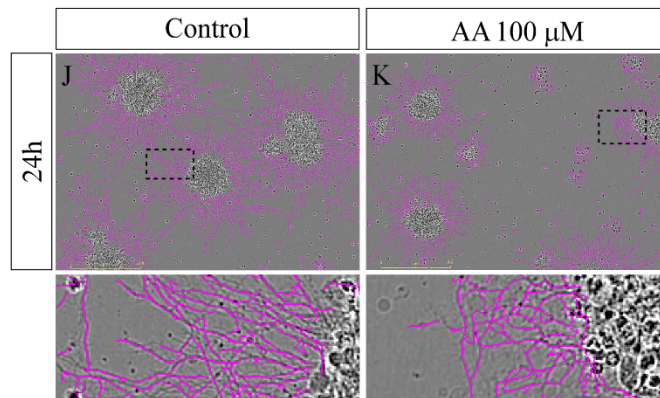
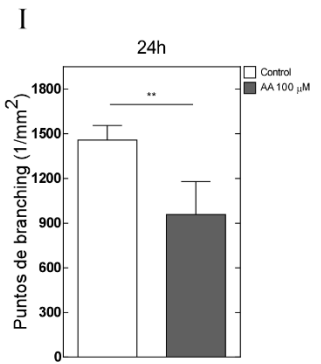
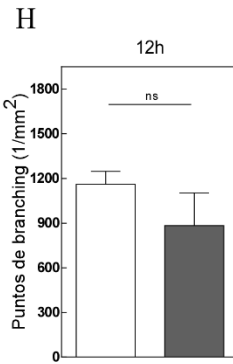
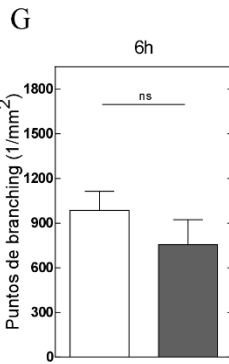
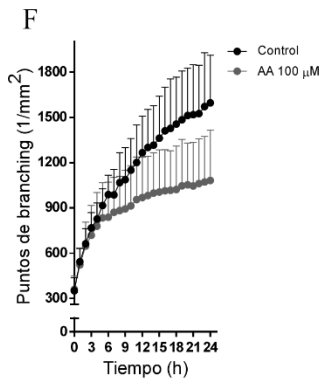
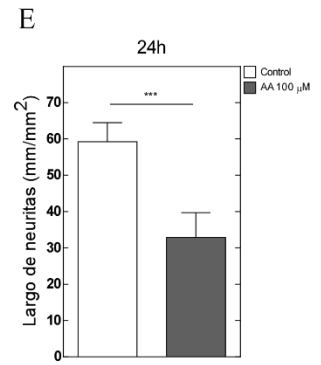
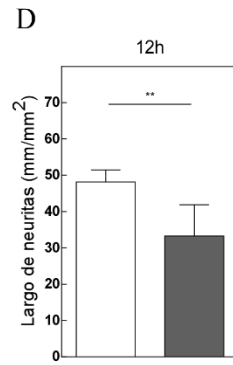
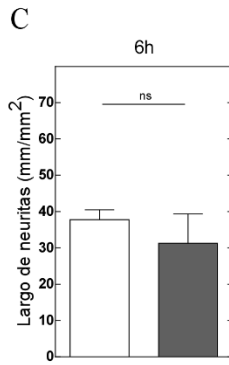
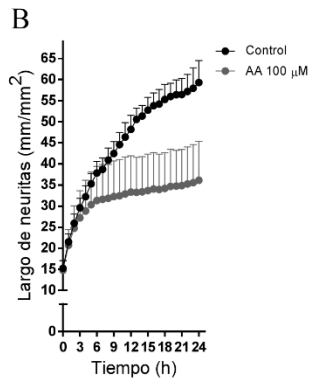
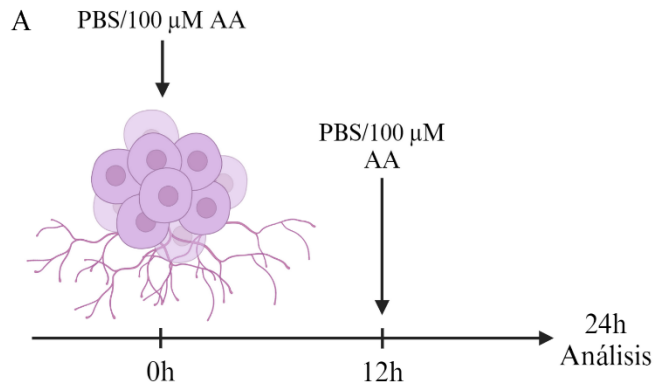


Figura 5: Efecto de AA en el crecimiento neurítico en cultivos de NE.

A. Protocolo de suplementación en NE. **B.** Análisis de largo de neuritas (en mm/mm²) en tiempo real, luego del tratamiento con 100 µM AA o PBS 1x (control) por 24 horas. **C-E.** Análisis de largo de neuritas a las 6 (**C**), 12 (**D**) y 24 (**E**) horas. **F.** Análisis de número de puntos de *branching* (por mm²) en tiempo real, luego del tratamiento con 100 µM AA o PBS 1x (control) por 24 horas. **G-I.** Análisis de puntos de *branching* a las 6 (**G**), 12 (**H**) y 24 (**I**) horas. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (**p<0,01; ***p<0,001; N=3). **J, K.** Análisis Neurotrack de procesos celulares durante el tratamiento control (**J**) o con 100 µM AA (**K**) a las 24 horas. Las neuritas están marcadas en color violeta. Barra de tamaño: 200 µm. Datos representativos de un experimento.

13.1.3. Estudio de crecimiento de neuritas en presencia de DHA

Reportes previos han definido que la acumulación de DHA en diferentes tipos celulares favorece el consumo de GSH, la inhibición de la enzima GAPDH, la activación de la vía de las pentosas fosfato e incluso puede potenciar la muerte celular (Cisternas et al., 2014; Ferrada et al., 2020; Yun et al., 2015). Mas recientemente, ha sido descrito que en presencia de inhibidores de la síntesis de GSH, DHA incrementa la muerte celular de tipo ferroptótica (Ferrada et al., 2023). En conjunto, estos datos apuntan a que el aumento en las concentraciones de DHA induce múltiples cambios celulares. De esta forma, buscamos evaluar el rol de DHA en el crecimiento de neuritas; para ello, NE adheridas fueron tratadas con PBS (control) o bien con 100, 200 o 400 μM DHA (**Figura 6 A**) por 24 horas. Similar a lo observado previamente, la cuantificación del largo de neuritas en la condición control mostró un crecimiento constante de la curva, con un largo promedio de $59,24 \pm 5,22$ mm/mm² a las 24 horas de tratamiento (**Figura 6 B**, J-L, curva negra); por otro lado, la presencia de concentraciones crecientes de DHA indujo un efecto progresivo: al tratar las NE con la menor concentración de DHA, 100 μM , logramos observar una curva con un crecimiento similar al observado condiciones control durante las primeras 5 horas aproximadamente, luego de lo cual la pendiente disminuyó, con un largo de neuritas promedio de $40,16 \pm 2,75$ mm/mm² a las 24 horas (**Figura 6 B**, curva gris claro). Un resultado similar fue observado al tratar las células con 200 μM DHA, con un largo promedio de $35,16 \pm 1,89$ mm/mm² a las 24 horas (**Figura 6 B**, curva gris). Sin embargo, el mayor

efecto fue observado en presencia de 400 μM DHA, en donde luego de un crecimiento constante durante aproximadamente 5 horas, la curva de crecimiento neurítico rápidamente alcanzó un *plateau*, que se mantuvo hasta las 24 horas, con un largo de neuritas promedio de $29,51 \pm 1,99 \text{ mm/mm}^2$ (**Figura 6 B**, M-O, curva gris oscuro). El análisis estadístico de los datos mostró que, ya luego de 6 horas de cultivo y tratamiento, la presencia de DHA indujo un largo de neuritas significativamente menor que la condición control (**Figura 6 C**), efecto que se hizo progresivamente más significativo a las 12 (**Figura 6 D**) y 24 horas (**Figura 6 E**), con el mayor efecto ejercido por el tratamiento con 400 μM DHA, y el menor efecto por el tratamiento con 100 μM de la misma molécula (**Figura 6 E**, barras gris oscuro y gris claro, respectivamente).

Resultados similares fueron observados al analizar los puntos de *branching* en las NE (**Figura 6 F**), con un crecimiento constante de la curva control y un achatamiento progresivo en las curvas en presencia de concentraciones creciente de DHA, observándose, a las 24 horas, $1594 \pm 316,0$ puntos de *branching/mm}^2 en condiciones control, y $1165 \pm 81,04$, $1171 \pm 143,7$ y $948 \pm 80,01$ puntos de *branching/mm}^2 luego del tratamiento con 100, 200 y 400 μM DHA, respectivamente (**Figura 6 F**, curvas en gris). Si bien a las 6 horas no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los puntos de *branching* entre la condición control y las diferentes concentraciones de DHA (**Figura 6 G**), y a las 12 horas sólo se detectó una disminución significativa en este parámetro en presencia de 400 μM DHA (**Figura 6 H**, barra gris oscuro), luego de 24 horas**

de cultivo y tratamiento se logró observar una disminución significativa en la formación de puntos de *branching* bajo todas las condiciones estudiadas, versus el tratamiento control (**Figura 6 I**); sin embargo, el mayor efecto fue detectado al exponer las células a la concentración más elevada de DHA (**Figura 6 I**, barra en gris oscuro).

En conjunto con lo anterior, estos resultados indican que la presencia de altas concentraciones de vitamina C oxidada induce la generación de neuritas más cortas en NE, un efecto que estaría directamente relacionado con la concentración y acumulación de esta molécula en el medio.

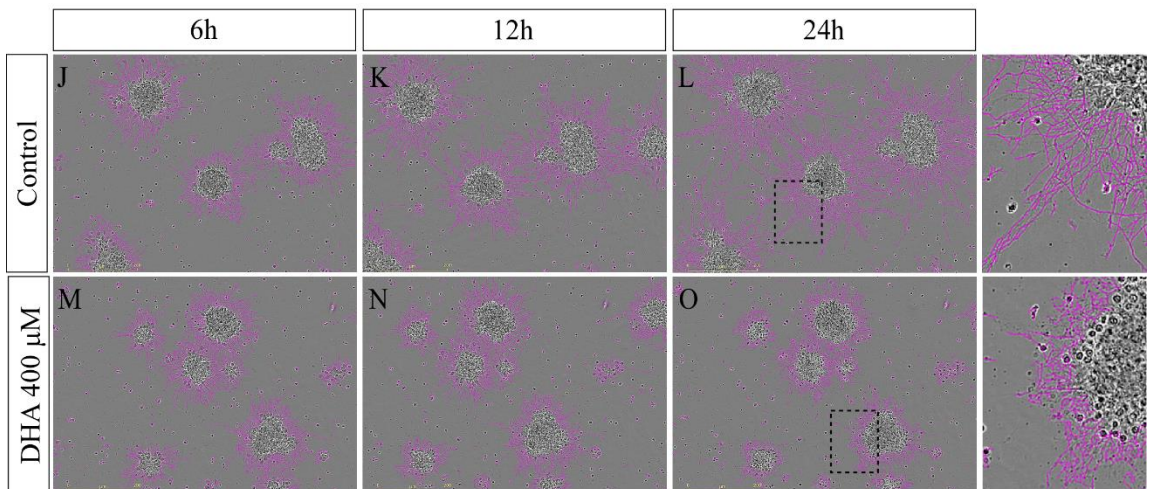
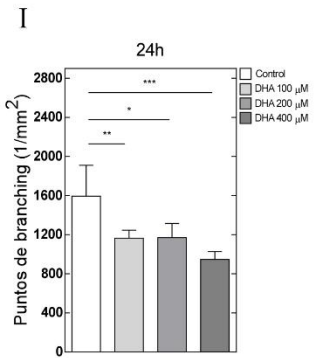
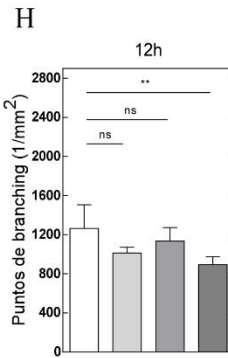
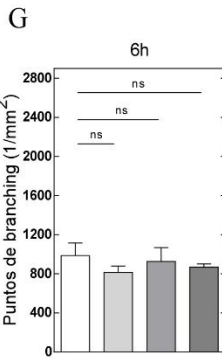
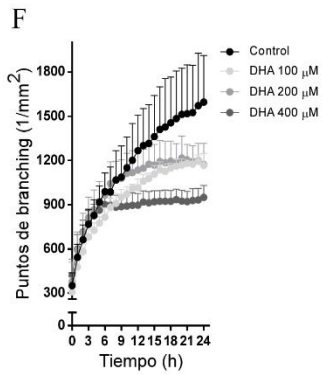
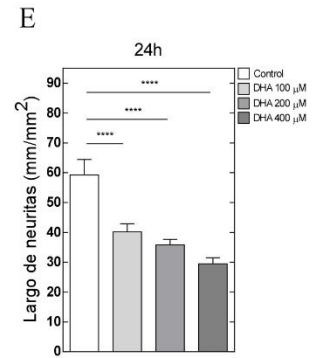
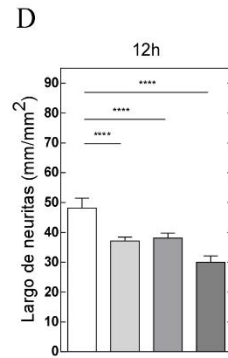
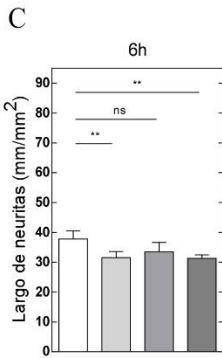
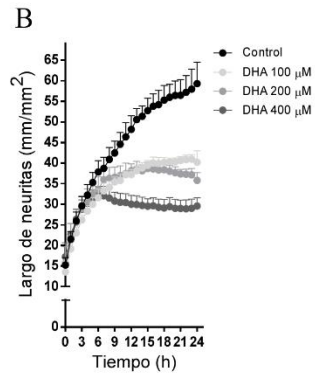
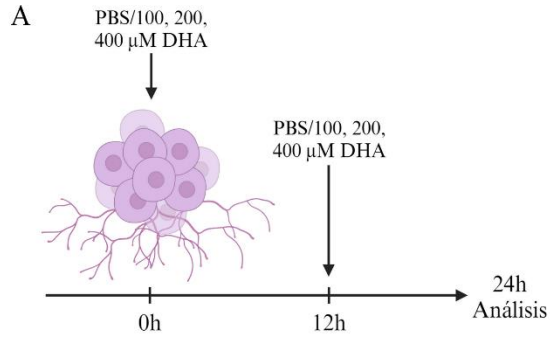


Figura 6: Efecto de concentraciones crecientes de DHA en el largo de neuritas y puntos de *branching* en NE.

A. Protocolo de suplementación con DHA. **B.** Estudio en tiempo real del largo de neuritas luego del tratamiento control o con 100, 200 o 400 μM DHA por 24 horas. **C-E.** Largo de neuritas en NE luego de 6 (**C**), 12 (**D**) y 24 (**E**) horas de tratamiento. **F.** Análisis en tiempo real de puntos de *branching* luego del tratamiento control o con 100, 200 o 400 μM DHA por 24 horas. **G-I.** Número de puntos de *branching* en NE luego de 6 (**G**), 12 (**H**) y 24 (**I**) horas de tratamiento. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; $N=5$). **J-O.** Análisis Neurotrack de neuritas luego del tratamiento control o con 400 μM DHA a las 6 (**J, M**), 12 (**K, N**) y 24 (**L, O**) horas, respectivamente. Todas las neuritas están marcadas en color violeta. Barra de tamaño: 200 μm . Datos representativos de un experimento.

13.1.4. Análisis de dinámica mitocondrial en NE

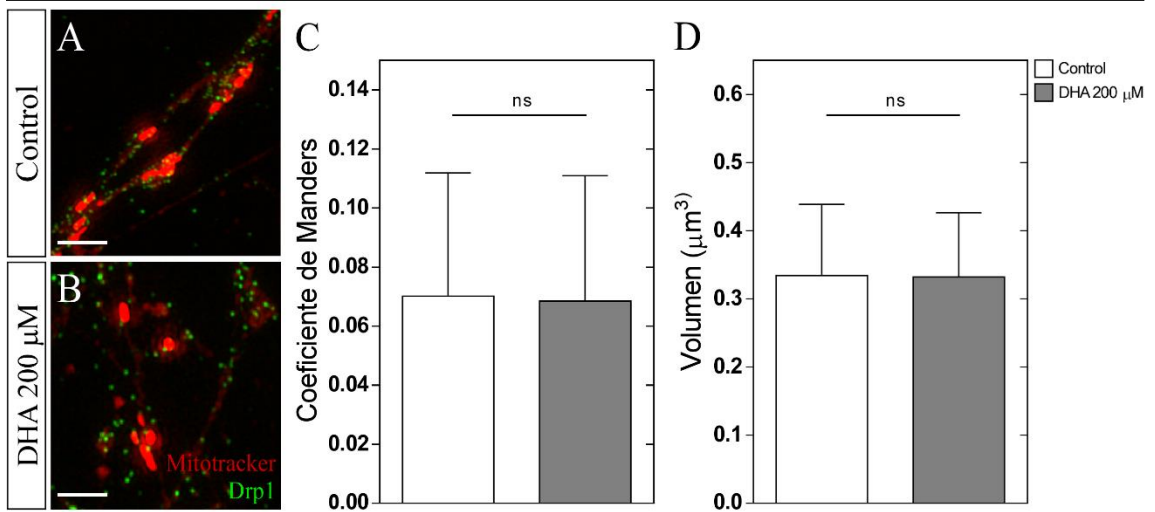
Previamente ha sido reportado que AA, en conjunto con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC), son capaces de inhibir la fisión mitocondrial mediada por la proteína Drp1 (Li et al., 2015). De esta forma, es factible esperar que la acumulación de DHA favorezca la fisión de mitocondrias. A través de microscopía de resolución SR-SIM en 3D, realizamos estudios de colocalización del marcador de mitocondrias Mitotracker CMXRos con Drp1, además de evaluar cambios en el volumen mitocondrial, en NE expuestas a DHA 200 μM por 12 y 24 horas (**Figura 7**). Luego de 12 horas de tratamiento con DHA, no observamos variaciones en el coeficiente de codistribución de Manders con respecto a la condición control (**Figura 7 A-C**), ni tampoco detectamos cambios en el volumen mitocondrial (**Figura 7 A, B, D**). De forma similar, luego de 24 horas no hubo diferencias estadísticamente significativas en el coeficiente de Manders (**Figura 7 E-G**) ni tampoco en el volumen mitocondrial (**Figura 7 E, F, H**) entre la condición control y el tratamiento con DHA.

Adicionalmente, realizamos un análisis del potencial de membrana mitocondrial a lo largo de 18 horas en presencia de concentraciones crecientes de DHA (100, 200 y 400 μM), utilizando para ello la sonda fluorescente TMRM, que se acumula en todas las mitocondrial con un potencial de membrana intacto. El análisis de intensidad de fluorescencia en el tiempo mostró, en el caso de la condición control (**Figura 8 A**, curva roja), una curva que se mantiene en el tiempo, con una intensidad promedio de $1,31 \pm 0,49 \text{ RCU}/\mu\text{m}^2/\text{imagen}$ a las 18 horas, indicando

un potencial de membrana que se mantiene (**Figura 8 B**, “control”). Por otro lado, frente al tratamiento con DHA 100 y 200 μM , logramos detectar curvas que decaen en el tiempo (**Figura 8 A**, curva azul y negra respectivamente), con una intensidad promedio de $0,40 \pm 0,52$ y $0,48 \pm 0,48$ RCU/ $\mu\text{m}^2/\text{imagen}$ a las 18 horas respectivamente, indicando una disminución en el potencial, lo cual se observa como una menor fluorescencia en las NE, principalmente en la zona externa de estas estructuras (**Figura 8 B**, “DHA 100 μM ” y “DHA 200 μM ”). Por último, el tratamiento con DHA 400 μM favorece una completa caída de la curva de intensidad de fluorescencia (**Figura 8 A**, curva verde), con una intensidad promedio a las 18 horas de $0,012 \pm 0,012$ RCU/ $\mu\text{m}^2/\text{imagen}$, indicando una pérdida en el marcaje de TMRM en las células (**Figura 8 B**, “DHA 400 μM ”) y una consecuencia pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

En conjunto, estos datos indicarían que la acumulación de DHA en NE no afectaría la dinámica, pero si el potencial de membrana en mitocondrias.

12h



24h

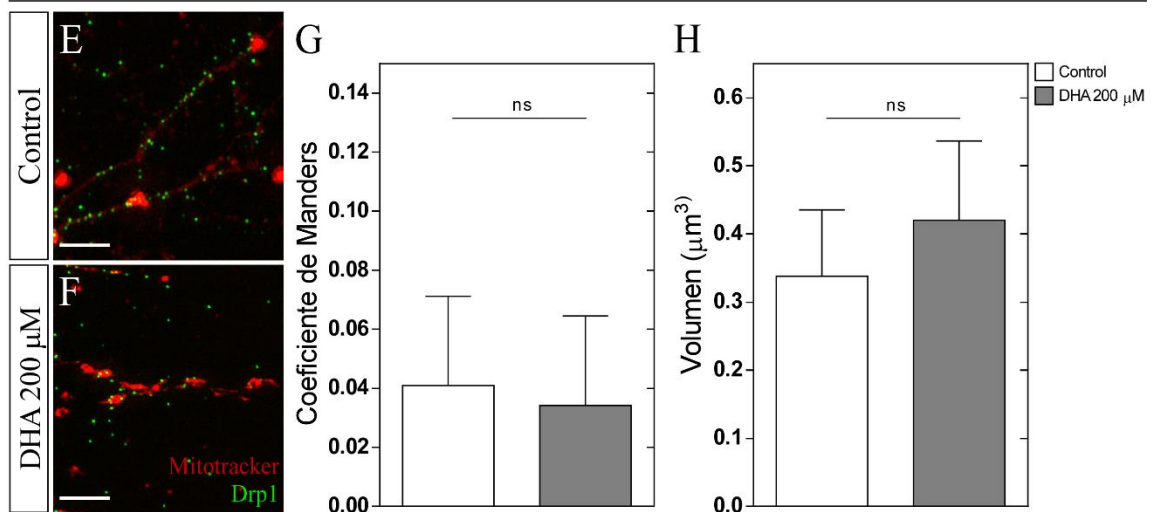


Figura 7: Análisis de dinámica mitocondrial en NE *in vitro*.

A-B, E-F. Imágenes de superresolución tomadas utilizando el marcador Mitotracker CMXRos (rojo) y el anticuerpo anti-Drp1 (verde) en NE control o tratadas con DHA 200 μ M por 12 (**A, B**) o 24 (**E, F**) horas. Barra de tamaño: 2 μ m. **C, G.** Coeficiente de co-distribución de Manders para Mitotracker y Drp1 en condiciones control o luego del tratamiento con DHA por 12 (**C**) o 24 (**G**) horas. **D, H.** Volumen mitocondrial en condiciones control o en presencia de DHA 200 μ M por 12 (**D**) o 24 (**H**) horas. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (N=3).

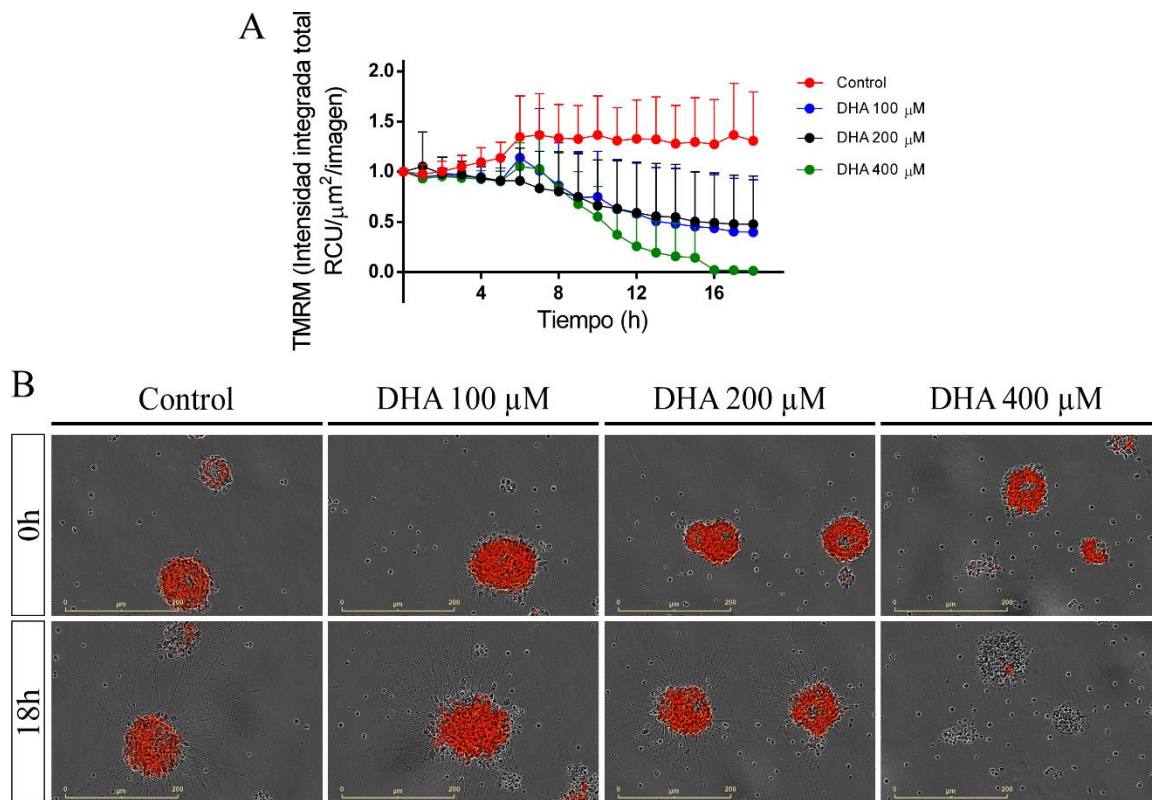


Figura 8: Análisis de potencial de membrana mitocondrial en NE expuestas a DHA por 18h.

A. Cuantificación de la intensidad de la sonda TMRM en tiempo real, luego del tratamiento de NE con PBS o 100, 200 o 400 μM DHA durante 18 horas (N=3).

B. Imágenes representativas de NE marcadas con la sonda TMRM (rojo), luego del tratamiento con PBS o DHA por 18 horas. Barra de tamaño: 200 μm .

13.1.5. Expresión de RIPK1 en NE adheridas *in vitro*

Previamente se ha reportado que la oxidación de AA con H₂O₂ puede inducir un aumento en la expresión de RIPK1 en las líneas celulares neuronales N2a y HN33.11 y en neuronas corticales *in vitro* (Ferrada et al., 2020). Considerando estos antecedentes, se realizaron análisis de PCR convencional para evaluar la expresión de RIPK1 en las NE. En NE control (**Figura 9 A**, carriles 1-2) y NE tratadas con DHA 400 μM a las 12 horas (**Figura 9 A**, carriles 3-4), logramos detectar la presencia de una banda de 199 pb correspondiente a RIPK1 y el gen *housekeeping* ciclofilina A (**Figura 9 A**). Adicionalmente, evaluamos cambios en la expresión del ARNm de RIPK1 a las 12 y 24 horas, no observando diferencias significativas en la expresión del mensajero de esta proteína luego del tratamiento con DHA, tanto a las 12 como a las 24 horas (**Figura 9 B, C**).

La expresión de RIPK1 en NE fue confirmada a través de estudios inmunocitoquímicos, logrando observar la presencia de RIPK1 en NE control de 12 y 24 horas, fundamentalmente en un patrón punteado, tanto en el citoplasma celular (**Figura 9 D**, amplificación), como en la región nuclear y a lo largo de los procesos celulares (**Figura 9 E**, amplificación). Por último, el análisis de las muestras mediante Western blot, permitió la detección de una banda de 78 kDa correspondiente a RIPK1 endógena, y 3 bandas adicionales, que representan a RIPK1 clivada (Lalaoui et al., 2020; Newton et al., 2019), siendo la banda más intensa aquella de 35 kDa, aproximadamente (**Figura 9 D**). No observamos diferencias significativas en muestras control de 12 y 24 horas, sin embargo,

luego del tratamiento con DHA 400 μ M hay una disminución significativa en la intensidad de banda para RIPK1, solo observándose aquellas bandas correspondientes a RIPK1 clivada (**Figura 9 F**).

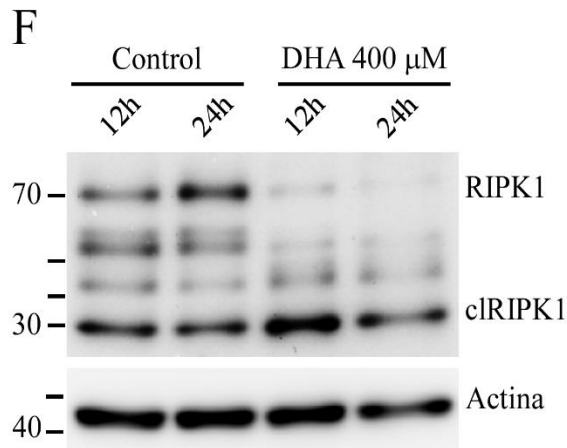
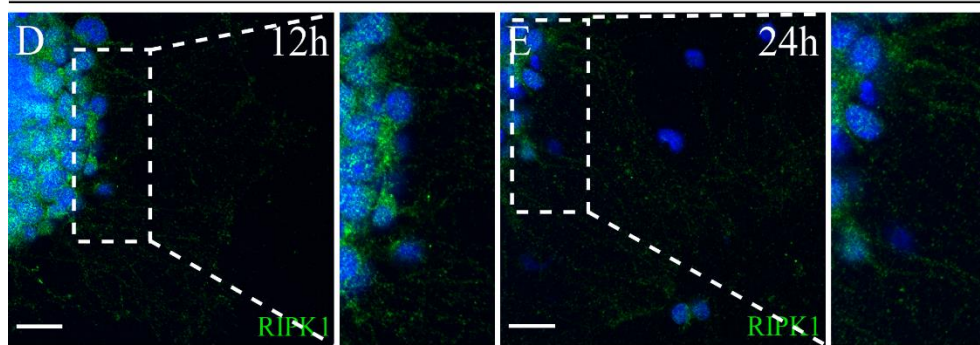
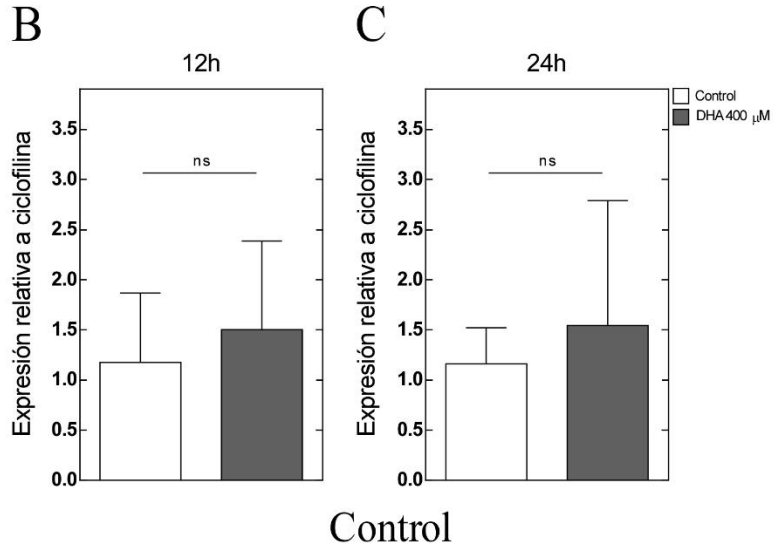
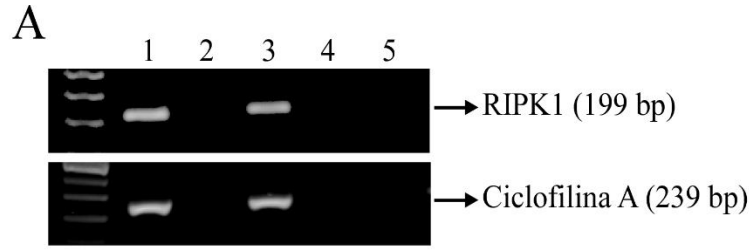


Figura 9: Expresión y localización de RIPK1 en NE *in vitro*.

A. Estudio por PCR convencional de la expresión del ARNm de RIPK1 (panel superior) y ciclofilina A (panel inferior) en NE tratadas con PBS (control, carriles 1-2) o DHA 400 μ M (carriles 3-4) durante 12 horas (RT+ carriles 1,3, RT- carriles 2, 4). Carril 9: control negativo. **B, C.** Cuantificación de los niveles del ARNm de RIPK1 luego de 12 (**B**) y 24 (**C**) horas de tratamiento control o con 400 μ M DHA. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (N=3). **D, E.** Tinción inmunocitoquímica en NE control a las 12 y 24 horas, respectivamente, utilizando anticuerpo anti-RIPK1 (verde). Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst. **F.** Estudio de Western blot de RIPK1 luego del tratamiento de NE con PBS o 400 μ M DHA por 12 y 24 horas.

13.1.6. Crecimiento neurítico en presencia de DHA y Nec-1s

Luego de confirmar la expresión de RIPK1 en NE, evaluamos el rol del inhibidor específico de RIPK1, Nec-1s, en el proceso de crecimiento de neuritas. Para ello, NE adheridas fueron tratadas con DHA 400 μ M (o PBS) por 24 horas. Adicionalmente, se realizó una suplementación única con Nec-1s 10 μ M al inicio del experimento (tiempo 0), a las 5, o a las 10 horas (**Figura 10 A**).

Similar a lo descrito anteriormente, el análisis de largo de neuritas mostró una reducción significativa luego del tratamiento con DHA por 24 horas, con respecto a la condición control (**Figura 10 B**). Cuando Nec-1s es añadida al tiempo 0 (**Figura 10 C**, curva negra) observamos una curva de crecimiento de neuritas lineal, con una pendiente similar a la observada en condiciones control (**Figura 10 B**), hasta aproximadamente la hora 15, momento en que esta decae (**Figura 10 C**, curva negra). Cuando Nec-1s es añadido a las 5 horas, observamos una curva con una pendiente significativamente menor a la descrita anteriormente, pero que describe el mismo patrón: aumenta hasta aproximadamente las 15 horas, luego de lo cual decae (**Figura 10 C**, curva gris claro). Por último, cuando el inhibidor es añadido luego de 10 horas, observamos una curva de pendiente pequeña (**Figura 10 C**, curva gris oscuro), similar a la observada sólo en presencia de DHA (**Figura 10 B**, curva gris oscuro). Si se comparan los gráficos presentados en la **Figura 10 B** y **C**, observamos que el mayor efecto sobre el crecimiento de neuritas lo produce Nec-1s añadida al tiempo 0, induciendo un largo de neuritas significativamente mayor que aquel observado sólo en

presencia de DHA (**Figura 10 B, C**), similar al observado en condiciones control (**Figura 10 D**). La adición del inhibidor a las 5 horas también induce un mayor largo de neuritas *versus* el tratamiento con DHA, pero con un efecto menos pronunciado. Por otro lado, la adición de Nec-1s a la hora 10 no induce efectos (**Figura 10 B, C**).

El análisis estadístico confirma lo descrito previamente, donde ya luego de 6 horas se puede observar un incremento significativo en el largo de neuritas cuando Nec-1s es añadida a las 0 horas, con respecto al tratamiento sólo con DHA (**Figura 10 E**). Una respuesta similar fue observada a las 12 y 24 horas, con la adición del inhibidor a la hora 5 induciendo un pequeño incremento a las 12 horas, y sin observarse cambios cuando se añade a la hora 10 (**Figura 10 F, G**). Resulta interesante mencionar que, en todos los casos, la significancia de este efecto disminuye a medida que transcurre el tiempo (**Figura 10 E-G**), sugiriendo que la acción de Nec-1s sobre las neuritas no es prolongada.

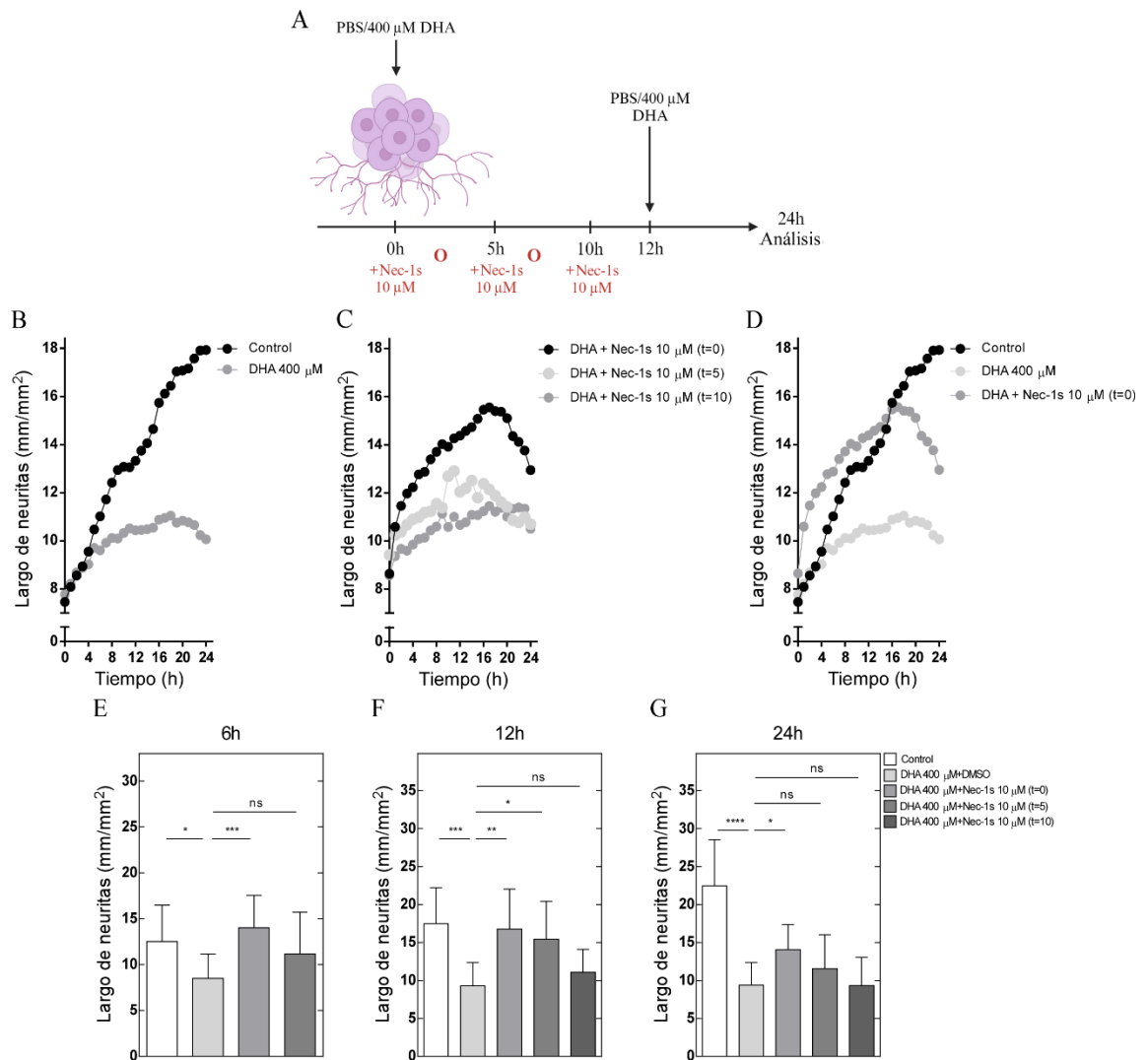


Figura 10: Efecto de Nec-1s sobre el largo de neuritas en NE.

A. Las NE se trataron con PBS 1x o 400 μ M DHA por 24 horas. Adicionalmente, se suplementó con una dosis de Nec-1s 10 μ M a la hora 0, hora 5 u hora 10. **B.** Largo de neuritas en NE luego del tratamiento control o con DHA por 24 horas. **C.** Análisis de largo de neuritas en NE tratadas con DHA y 10 μ M Nec-1s, añadida a la hora 0 (t=0), 5 (t=5) o 10 (t=10). **D.** Gráfico representativo del largo de neuritas en NE luego del tratamiento control, con 400 μ M DHA, o DHA más 10 μ M Nec-1s, añadida al tiempo 0, en un período de 24 horas. **E-G.** Largo de neuritas luego de 6 (**E**), 12 (**F**) y 24 (**G**) horas de tratamiento. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; N=3). Datos representativos de un experimento.

El análisis de formación de puntos de *branching* en las NE arrojó resultados similares, donde el tratamiento con DHA indujo una disminución significativa en este parámetro con respecto al tratamiento control (**Figura 11 A**) y la adición de Nec-1s tuvo un efecto tiempo-dependiente, donde su suplementación al tiempo 0 indujo un incremento significativo en el *branching* con respecto al tratamiento sólo con DHA, similar a lo observado en condiciones control (**Figura 11 A-C**); por otro lado, la adición del inhibidor luego de 5 horas de iniciado el experimento también favoreció un incremento en la formación de puntos de *branching* con respecto al tratamiento con DHA (**Figura 11 A, B**), pero con un efecto mucho menos pronunciado que a las 0 horas (**Figura 11 B**, curva gris claro *versus* curva negra). Por último, la adición de Nec-1s a la hora 10 no indujo ningún efecto, formándose un número de ramificaciones similar al observado en presencia de DHA por sí solo (**Figura 11 B**). Nuevamente, estos resultados son respaldados por el análisis cuantitativo: tanto a las 6, como 12 y 24 horas, la adición de Nec-1s indujo un incremento significativo en la formación de puntos de *branching* con respecto al tratamiento sólo con DHA, mientras que la adición del inhibidor a las 5 o 10 horas no favoreció un aumento estadísticamente significativo en este parámetro (**Figura 11 D-F**).

En conjunto con lo anterior, estos resultados apuntan a que el efecto inducido por DHA en las neuritas estaría asociado a RIPK1, cuya activación puede ser inhibida por Nec-1s.

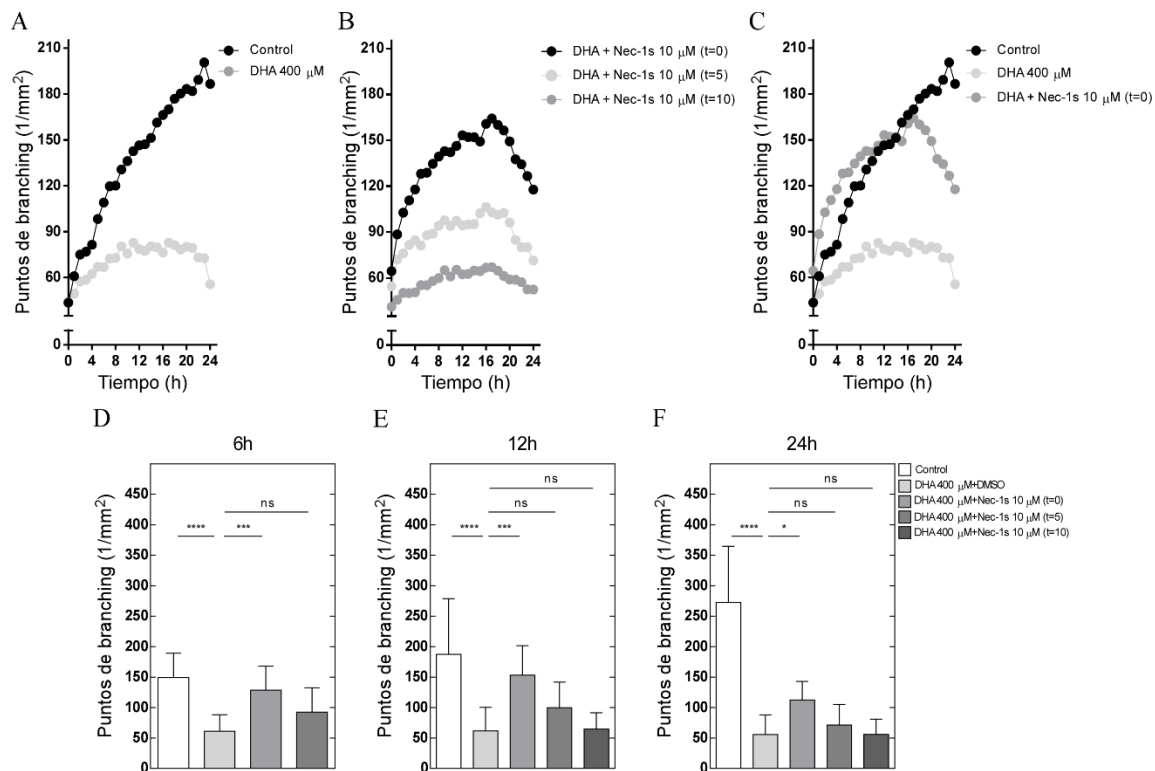


Figura 11: Efecto de Nec-1s sobre los puntos de *branching* en NE.

A. Estudio en tiempo real del número de puntos de *branching* en NE luego del tratamiento control o con 400 μM DHA por 24 horas. **B.** Análisis de los puntos de *branching* en NE tratadas con DHA y 10 μM Nec-1s, añadida a las 0, 5 o 10 horas. **C.** Gráfico representativo de los puntos de *branching* en NE luego del tratamiento control, con DHA, o DHA más 10 μM Nec-1s, añadida a las 0 horas, por 24 horas. **D-F.** Cuantificación de puntos de *branching* luego de 6 (**D**), 12 (**E**) y 24 (**F**) horas de cultivo. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; N=3). Datos representativos de un experimento.

13.1.7. Activación temprana de RIPK1

Los resultados observados la **Figura 10 E** y **Figura 11 D** indican que la presencia de Nec-1s desde el inicio del experimento induce, luego de sólo 6 horas, un mayor largo de neuritas y un mayor *branching* en las NE. Por otro lado, la adición de Nec-1s a las 5 horas induce un efecto menos significativo que el descrito anteriormente. En conjunto, esto sugiere que el efecto de DHA podría estar asociado a una activación temprana de RIPK1. De esta forma, las NE fueron tratadas con DHA 400 μ M (o PBS, en el caso de los controles) por 1 hora, en presencia o ausencia de Nec-1s 10 μ M, añadida al tiempo 0 (**Figura 12 A**); posteriormente, se realizaron ensayos de Western blot para evaluar la fosforilación de RIPK1.

En todas las muestras analizadas logramos la detección de RIPK1 endógena (**Figura 12 B**). Por otro lado, luego del tratamiento con DHA observamos un aumento estadísticamente significativo en la intensidad de banda correspondiente a RIPK1 fosforilada (**Figura 12 B, C**), con respecto al tratamiento control, resultado que es revertido significativamente en presencia de Nec-1s 10 μ M (**Figura 12 C**), confirmando la hipótesis de que, el efecto inducido por DHA en el crecimiento neurítico, estaría asociado a una activación temprana de RIPK1.

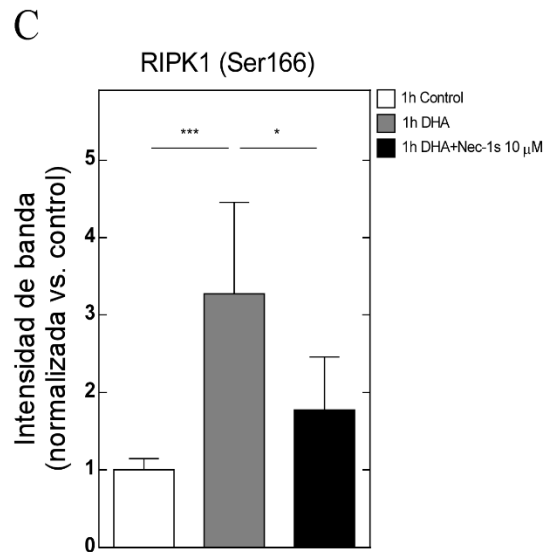
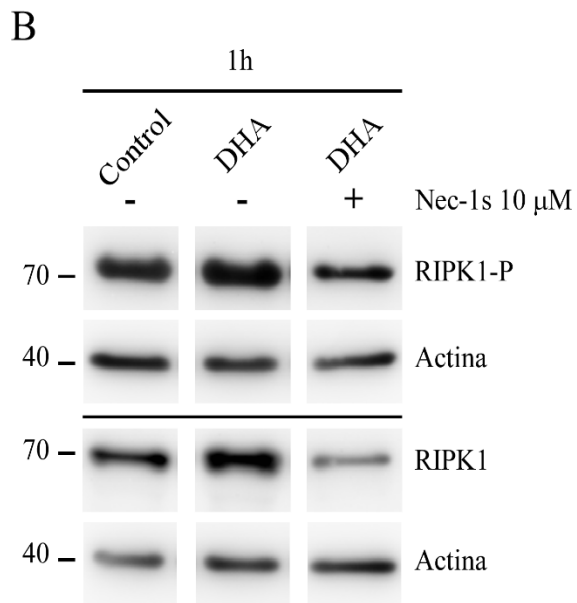
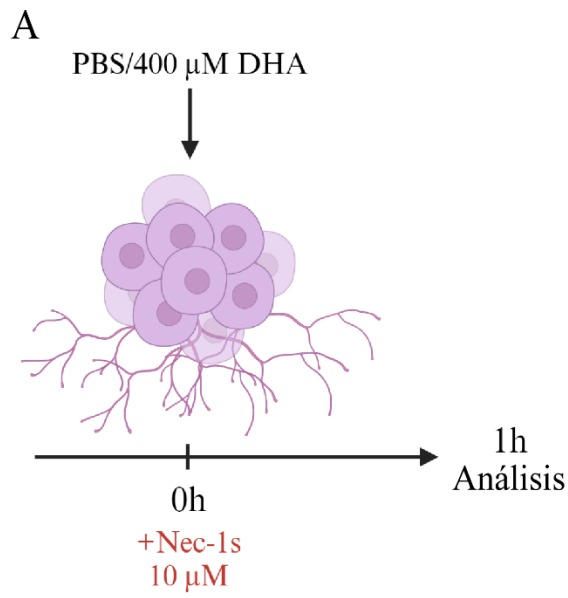


Figura 12: Expresión de RIPK1 fosforilada en NE luego del tratamiento con DHA y Nec-1s por 1h.

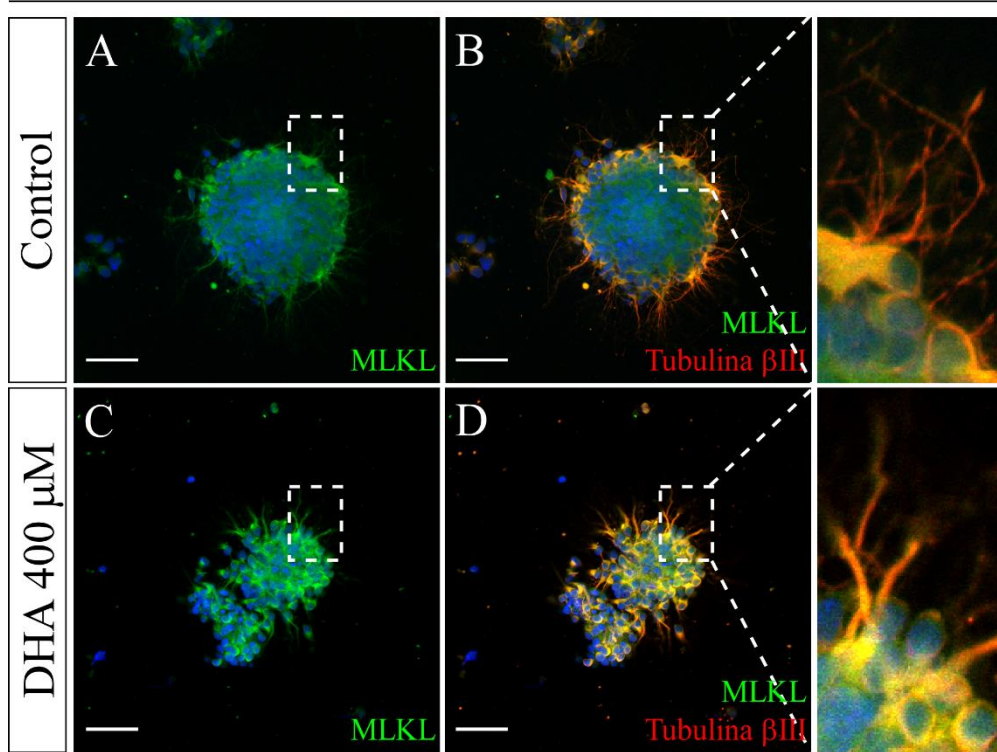
A. Las NE fueron tratadas con PBS 1x, DHA 400 μ M o DHA más Nec-1s 10 μ M. Los análisis se realizaron luego de 1 hora. **B.** Análisis de Western blot de RIPK1 fosforilada (Ser166) y endógena, luego de 1 hora de tratamiento. **C.** Cuantificación de la banda correspondiente a RIPK1-P, normalizada con respecto a la condición control. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,5$; *** $p < 0,001$; N=3).

13.1.8. Expresión de MLKL en NE *in vitro*

Posteriormente, analizamos la expresión de la proteína efectora de la necroptosis, MLKL, en NE control o bien tratadas con DHA 400 μ M durante 12 o 24 horas (**Figura 13**).

Luego de 12 horas, tanto en NE control como tratadas con DHA observamos la presencia de MLKL en toda la estructura celular (**Figura 13 A, C**), destacándose además su expresión en los procesos celulares positivos a tubulina β III (**Figura 13 B, D**) y una mayor intensidad en la tinción anti-MLKL en células tratadas con DHA (**Figura 13 C, D**). Por otro lado, en NE control de 24 horas también logramos la detección de esta proteína (**Figura 13 E**), sin embargo, observamos un marcaje menos intenso en los procesos celulares con respecto a las condiciones anteriores (Figura 13 F). Por último, luego de 24 horas de tratamiento con DHA 400 μ M sólo logramos la detección de algunas células y no se observaron procesos; de esta forma, la tinción anti-MLKL se observó fundamentalmente en la región intracelular y en restos celulares (Figura 13 G, H).

12h



24h

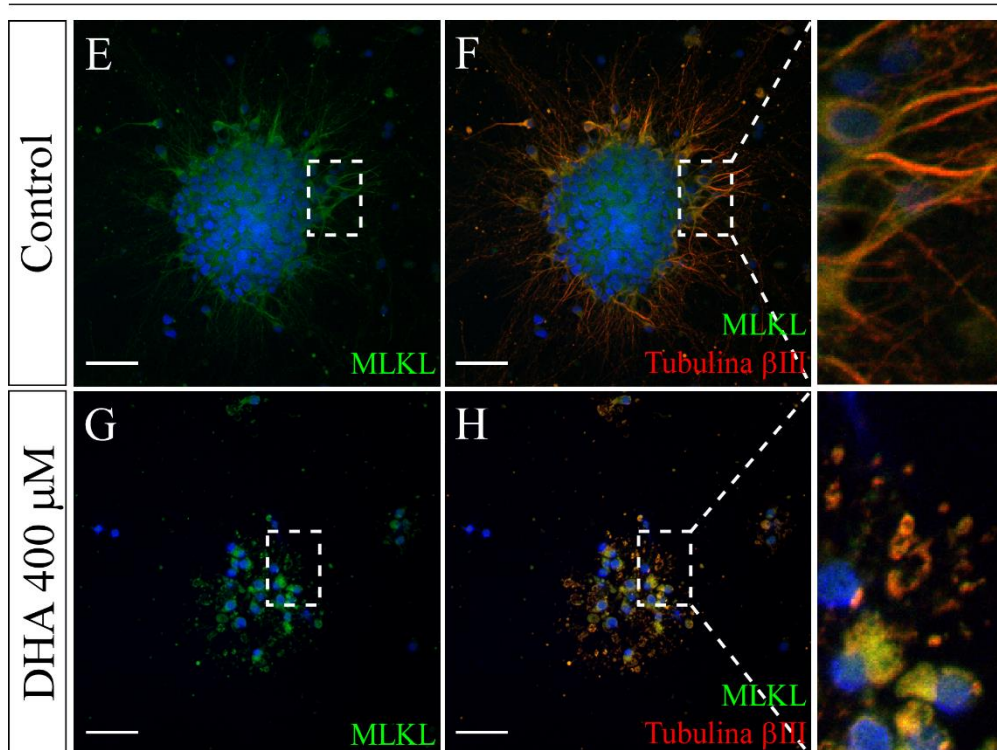


Figura 13: Expresión de MLKL en NE in vitro.

A-D. Tinción inmunocitoquímica en NE control (**A, B**) o tratadas con DHA 400 μ M (**C, D**) durante 12 horas, utilizando anticuerpos específicos anti-MLKL (**A-D**, verde) y anti-tubulina β III (**B, D**, rojo). **E-H.** Tinción inmunocitoquímica en NE control (**E, F**) o tratadas con DHA 400 μ M (**G, H**) durante 24 horas, utilizando anticuerpos específicos anti-MLKL (**E-H**, verde) y anti-tubulina β III (**F, H**, rojo). Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

13.1.9. Estudio de crecimiento neurítico en presencia de DHA y zVAD

Reportes previos han establecido que RIPK1 también puede participar de la vía apoptótica (Dondelinger et al., 2013; Tang et al., 2019; Zhang, Zhang, et al., 2019). De esta forma, evaluamos si el efecto de DHA sobre los procesos celulares está asociado a un mecanismo dependiente de caspasas. Para ello, las NE fueron tratadas con DHA 400 μ M por 24 horas; adicionalmente se realizó una única suplementación con el inhibidor de pan-caspasa zVAD.FMK (zVAD) a una concentración final de 50 μ M, añadida al inicio del experimento (tiempo 0), a las 5 horas, o a las 10 horas (**Figura 14 A**).

Como ya hemos descrito previamente, el tratamiento con DHA por 24 horas indujo un largo de neuritas significativamente menor con respecto al tratamiento control (**Figura 14 B**). Por otro lado, la adición de zVAD 50 μ M, ya sea a la hora 0, hora 5 u hora 10, generó una curva de largo de neuritas con una pendiente similar a la observada en condiciones control (**Figura 14 C**) y significativamente mayor a la observada en presencia de DHA. En la **Figura 14 D** se muestra un gráfico representativo de este efecto.

El análisis cuantitativo realizado a las 6 horas no mostró diferencias significativas en el largo de neuritas entre la condición tratada con DHA y la condición con DHA más zVAD (**Figura 14 E**); sin embargo, a las 12 horas detectamos un incremento significativo en el largo de neuritas luego de la adición de zVAD a las 0 y 10 horas (**Figura 14 F**). Por último, luego de 24 horas de tratamiento observamos que la

presencia de zVAD, añadida a las 0, 5 o 10 horas, induce neuritas significativamente más largas que sólo en presencia de DHA (**Figura 14 G**).

Resultados similares fueron observados al analizar el *branching* en NE, con una reducción significativa en este parámetro en presencia de DHA *versus* el tratamiento control (**Figura 15 A**) y con la adición de zVAD a las 0, 5 o 10 horas teniendo un efecto similar entre sí, con curvas de puntos de *branching* de pendiente similar a la observada en el control, y mayor a la detectada en presencia de DHA (**Figura 15 B, C**).

En este caso, la cuantificación realizada luego de 6 horas de cultivo y tratamiento mostró un incremento estadísticamente significativo en el número de puntos de *branching* cuando zVAD es suplementado al tiempo 0, con respecto al tratamiento sólo con DHA (**Figura 15 D**); luego, a las 12 horas se observa un aumento en el número de ramificaciones al añadir zVAD a las 0 y 10 horas (**Figura 15 E**). Similar a lo anterior, la adición de zVAD a cualquier hora genera ramificaciones significativamente más numerosas que en presencia de DHA, luego de 24 horas de tratamiento (**Figura 15 F**).

Así, los datos presentados hasta el momento sugieren que elevadas concentraciones de DHA pueden inducir la formación de procesos celulares significativamente más cortos, con un menor número de puntos de ramificación, fundamentalmente a través de un mecanismo asociado a la activación de RIPK1 y dependiente de caspasas.

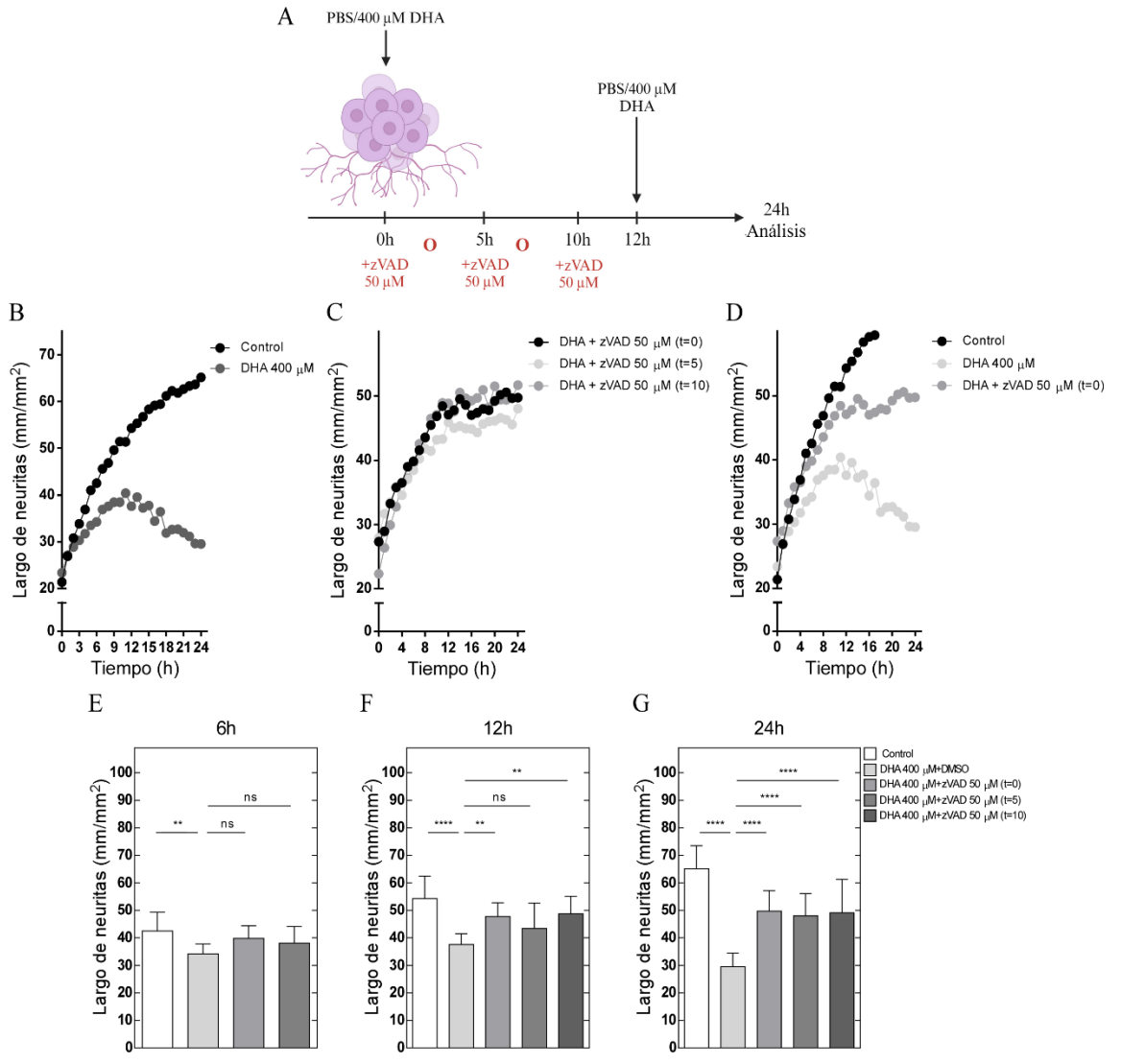


Figura 14: Efecto de zVAD-FMK sobre el largo de neuritas en NE *in vitro*.

A. Las NE fueron tratadas con PBS 1x o 400 μ M DHA por 24 horas. Adicionalmente, las células se suplementaron con una dosis de zVAD 50 μ M a la hora 0, hora 5 u hora 10. **B.** Largo de neuritas en NE luego del tratamiento control o con DHA por 24 horas. **C.** Análisis de largo de neuritas en NE tratadas con DHA y 50 μ M zVAD, añadida a la hora 0 (t=0), 5 (t=5) o 10 (t=10). **D.** Gráfico representativo del largo de neuritas en NE luego del tratamiento control, con 400 μ M DHA, o DHA más 50 μ M zVAD, añadida al tiempo 0, en un período de 24 horas. **E-G.** Largo de neuritas luego de 6 (**E**), 12 (**F**) y 24 (**G**) horas de tratamiento. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (**p<0,01; ****p<0,0001; N=3). Datos representativos de un experimento.

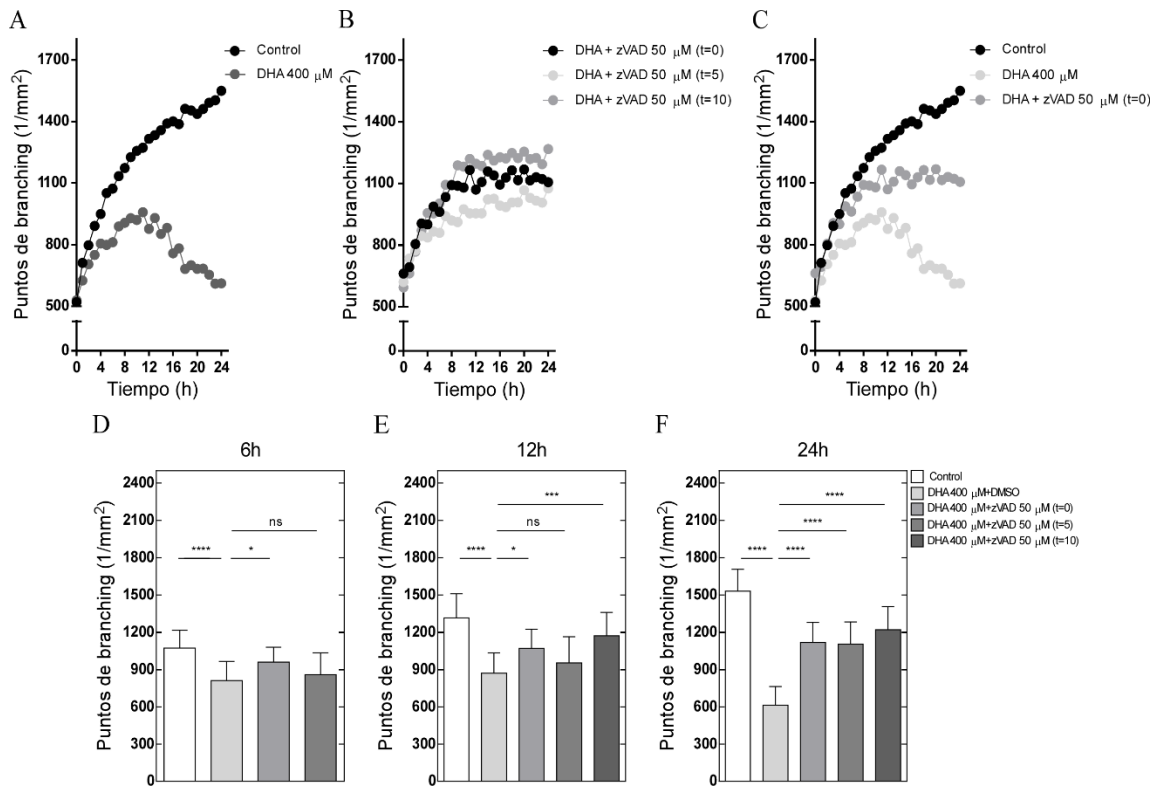


Figura 15: Efecto de zVAD-FMK sobre el número de puntos de *branching* en NE *in vitro*.

A. Estudio en tiempo real del número de puntos de *branching* en NE luego del tratamiento control o con 400 µM DHA por 24 horas. **B.** Análisis de los puntos de *branching* en NE tratadas con DHA y 50 µM zVAD, añadida a las 0, 5 o 10 horas. **C.** Gráfico representativo de los puntos de *branching* en NE luego del tratamiento control, con DHA, o DHA más 50 µM zVAD, añadida a las 0 horas, por 24 horas. **D-F.** Cuantificación de puntos de *branching* luego de 6 (D), 12 (E) y 24 (F) horas de cultivo. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (*p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001; N=3). Datos representativos de un experimento.

13.2. Capítulo 2: Definir la expresión y función de SVCT2/GLUT1 en neuronas motoras diferenciadas desde células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs) *in vitro* y demostrar si el tratamiento con DHA daña los procesos neuríticos

13.2.1. Caracterización de MNs

Para el desarrollo del siguiente objetivo, propusimos trabajar con neuronas motoras (MNs) obtenidas a partir de la diferenciación de células progenitoras humanas. De esta forma, en una primera etapa caracterizamos células diferenciadas desde distintos modelos celulares, algunos de los cuales fueron donados ya diferenciados (células HUES9 y hiMNs *TDP43*), lo cual limitó su caracterización. De forma paralela, se adquirieron la línea de células humanas AF22 y las iPSCs *C9ORF72*.

La primera caracterización fue realizada utilizando MNs diferenciadas a partir de la línea celular HUES9, que deriva de células madre embrionarias humanas. Luego de 32 días de diferenciación observamos células de morfología poco polarizada, positivas para el transportador de AA, SVCT2, el marcador de retículo endoplásmico KDEL y una leve reacción para la proteína presináptica Piccolo (**Figura 16**).

Adicionalmente, se realizó un análisis inmunocitoquímico durante el proceso de diferenciación (**Figura 17**); así, luego de 5 días *in vitro* (DIV) podemos observamos inmunorreacción positiva para SVCT2 (**Figura 17 A, D, verde**), cuya

expresión aumentó durante la diferenciación (**Figura 17 U**), junto con un aumento progresivo en la expresión de neurofilamentos (NF) (**Figura 17 B, F, J, N, R**). Por otro lado, la mayor expresión del transportador de DHA, GLUT1, fue observada a los 5 DIV (**Figura 17 C, D, blanco**), para luego disminuir significativamente hacia los 32 días de diferenciación (**Figura 17 C, S, V**).

El segundo modelo caracterizado, fueron MNs espinales diferenciadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), obtenidas a partir de un paciente control, o bien un paciente varón de 56 años con diagnóstico de ALS, con la mutación M337V (Met³³⁷→Val) en el gen *TDP43* (Bilican et al., 2012), el cual codifica para la proteína del mismo nombre y ha sido ampliamente asociada al desarrollo de ALS (Brown y Al-Chalabi, 2017).

El primer análisis inmunocitoquímico se realizó en hiMNs (*human induced motor neurons*) derivadas de pacientes control, diferenciadas durante 28 días *in vitro* (**Figura 18**). Así, observamos la presencia de SVCT2 en todo el cuerpo celular (**Figura 18 A**), destacándose su distribución a la forma de *puncta*, en los bordes de estructuras que se asemejan a filopodias y lamelipodias (**Figura 18 Inset 1 y 2**), los cuales además colocalizan con la proteína presináptica Piccolo (**Figura 18 D e Inset 1 y 2**), que también se observa distribuida a la forma de *puncta* y concentrada en los bordes celulares (**Figura 18 B**). Además, hemos logrado detectar una reacción positiva para el marcador de retículo KDEL (**Figura 18 C**).

HUES9 32 DIV

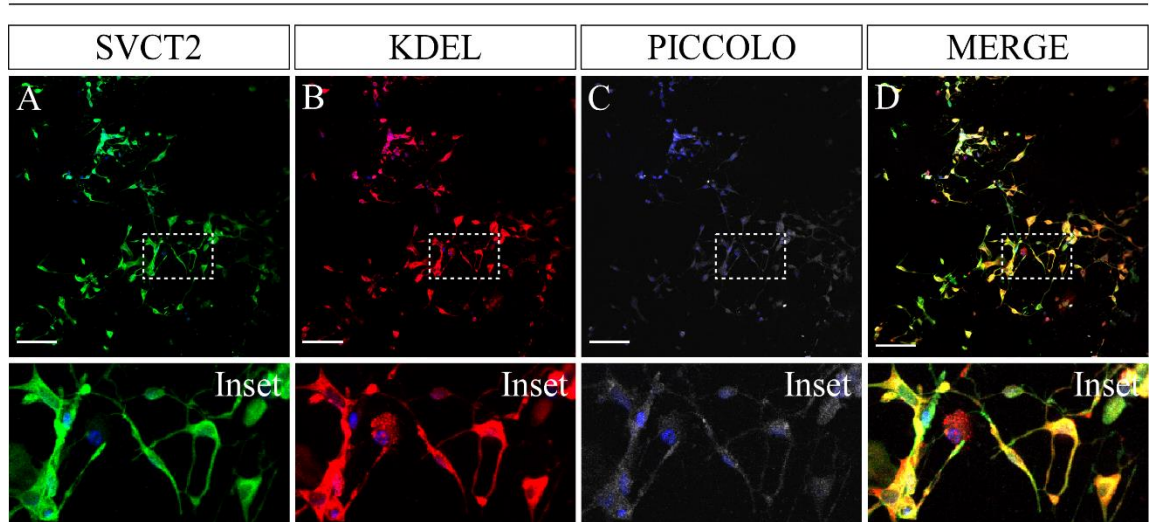


Figura 16: Expresión de marcadores en MNs derivadas de células HUES9.

A-C. Análisis inmunocitoquímico de MNs a los 32 DIV, diferenciadas desde células HUES9, utilizando anticuerpos anti-SVCT2 (**A**, verde), anti-KDEL (**B**, rojo) y anti-Piccolo (**C**, blanco). Barra de tamaño: 100 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

HUES9

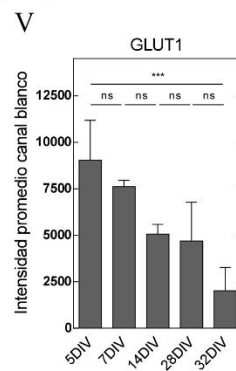
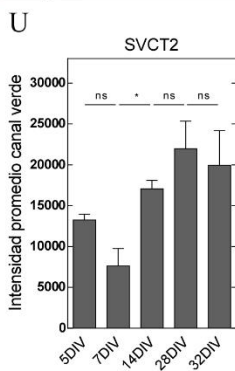
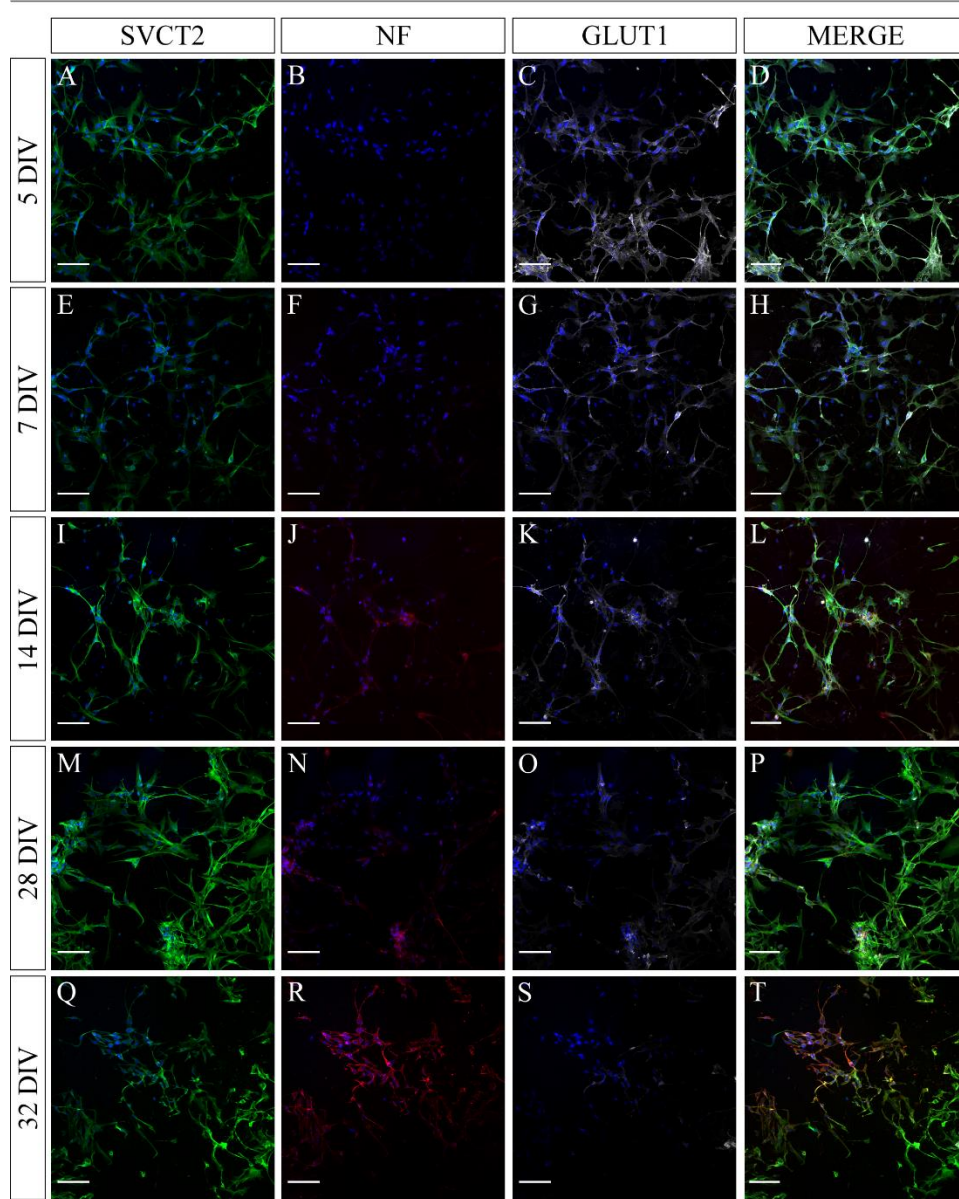


Figura 17: Diferenciación de neuronas motoras a partir de línea celular HUES9.

A-T. Análisis inmunocitoquímico de la diferenciación de la línea celular HUES9 hacia MNs, luego de 5 DIV (**A-D**), 7 DIV (**E-H**), 14 DIV (**I-L**), 28 DIV (**M-P**) y 32 DIV (**Q-T**), utilizando anticuerpos específicos anti-SVCT2 (verde), anti-neurofilamento (rojo) y anti-GLUT1 (blanco). Barra de tamaño: 100 μm . Tinción nuclear: Hoechst. **U.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio del canal verde, correspondiente al marcaje con anticuerpo anti-SVCT2, durante la diferenciación de MNs. **V.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio del canal blanco, correspondiente al marcaje con anticuerpo anti-GLUT1, durante la diferenciación de MNs, a partir de células HUES9. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n=3$; $N=3$).

hiMNs control 28 DIV

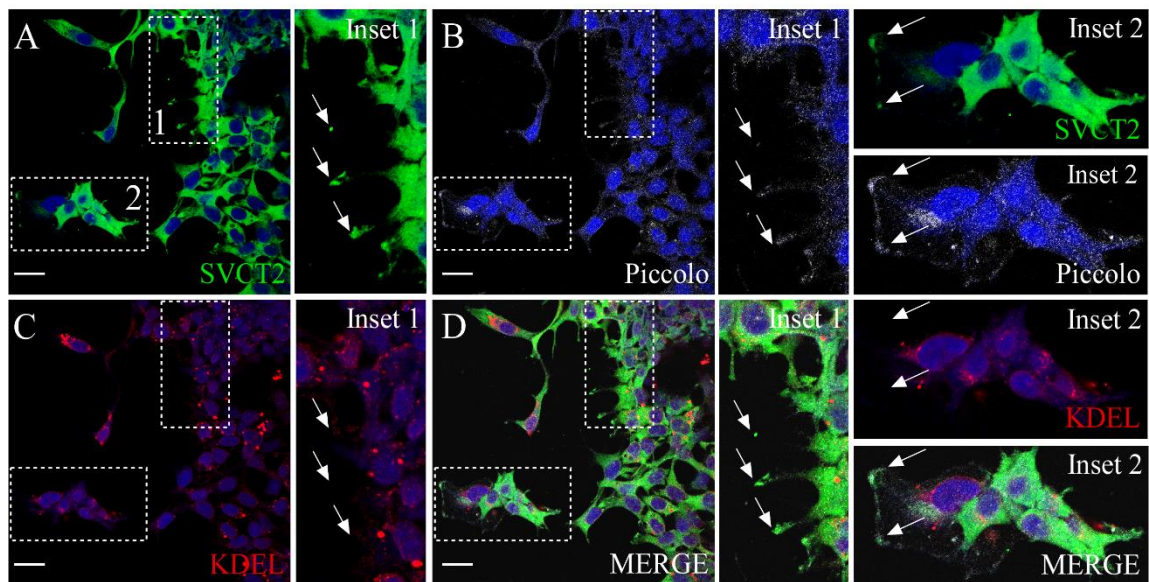


Figura 18: Expresión de marcadores celulares en hiMNs derivadas de iPSCs *TDP43*.

A-C. Tinción inmunocitoquímica en hiMNs control, de 28 DIV, utilizando anticuerpos anti-SVCT2 (**A**, verde), anti-Piccolo (**B**, blanco) y anti-KDEL (**C**, rojo).

D. Superposición de canales. Barra de tamaño: 10 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

En hiMNs control y hiMNs *TDP43* observamos la expresión de SVCT2, en verde (**Figura 19 A, E**), GLUT1, en rojo (**Figura 19 C, G**) y una leve expresión de neurofilamentos (NF), en blanco (**Figura 19 C, D**). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio de los canales verde y rojo revelaron una disminución significativa en la intensidad promedio del canal verde, correspondiente a SVCT2 (**Figura 19 I**), junto con un aumento estadísticamente significativa en la intensidad promedio del canal rojo, correspondiente a GLUT1 (**Figura 19 J**).

En conjunto, la caracterización de MNs obtenidas a partir de células HUES9 e iPSCs de pacientes sanos sugiere que, durante el proceso de diferenciación de estas células, la expresión de SVCT2 aumenta mientras que la de GLUT1 disminuye. Por el contrario, en presencia de mutaciones en genes como *TDP43* la situación sería inversa, con una disminución en la expresión de SVCT2 y un aumento en la expresión de GLUT1.

Debido a la imposibilidad de continuar nuestros análisis con la línea celular HUES9 o iPSCs *TDP43*, dado el cese de su donación, continuamos el trabajo de esta tesis utilizando la línea celular AF22, la cual deriva de iPSCs obtenidas desde pacientes sanos y posee características de neuroepitelio (Falk et al., 2012). De esta forma, estandarizamos un protocolo de diferenciación hacia MNs espinales (**Figura 20 A-E**), generando células que presentan morfología neuronal, con largos procesos celulares y arborizaciones (**Figura 20 H**); además,

presentaron inmunorreacción positiva para el marcador presináptico, vesícula sináptica 2 (SV2) (**Figura 20 G, H e Inset 1**), y colina acetiltransferasa (ChAT) (**Figura 20 F, H e Inset 1**), enzima limitante para la síntesis de acetilcolina y marcador de maduración en MNs (Maury et al., 2015). Las células diferenciadas también expresan factor de transcripción HB9 (**Figura 20 I, K**), marcador de MNs, y GLUT1 (**Figura 20 J, K**), fundamentalmente en la membrana celular (**Figura 20 Inset 2**).

hiMNs 28 DIV

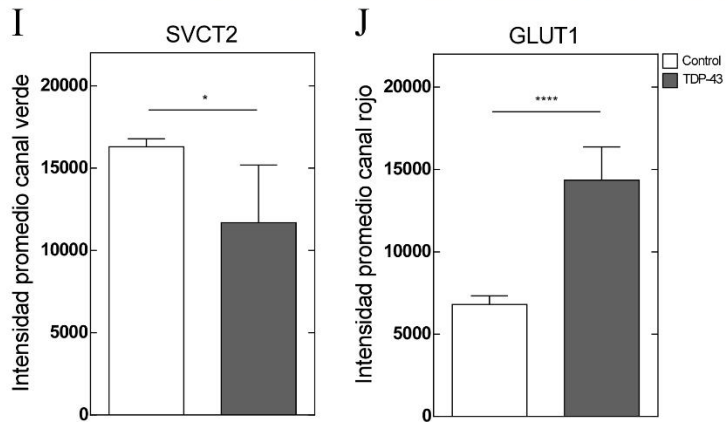
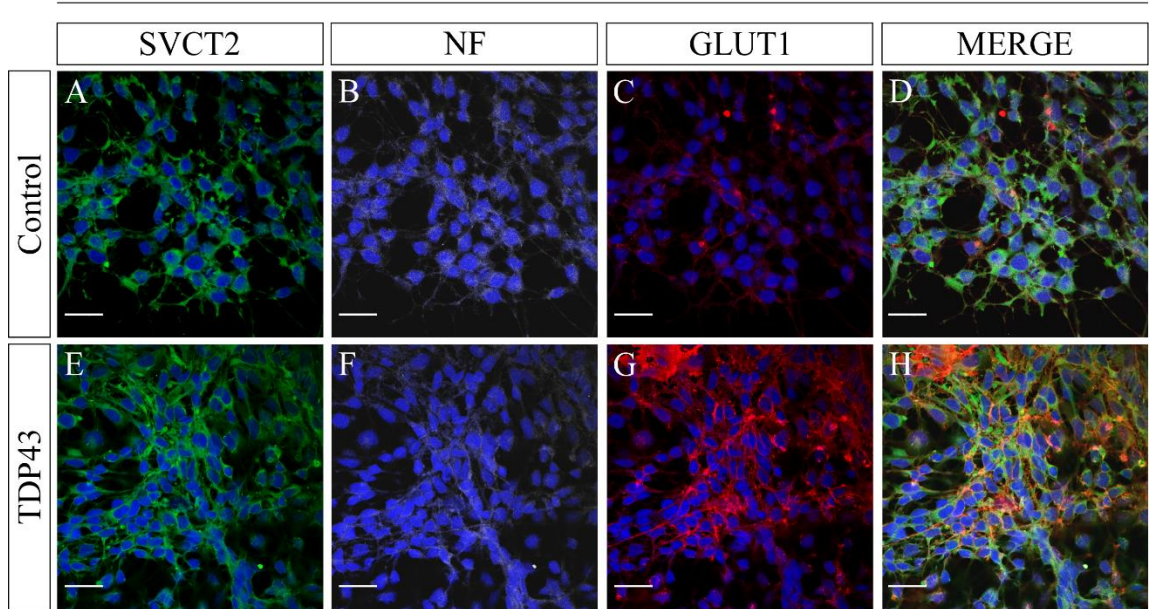


Figura 19: Caracterización de hiMNs derivadas de iPSCs *TDP43*.

A-C. Análisis inmunocitoquímico de hiMNs control a los 28 DIV, utilizando anticuerpos específicos anti-SVCT2 (**A**, verde), anti-neurofilamentos (**B**, blanco) y anti-GLUT1 (**C**, blanco). **D.** Superposición de canales. **E-G.** Tinción inmunocitoquímica de hiMNs *TDP43* a los 28 DIV, utilizando anticuerpos anti-SVCT2 (**E**, verde), anti-neurofilamentos (**F**, blanco) y anti-GLUT1 (**G**, rojo). **H.** Superposición de canales. Barra de tamaño: 100 μ m. Tinción nuclear: Hoechst. **I.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio del canal verde (SVCT2) en hiMNs control y *TDP43*. **J.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio del canal rojo (GLUT1) en hiMNs control y *TDP43*. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; $N=3$).

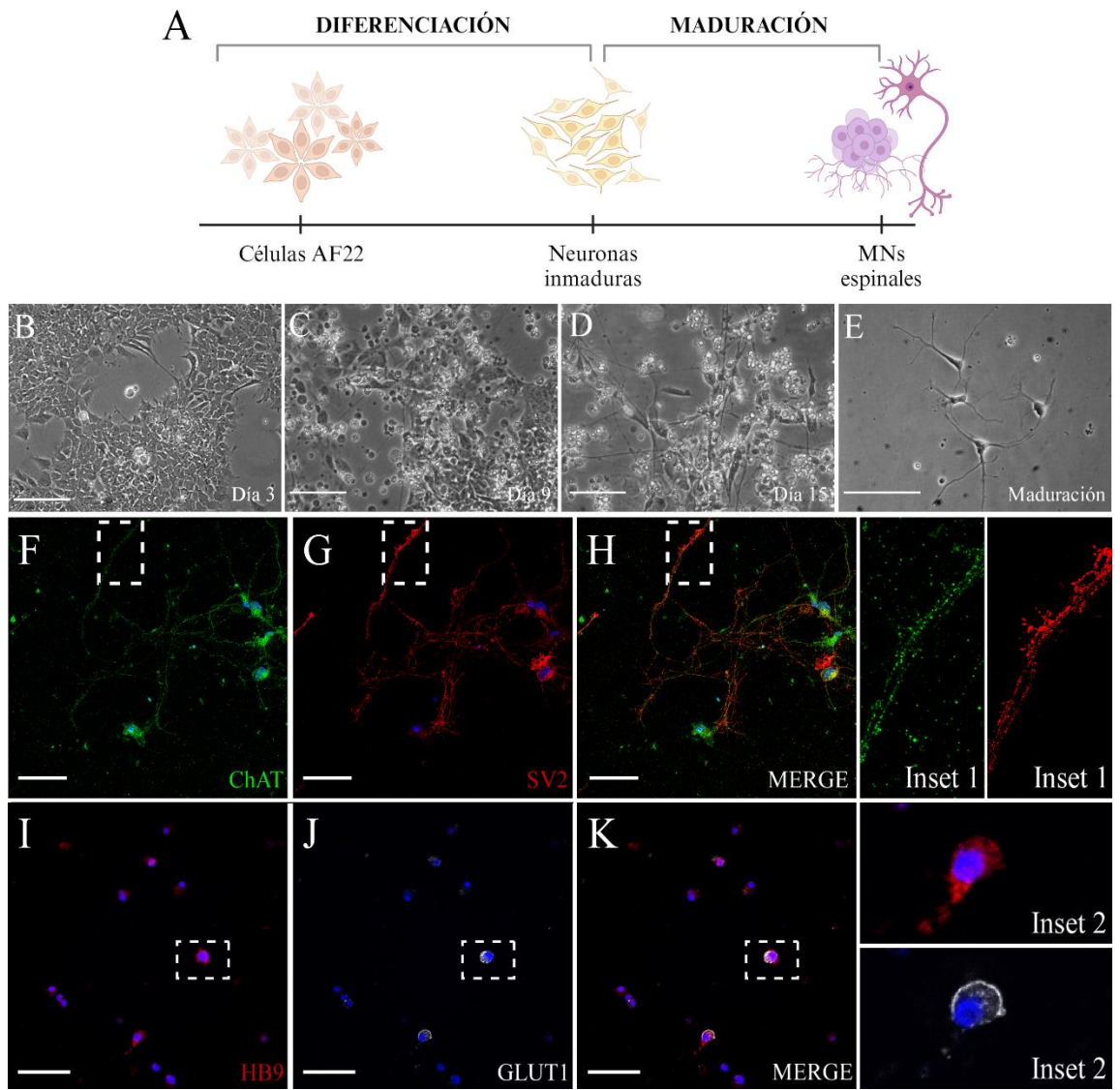


Figura 20: Caracterización de marcadores celulares en MNs espinales derivadas de células AF22.

A. Esquema de la obtención de MNs espinales a partir de células AF22. **B-E.** Imágenes de contraste de fases, tomadas durante la diferenciación de células AF22 al día 3 (**B**), 9 (**C**) y 15 (**D**), En **E** se observan las MNs durante el período de maduración. **F-H.** Análisis inmunocitoquímico de sMNs, obtenidas desde la línea AF22, utilizando anticuerpos específicos anti-ChAT (**F**, verde) y anti-SV2 (**G**, rojo). En **H** se muestra la superposición de canales. **I-K.** Tinción inmunocitoquímica en MNs derivadas de células AF22 utilizando anticuerpos anti-HB9 (**I**, rojo) y anti-GLUT1 (**J**, blanco). En **K** se muestra la superposición de canales. Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

13.2.2. Caracterización de iPSCs

Finalmente, realizamos la diferenciación de iPSCs, denominadas UCLi004-A, derivadas de un paciente varón con diagnóstico de ALS/FTD y con una expresión en la repetición GGGGCC en el gen *C9ORF72*.

En cultivo, las células pluripotentes forman colonias (**Figura 21 A**) y muestran reacción positiva para el glicolípido de superficie SSEA4 (**Figura 21 A, B**) y el factor de transcripción nuclear OCT4 (**Figura 21 C, D**), ambos marcadores de pluripotencia. La principal característica de las células pluripotentes es su capacidad para diferenciarse hacia cualquier tipo celular; así, evaluamos el potencial de las células UCLi004-A para diferenciarse hacia las 3 capas germinales, utilizando medios de cultivo específicos que permiten este proceso. De esta forma, dependiendo del medio de cultivo utilizado, las células pueden inducir la expresión del marcador de diferenciación ectodermal, OTX2 (**Figura 21 F, G**), el marcador de células del mesodermo, Brachyury (**Figura 21 I, J**) o SOX17, marcador de la diferenciación endodermal (**Figura 21 L, M**), de esta forma confirmando la naturaleza de iPSCs de nuestras células.

iPSCs *C9ORF72*

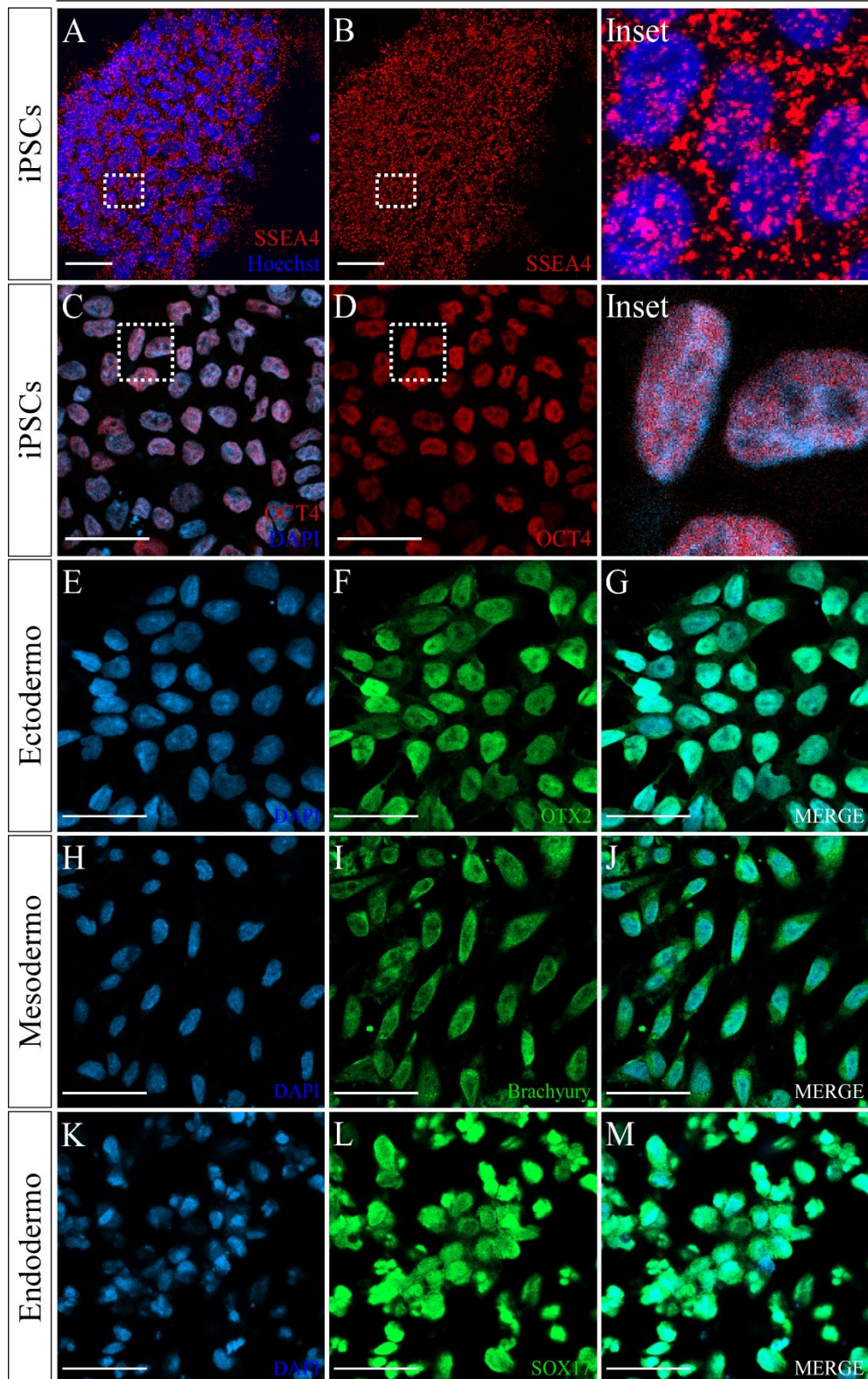


Figura 21: Expresión de marcadores y potencial de diferenciación en iPSCs

***C9ORF72*.**

A-B. Análisis inmunocitoquímico de colonias de iPSCs *C9ORF72* utilizando el anticuerpo específico anti-SSEA4 (rojo). Tinción nuclear: Hoechst. **C-D.** Tinción inmunocitoquímica en iPSCs *C9ORF72* utilizando el anticuerpo específico anti-OCT4 (rojo). **E-G.** iPSCs diferenciadas hacia células ectodermales, identificadas utilizando el anticuerpo anti-OTX2 (verde). **H-J.** iPSCs diferenciadas hacia células del mesodermo, identificadas con el anticuerpo específico anti-brachury (verde). **K-M.** iPSCs diferenciadas hacia células del endodermo, identificadas utilizando el anticuerpo anti-SOX17. Tinción nuclear: DAPI. Barra de tamaño: 50 μm .

13.2.3. Efecto de DHA en MNs y NE derivadas de células AF22

Luego de comprobar que las células AF22 y UCLi004-A pueden ser diferenciadas hacia MNs espinales, evaluamos el efecto de DHA sobre estas neuronas. Para ello, MNs derivadas de células AF22 fueron sembradas en placas cubiertas con laminina/poli-L-ornitina y tratadas con PBS (control) o DHA 400 μ M (**Figura 22 A**). Luego de 12 o 24 horas, las placas fueron analizadas en microscopio de contraste de fases para realizar la cuantificación de varicosidades generadas en las neuritas. Las varicosidades se describen como “engrosamientos” o perlas que se forman de manera focal en los axones y son características de múltiples enfermedades neurodegenerativas del SNC (Beirowski et al., 2010). La cuantificación se realizó en un rango de 50 μ m desde el borde celular.

En condiciones control, podemos observar MNs con un soma pequeño y largos y finos procesos que se extienden desde el mismo (**Figura 22 B**), los que presentan pocas o nulas varicosidades (**Figura 22 C**), con un promedio de $0,80 \pm 0,82$ varicosidades/neurita (**Figura 22 J**). Luego de 12 horas de tratamiento con DHA, no detectamos mayores cambios en la morfología de las MNs (**Figura 22 D**), sin embargo, si observamos un número significativamente mayor de varicosidades por neurita (**Figura 22 J**), con un promedio de $2,62 \pm 1,31$ varicosidades/neurita, las que se observan como pequeñas perlas distribuidas de manera aleatoria en los procesos celulares (**Figura 22 E**, flechas). Por otro lado, luego de 24 horas de exposición a DHA, podemos observar MNs cuyos procesos celulares se ven visiblemente afectados (**Figura 22 F**), con múltiples

varicosidades (**Figura 22 G**) y cuyo número es significativamente mayor con respecto a la condición control (**Figura 22 K**), con un promedio de $4,76 \pm 0,93$ var/neurita *versus* $1,57 \pm 0,98$ var/neurita en el control.

De manera adicional, evaluamos el efecto de la inhibición de RIPK1 en la formación de varicosidades en células expuestas a DHA: para ello, las MNs se trataron con DHA 400 μ M y, adicionalmente, se realizó una única suplementación con Nec-1s 10 μ M al inicio del experimento (tiempo 0) (**Figura 22 A**). El análisis a las 12 horas no reveló diferencias significativas en el número de varicosidades por proceso celular con respecto al tratamiento con DHA (**Figura 22 J**), con un promedio de $2,62 \pm 1,31$ var/neurita en presencia de DHA *versus* $2,94 \pm 1,24$ var/neurita al realizar el co-tratamiento con Nec-1s. Por otro lado, luego de 24 horas se observan MNs con finos procesos y variadas varicosidades (**Figura 22 H, I**), sin embargo, detectamos una disminución estadísticamente significativa en el número de varicosidades por neurita con respecto a la condición DHA (**Figura 22 K**), con un promedio de $4,76 \pm 0,93$ var/neurita cuando hay DHA presente *versus* $3,62 \pm 1,47$ var/neurita en la condición DHA + Nec-1s.

Adicional a nuestro modelo de MNs aisladas hemos generado NE, sólo a través de modificaciones en las condiciones de cultivo. Similar a lo anterior, evaluamos el efecto de DHA sobre la formación de varicosidades en las neuritas; para ello, las NE se trataron con 400 μ M DHA (o PBS 1x, en el caso de los controles) por 12 o 24 horas (**Figura 23 A**), luego de lo cual se realizaron las cuantificaciones.

MNs AF22

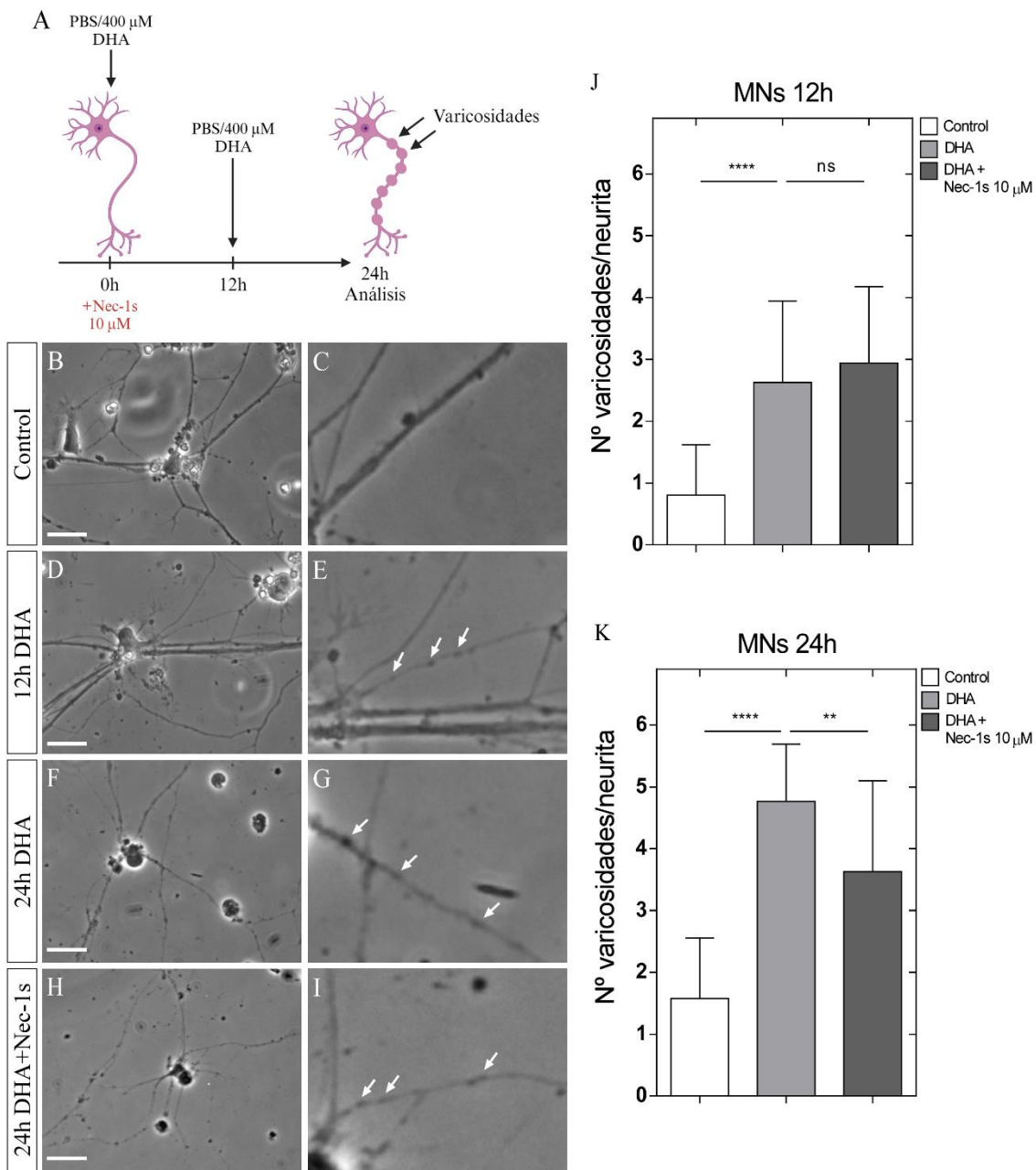


Figura 22: Análisis de varicosidades en MNs derivadas de células AF22.

A. Protocolo de suplementación con PBS 1x o DHA 400 μ M en MNs. Cuando se indica, se realizó una única suplementación con 10 μ M Nec-1s al tiempo 0. **B-I.** Imágenes tomadas con contraste de fases en MNs control (**B, C**), luego del tratamiento con 400 μ M DHA a las 12 (**D, E**) o 24 (**F, G**) horas, o bien luego de 24 horas de tratamiento con DHA y Nec-1s 10 μ M (**H, I**). Las flechas indican la presencia de varicosidades. Barra de tamaño: 20 μ m. **J, K.** Número de varicosidades cuantificado por neurita, en un rango de 50 μ m desde el borde celular, en MNs luego de 12 horas (**J**) o 24 (**K**) horas de tratamiento control (N= 25 (12h); 21 (24h)), con DHA (N=46 (12h); 28 (24h)) o DHA más Nec-1s (N=17 (12h); 26 (24h)). Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

En NE control, podemos observar múltiples procesos que emergen desde la estructura, los cuales son de calibre variado y de los que emergen múltiples ramificaciones (**Figura 23 B**) y un número reducido de varicosidades (**Figura 23 C**), con un promedio de $0,94 \pm 0,85$ var/neurita (**Figura 23 J**). Luego de 12 horas de tratamiento con DHA, observamos NE de morfología similar, con múltiples procesos (**Figura 23 D**) y sin variaciones significativas en el número de varicosidades con respecto a la condición anterior (**Figura 23 E**), con un promedio de $1,36 \pm 0,66$ var/neurita (**Figura 23 J**). Después de 24 horas observamos NE que, si bien presentan múltiples procesos (**Figura 23 F**), también muestran múltiples varicosidades en ellos (**Figura 23 G**), con un incremento significativo en su número con respecto a la condición control (**Figura 23 J**), con un promedio de $1,16 \pm 1,02$ var/neurita en el control, *versus* $3,63 \pm 1,34$ var/neurita en presencia de DHA.

Tal como se describió anteriormente, también evaluamos el efecto de la inhibición de RIPK1 en NE, para lo cual, adicional al tratamiento con DHA, se realizó una única suplementación con $10 \mu\text{M}$ Nec-1s en las NE a la hora 0 (**Figura 23 A**). Así, si bien luego de 12 horas de añadida la Nec-1s no observamos cambios con respecto al número de varicosidades por neurita en las NE *versus* el tratamiento sólo con DHA (en promedio, $1,36 \pm 0,66$ var/neurita para NE con DHA y $1,25 \pm 0,83$ var/neurita para NE con DHA + Nec-1s) (**Figura 23 J**), en NE de 24 horas sí detectamos procesos largos con múltiples varicosidades (**Figura 23 H, I**), pero cuyo número es significativamente menor que aquel observado sólo en presencia

de DHA, con un promedio de $3,63 \pm 1,36$ var/neurita (DHA) *versus* $2,97 \pm 1,13$ var/neurita (DHA + Nec-1s) (**Figura 23 K**).

13.2.4. Efecto de DHA en MNs y NE derivadas de iPSCs C9ORF72

Adicional a las MNs derivadas de células AF22, también estudiamos el efecto de DHA en MNs diferenciadas desde iPSCs UCLI004-A. Es importante mencionar que el rendimiento de MNs obtenidas desde estas células fue muy bajo, dada la alta inducción de muerte celular durante el proceso de maduración, lo cual limitó nuestros análisis.

Similar a los análisis anteriores, Las MNs maduras fueron suplementadas con DHA $400 \mu\text{M}$ (o PBS) durante 24 horas, cuantificándose el número de varicosidades por proceso celular a las 12 y 24 horas (**Figura 24 A**). En condiciones control observamos MNs con un soma pequeño, desde el cual emergen finos procesos, destacándose la presencia de un proceso principal desde el que emergen largas ramificaciones (**Figura 24 B**), que en promedio generan $2,56 \pm 1,76$ var/neurita (**Figura 24 C, H**). Por otro lado, luego de 12 horas de tratamiento con DHA podemos observar MNs con procesos celulares que están visiblemente más afectados (**Figura 24 D**) y cuyo número de varicosidades es significativamente mayor a aquel observado en condiciones control, con un promedio de $4,78 \pm 2,33$ var/neurita (**Figura 24 E, H**). Consecuente con un mayor tiempo de exposición a DHA, en MNs de 24 horas observamos un incremento importante en el daño a los procesos celulares (**Figura 24 F**), los cuales

NE AF22

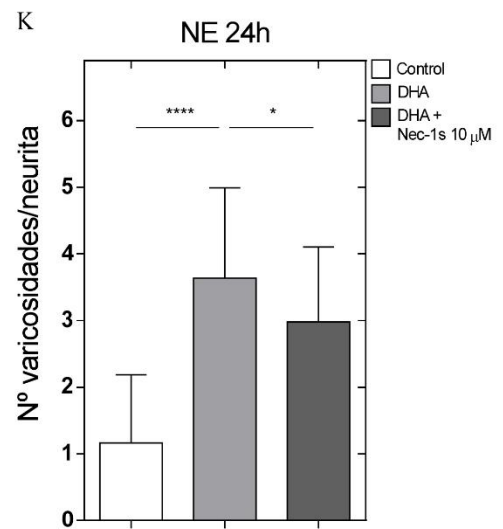
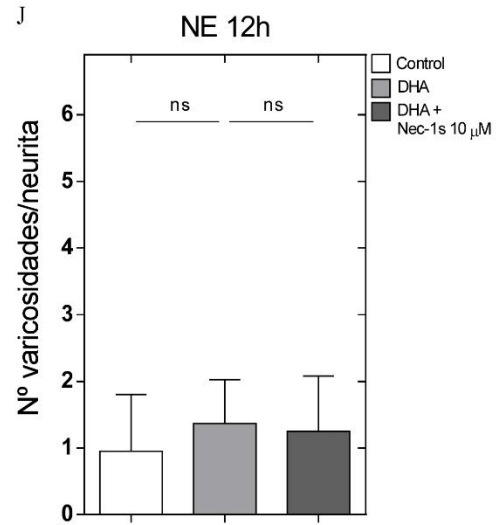
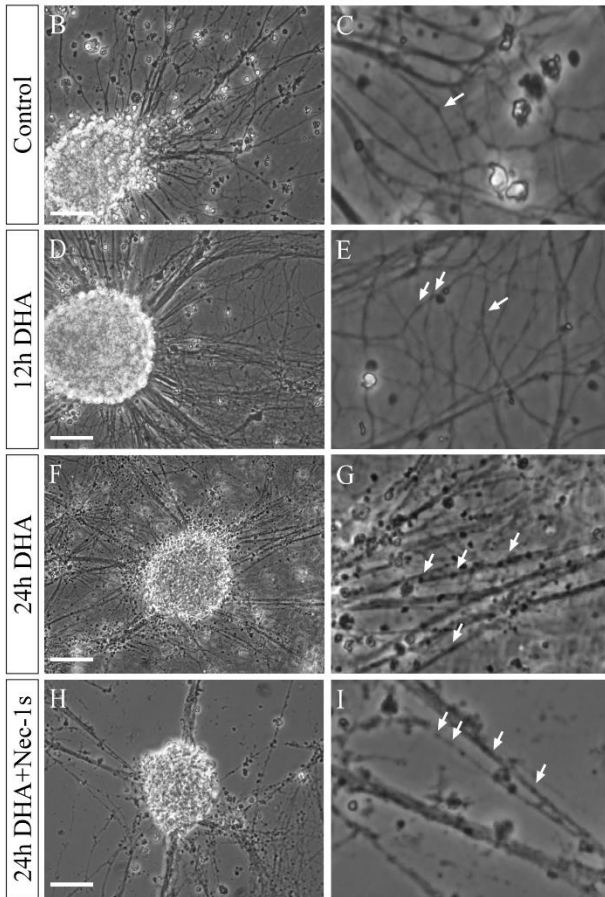
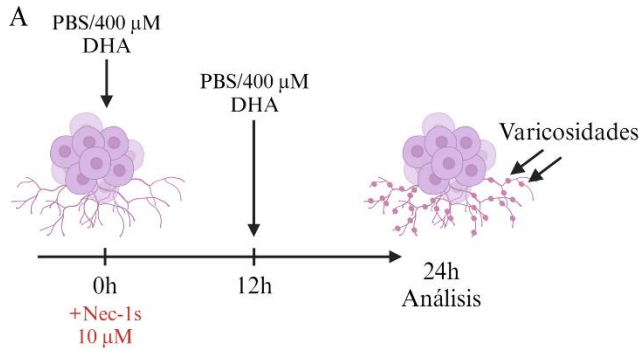


Figura 23: Análisis de varicosidades en NE derivadas de células AF22.

A. Protocolo de suplementación con PBS 1x o DHA 400 μ M en NE derivadas de la diferenciación de células AF22. Cuando se indica, se realizó una única suplementación con 10 μ M Nec-1s al tiempo 0. **B-I.** Imágenes tomadas con contraste de fases en NE control (**B, C**), luego del tratamiento con 400 μ M DHA a las 12 (**D, E**) o 24 (**F, G**) horas, o bien luego de 24 horas de tratamiento con DHA y Nec-1s 10 μ M (**H, I**). Las flechas indican la presencia de varicosidades. Barra de tamaño: 20 μ m. **J, K.** Número de varicosidades cuantificado por neurita, en un rango de 50 μ m desde el borde celular, en NE luego de 12 (**J**) o 24 (**K**) horas de tratamiento control (N=87 (12h); N=87 (24h)), con DHA (N=22 (12h); 78 (24h)) o DHA más Nec-1s (N=61 (12h); 38 (24h)). Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

presentan múltiples varicosidades a lo largo de su estructura (**Figura 24 G**), promediando $8,73 \pm 3,56$ var/neurita *versus* $2,56 \pm 1,76$ var/neurita en MNs control (**Figura 24 I**).

También evaluamos el efecto de DHA sobre las neuritas en NE derivadas de MNs *C9ORF72*, las cuales fueron tratadas con DHA 400 μ M (o PBS 1x) por 12 o 24 horas (**Figura 25 A**), analizándose el número de varicosidades por proceso en cada uno de estos puntos. En NE control observamos la presencia de neuritas largas y con múltiples ramificaciones (**Figura 25 B, C**), las cuales generan $2,63 \pm 1,64$ var/neurita en promedio. Por otro lado, en NE tratadas con DHA por 12 horas, logramos detectar neuritas igualmente largas y ramificadas, pero visiblemente más afectadas (**Figura 25 D, E**); además, estas generan un número de varicosidades significativamente mayor con respecto a la condición control, con un promedio de $4,41 \pm 2,58$ var/proceso (**Figura 25 H**). Luego de 24 horas, el tratamiento con DHA induce una cantidad de varicosidades aún mayor, promediando $11,18 \pm 3,95$ var/proceso *versus* $2,63 \pm 1,64$ var/proceso en NE control (**Figura 25 F, G, I**).

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con DHA induce un efecto de formación de varicosidades en las neuritas de MNs y NE. Adicionalmente, nuestros datos muestran que, en MNs cultivadas de forma aislada, el número de varicosidades/neurita que se generan es mayor a aquel observado en NE. Finalmente, observamos que el tratamiento con DHA induce

un mayor número de varicosidades/neurita en MNs y NE derivadas de iPSCs *C9ORF72*, en relación a MNs y NE derivadas de células AF22, sugiriendo que la presencia de la expansión en el hexanucleótido GGGGCC en el gen *C9ORF72* otorga a las células mayor susceptibilidad al daño.

MNs *C9ORF72*

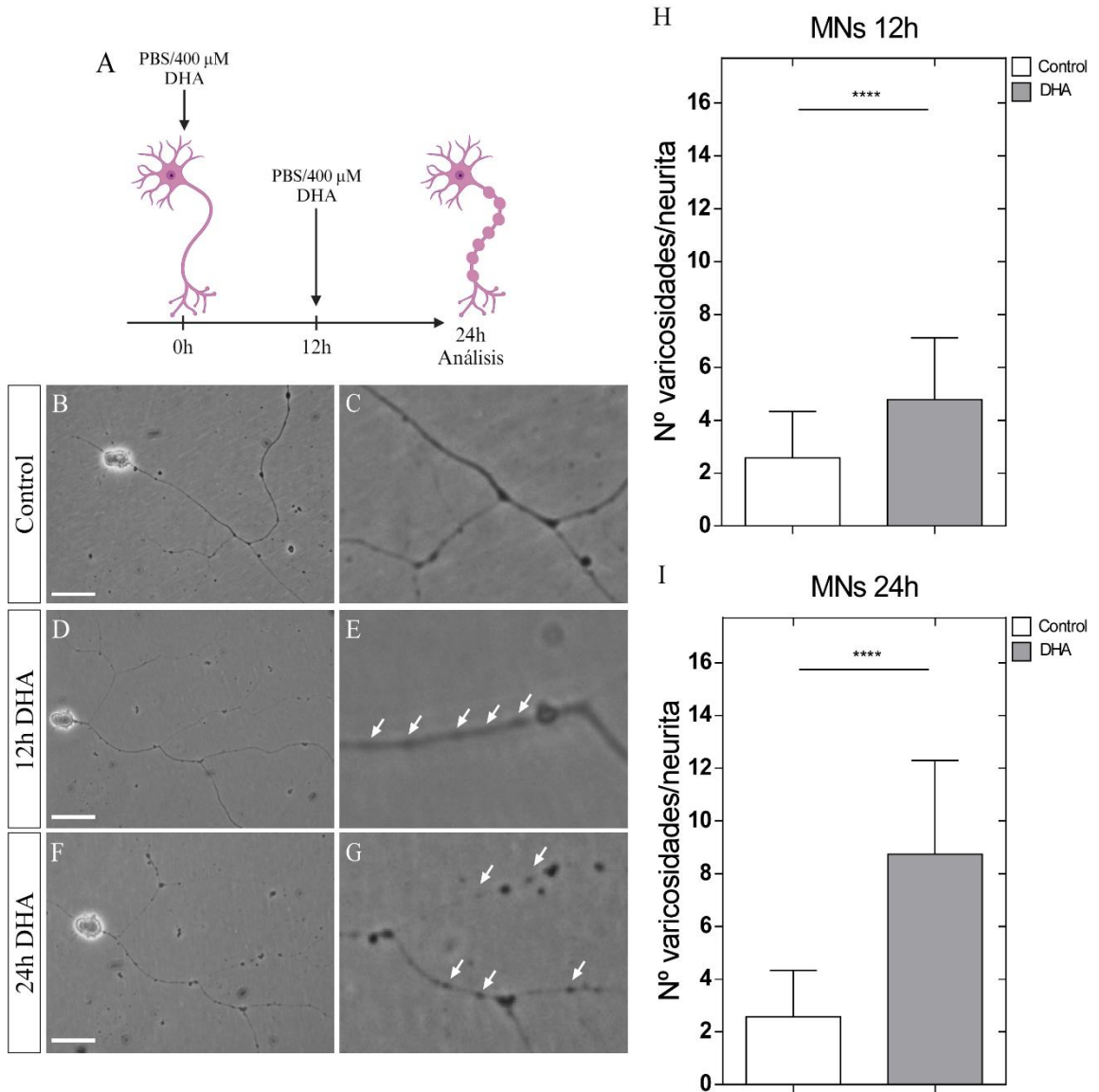


Figura 24: Análisis de varicosidades en MNs derivadas de iPSCs *C9ORF72*.

A. Protocolo de suplementación con PBS 1x o DHA 400 μ M en MNs derivadas de iPSCs *C9ORF72*. **B-G.** Imágenes tomadas con contraste de fases en MNs control (**B, C**) o bien luego del tratamiento con 400 μ M DHA a las 12 (**D, E**) o 24 (**F, G**) horas. Las flechas indican la presencia de varicosidades. Barra de tamaño: 20 μ m. **H, I.** Número de varicosidades cuantificado por neurita, en un rango de 50 μ m desde el borde celular, en MNs luego de 12 (**H**) o 24 (**I**) horas de tratamiento control (N=100 (12h); 100 (24h)) o con DHA (N=59 (12h); 64 (24h)). Análisis estadístico t-student, test paramétrico (****p<0,0001).

NE *C9ORF72*

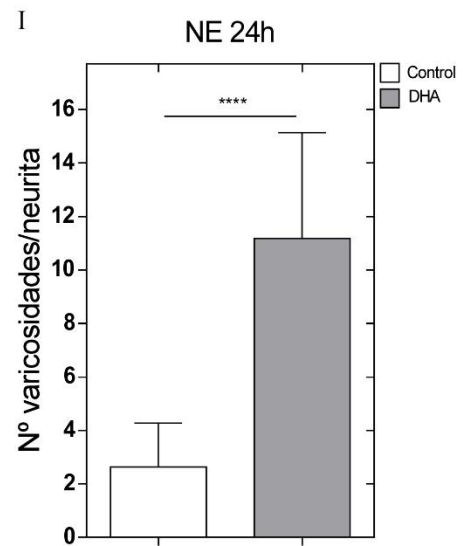
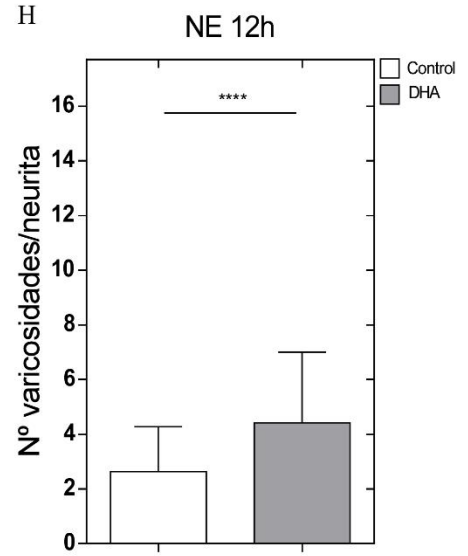
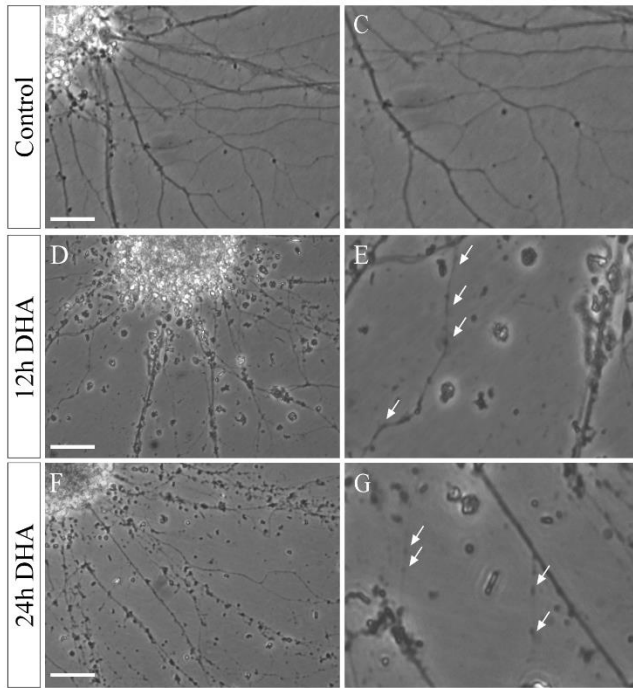
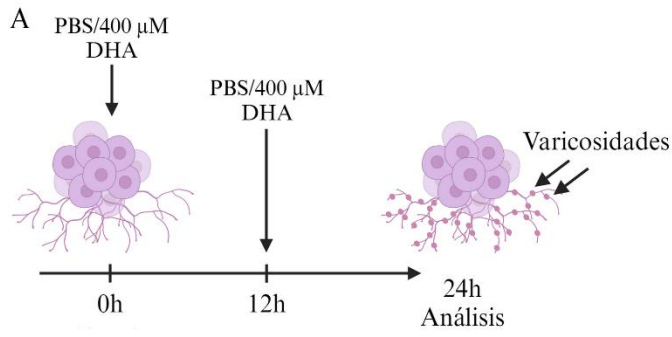


Figura 25: Análisis de varicosidades en NE derivadas de iPSCs C9ORF72.

A. Protocolo de suplementación con PBS 1x o DHA 400 μ M en NE derivadas de iPSCs C9ORF72. **B-G.** Imágenes tomadas con contraste de fases en MNs control (**B, C**) o bien luego del tratamiento con 400 μ M DHA a las 12 (**D, E**) o 24 (**F, G**) horas. Las flechas indican la presencia de varicosidades. Barra de tamaño: 20 μ m. **H, I.** Número de varicosidades cuantificado por neurita, en un rango de 50 μ m desde el borde celular, en MNs luego de 12 (**H**) o 24 (**I**) horas de tratamiento control (N=397 (12h); 397 (24h)) o con DHA (N=170 (12h); 170 (24h)). Análisis estadístico t-student, test paramétrico (**** $p < 0,0001$).

13.3. Capítulo 3: Caracterizar los cambios celulares y la expresión de SVCT2/GLUT1 *in situ* en ratones SOD1 WT y SOD1 G93A y definir si la acumulación de DHA incrementa la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica *in vivo*

13.3.1. Caracterización del modelo animal SOD1 G93A

Para cumplir con el último objetivo de esta tesis, trabajamos con el modelo *in vivo* más utilizado para el estudio de ALS, los ratones B6SJL SOD1 G93A (B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) y su control, SOD1 WT (B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J) (Gurney et al., 1994).

En primer lugar, realizamos una caracterización de los animales SOD1 G93A en términos de peso corporal y función motora. A contar de los 30 días de vida, los animales (machos y hembras) fueron pesados semanalmente hasta el momento de su sacrificio. De esta forma, observamos un aumento progresivo en el peso corporal de los ratones, alcanzando su *peak* aproximadamente al día 90 y luego disminuyendo paulatinamente hasta los 130 días de vida, aproximadamente (**Figura 26 B**). Si bien en ambos sexos se observó el mismo efecto, el peso de los animales macho fue, en general, mayor al peso de las hembras (**Figura 26 B**).

Por otro lado, la progresión de ALS en animales SOD1 G93A fue estudiada a través del *score* neurológico (Hatzipetros et al., 2015) (**Figura 26 A**). Así, ratones macho y hembras pasaron un promedio de $60,28 \pm 15,62$ y $64,74 \pm 17,13$ días

en un *score* de 1, respectivamente, seguido de $9,43 \pm 3,94$ y $8,72 \pm 3,34$ días en un *score* de 2 y $4,65 \pm 2,83$ y $5,40 \pm 2,37$ días en un *score* de 3, respectivamente (**Figura 26** C, D). Tal como se indica en la **Tabla II**, el *score* de 4 se considera como el punto final de sacrificio humanitario. En conjunto, estos resultados son congruentes con el inicio y progresión de los síntomas asociados a ALS, concordando con lo que ha sido previamente reportado en la literatura para los animales SOD1 G93A (Henriques et al., 2010; Sugimoto et al., 2021).

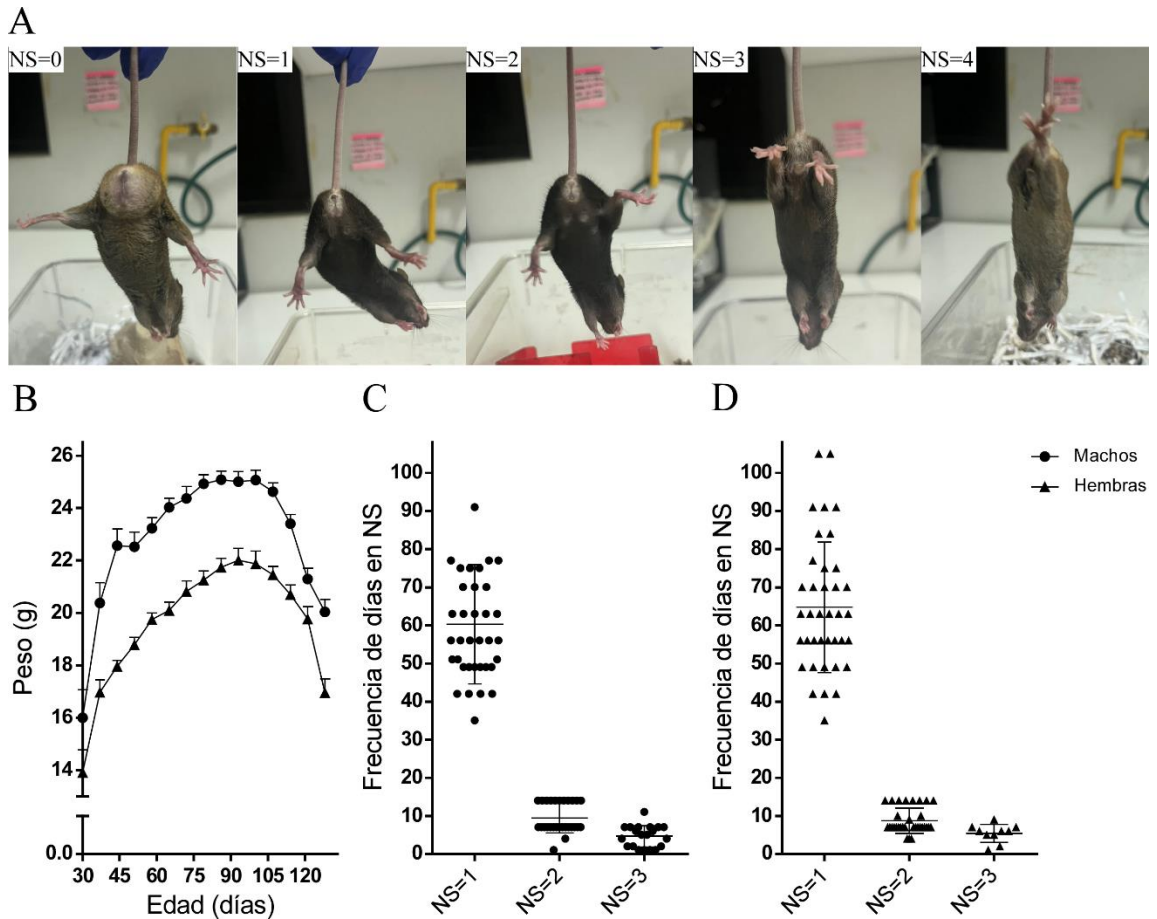


Figura 26: Caracterización de animales SOD1 G93A.

A. Imágenes de animales SOD1 G93A cuyo score neurológico varía de 0 a 4. **B.** Peso corporal de ratones SOD1 G93A, evaluados semanalmente desde los 30 hasta los 130 días de vida. Los datos representan el peso promedio \pm SEM. **C,** **D.** Frecuencia de días de ratones macho (**C**) y hembras (**D**) SOD1 G93A en un score neurológico (NS) de 1, 2 o 3. Los datos representan el número de días \pm SD. N=44 (machos), 39 (hembras).

13.3.2. Expresión de marcadores en la médula espinal

Luego de comprobar las características clínicas de los animales SOD1 G93A, estudiamos la expresión y localización de diferentes marcadores en la médula espinal. Para ello, obtuvimos cortes de 30 μ m desde la zona lumbar de la médula espinal de animales control (SOD1 WT) y analizamos la presencia de marcadores en las astas ventrales (Figura 27), región donde se ubican las MNs.

En segmentos lumbares derivados de ratones SOD1 WT podemos observar astas ventrales cuya sustancia gris (SG) muestra una intensa reacción para SV2, el cual delinea el contorno de las neuronas motoras (**Figura 27 A e Inset 1**); adicionalmente, observamos zonas de sustancia blanca (SB) fuertemente positivas para el marcador astrocítico GFAP (**Figura 27 A e Inset 2**), correspondiente a astrocitos marginales de la médula. El análisis del transportador de AA, SVCT2, mostró inmunorreacción positiva en MNs de la sustancia gris, fundamentalmente en la región intracelular (**Figura 27 B, C e Inset 1**).

Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico reveló reacción positiva para el transportador GLUT1 en la membrana de las MNs (**Figura 27 D, F e Inset 3**, flechas), junto con un intenso marcaje anti-neurofilamentos (**Figura 27 E, F**) y anti-NeuN (*neuronal nuclei*, núcleos neuronales) (**Figura 27 H, I**). Similar a lo descrito previamente, observamos MNs que expresan SVCT2 (**Figura 27 G, I**), destacándose algunas células donde este marcaje se concentra en la membrana

celular, e incluso lográndose la detección de axones fuertemente reactivos para esta proteína (Inset 4 y **Figura 27 J**).

Finalmente, el análisis con el marcador astrogial GFAP mostró reacción positiva en la materia gris en procesos finos y discretos, detectándose también en algunos cuerpos celulares (**Figura 27 K**), los cuales además no muestran inmunorreacción anti-SVCT2 (**Figura 27 I, J** y ampliaciones). De forma interesante, sólo los astrocitos marginales ubicados en la sustancia blanca fueron positivos a SVCT2 (**Figura 27 B, C** e Inset 2), como ha sido previamente descrito por nuestro grupo de investigación (Nualart et al., 2012).

SOD1 WT

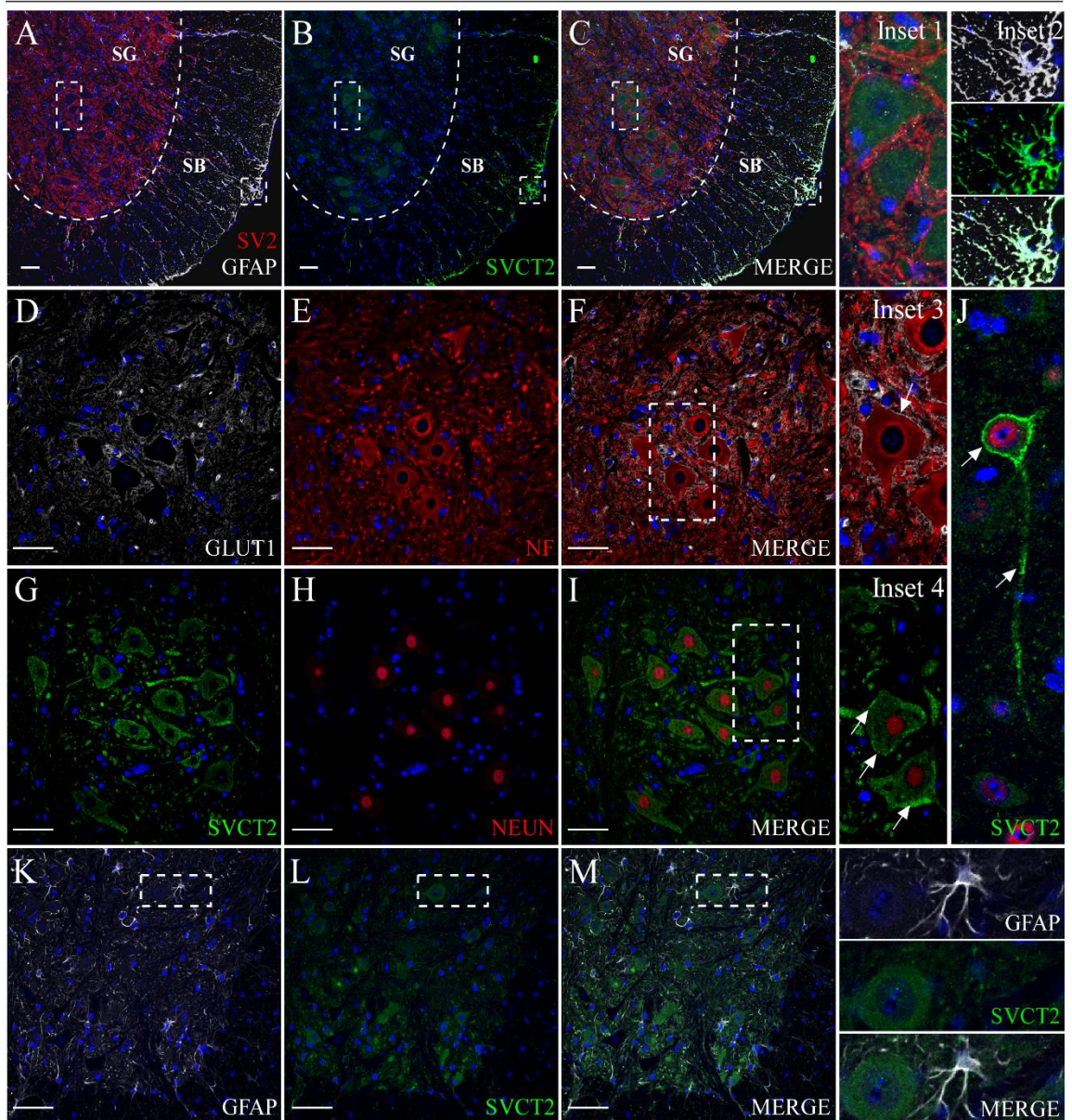


Figura 27: Expresión de marcadores celulares en la médula espinal de animales SOD1 WT.

A-C. Análisis inmunohistoquímico del asta ventral de la médula espinal lumbar, utilizando anticuerpos específicos anti-SV2, anti-GFAP (**A**, rojo y blanco respectivamente) y anti-SVCT2 (**B**, verde). **C.** Superposición de canales. **D, E.** Análisis inmunohistoquímico de las astas ventrales de la médula espinal lumbar, utilizando anticuerpos específicos anti-GLUT1 (**D**, blanco) y anti-neurofilamentos (**E**, NF, rojo). **F.** Superposición de canales blanco y rojo. **G, H.** Tinción de las astas ventrales de la médula espinal lumbar, con anticuerpos específicos anti-SVCT2 (**G**, verde) y anti-NeuN (**H**, rojo). **I.** Superposición de canales verde y rojo. **J.** Maginificación de neurona motora del asta ventral, marcada con anticuerpo anti-SVCT2 (verde). **K, L.** Marcaje de astrocitos en la médula espinal ventral con anticuerpos anti-GFAP (**K**, blanco) y anti-SVCT2 (**L**, verde). **M.** Superposición de canales blanco y verde. Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst. SG: Sustancia gris. SB: Sustancia blanca.

13.3.3. Análisis de la expresión y localización de SVCT2 en MNs de la médula espinal en animales SOD1 WT y G93A

Posterior a la caracterización de marcadores celulares, evaluamos cambios en la expresión y localización de SVCT2 en la médula espinal. Para ello, aislamos cortes de la médula espinal lumbar de ratones SOD1 WT y G93A a los 70, 90 y 120 días de vida, edades que se corresponderían con un estadio pre-sintomático, sintomático y de punto final en la patología (Fischer et al., 2004), respectivamente.

Similar a lo descrito previamente, en médulas de animales SOD1 WT de 70 días, podemos observar neuronas grandes, cuyo marcaje con el anticuerpo anti-SV2 delinea todo su borde presináptico (**Figura 28 A**) y donde la presencia de SVCT2 se observa fundamentalmente en la región intracelular, siguiendo un patrón homogéneo (**Figura 28 B, C** y **amplificación**). Resultados similares fueron observados en muestras de ratones de 90 y 120 días, donde la localización de vesículas sinápticas es homogénea en el borde celular (**Figura 28 D, G**) y SVCT2 está distribuido homogéneamente en la región intracelular (**Figura 28 E-F, H-I** y **amplificaciones**), aunque también es posible detectarlo como un patrón punteado en el neuropilo (**Figura 28 E, H**). Estos resultados son consistentes con un animal que no desarrolla ALS y, por lo tanto, mantiene sus características histológicas.

SOD1 WT

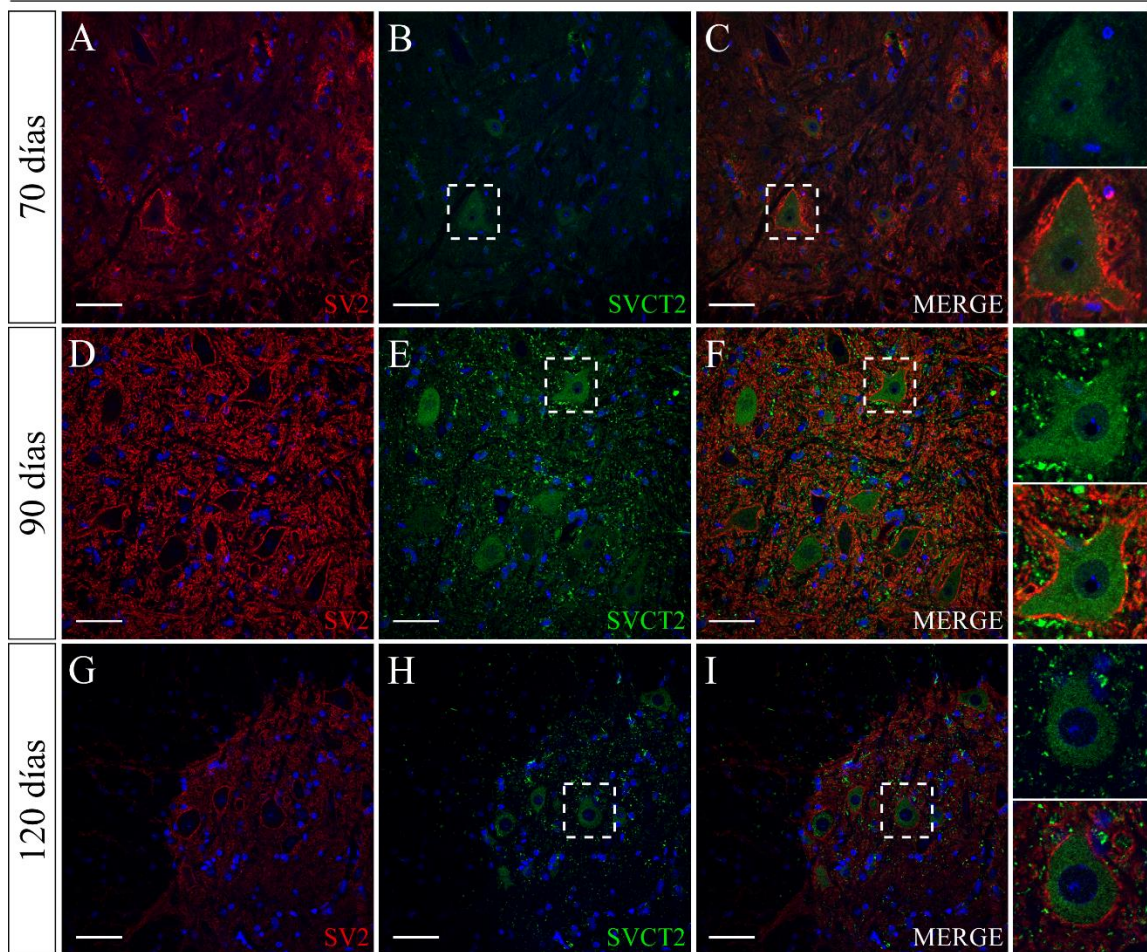


Figura 28: Expresión y localización de SVCT2 en MNs de animales SOD1 WT.

A-I. Estudio de la localización de SVCT2 en astas ventrales de la médula espinal lumbar en animales SOD1 WT de 70 (**A-C**), 90 (**D-F**) y 120 (**G-I**) días de vida, a través de marcaje inmunofluorescente con anticuerpos específicos anti-SV2 (**A, D, G**, rojo) y anti-SVCT2 (**B, E, H**, verde), respectivamente. En **C, F, I** se muestra la superposición de canales para cada condición, respectivamente. Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

Por otro lado, en médulas de ratones SOD1 G93A, detectamos cambios en la distribución subcelular de este transportador. A los 70 días de vida, observamos MNs donde la expresión de SVCT2 ya no es homogénea, sino que se agrega en pequeños *clusters* en los bordes celulares (**Figura 29 A-C**). Este efecto se ve exacerbado a los 90 días de vida, donde observamos algunas MNs con SVCT2 agregado en grandes *clusters* en la región intracelular (**Figura 29 D-F** y magnificaciones). Finalmente, en el estadio terminal, a los 120 días de vida, observamos un tejido que, a diferencia de las condiciones anteriores, está significativamente degenerado, con un marcaje anti-SV2 débil y que sólo se observa de manera uniforme en algunas MNs (**Figura 29 G**). Con respecto a SVCT2, lo observamos clusterizado intracelularmente y sólo es detectable en algunas células neuronales (**Figura 29 H, I** y magnificaciones).

Dadas estas observaciones, primero cuantificamos la intensidad de fluorescencia promedio para el canal verde, correspondiente al marcaje anti-SVCT2, en las MNs. Así, en médulas derivadas de ratones SOD1 G93A de 70 días de vida detectamos una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia para SVCT2 con respecto a muestras control (**Figura 30 A**), lo cual también fue observado en muestras de 90 días (**Figura 30 B**) y 120 días (**Figura 30 C**). Adicionalmente, cuantificamos el porcentaje de MNs con una distribución de SVCT2 homogénea o agregada en el cuerpo celular. Así, en muestras de 70 días detectamos una distribución de SVCT2 fundamentalmente homogénea, tanto en médulas SOD1 WT como G93A; sin embargo, observamos una tendencia al

aumento en el porcentaje de MNs con SVCT2 agregado en muestras G93A, con respecto al control (**Figura 30 D**). Resultados similares fueron observados a los 90 días, donde SVCT2 se observa principalmente en un patrón homogéneo, pero hay una tendencia al incremento en el porcentaje de MNs con el transportador agregado en muestras G93A, con respecto a la condición WT (**Figura 30 E**). Por último, en médulas de 120 días podemos observar que, mientras en condiciones WT el mayor porcentaje de MNs expresa SVCT2 de manera homogénea en la región intracelular, con una pequeña fracción expresando SVCT2 agregado (**Figura 30 F**), en médulas SOD1 G93A observamos una disminución significativa en el porcentaje de MNs con SVCT2 distribuido homogéneamente, además de un incremento en el porcentaje de células con SVCT2 agregado, con respecto a las condiciones control (**Figura 30 F**). Finalmente, destacamos cómo en condiciones WT los patrones de expresión del transportador, en general, se mantienen, mientras que en muestras G93A, el número de neuronas donde SVCT2 no se clusteriza tiende a disminuir, mientras que el porcentaje que agrega el transportador, aumenta.

Por último, evaluamos la distribución intracelular de SVCT2 en médulas espinales SOD1 G93A de 90 días (**Figura 31**), condición en la que claramente se observa la presencia de *clusters* (con respecto a muestras de 70 días) pero, además, es posible la detección de un mayor número de MNs (con respecto a muestras de 120 días); para ello, utilizamos el marcador de retículo endoplásmico KDEL (**Figura 31 A, D**). Así, podemos observar los agregados intracelulares de SVCT2

(Figura 31 B, E), cuyo marcaje no colocaliza con la tinción anti-KDEL (Figura 31 C, F), sugiriendo que estos *clusters* intracelulares no corresponderían a formas de SVCT2 que han quedado retenidas en el retículo.

SOD1 G93A

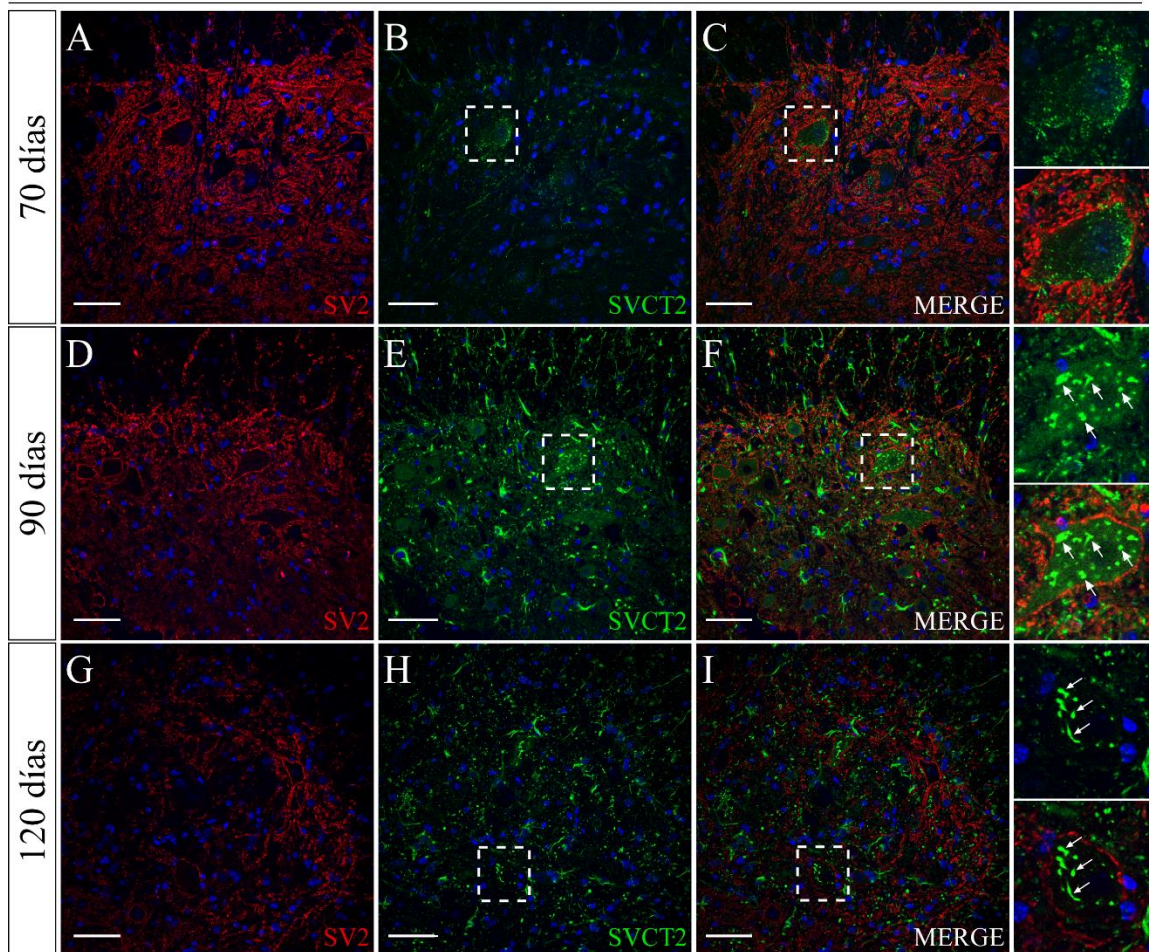


Figura 29: Expresión y localización de SVCT2 en MNs de animales SOD1 G93A.

A-I. Estudio de la localización de SVCT2 en astas ventrales de la médula espinal lumbar en animales SOD1 G93A de 70 (**A-C**), 90 (**D-F**) y 120 (**G-I**) días de vida, a través de marcaje inmunofluorescente con anticuerpos específicos anti-SV2 (**A, D, G**, rojo) y anti-SVCT2 (**B, E, H**, verde), respectivamente. En **C, F, I** se muestra la superposición de canales para cada condición. Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

SVCT2

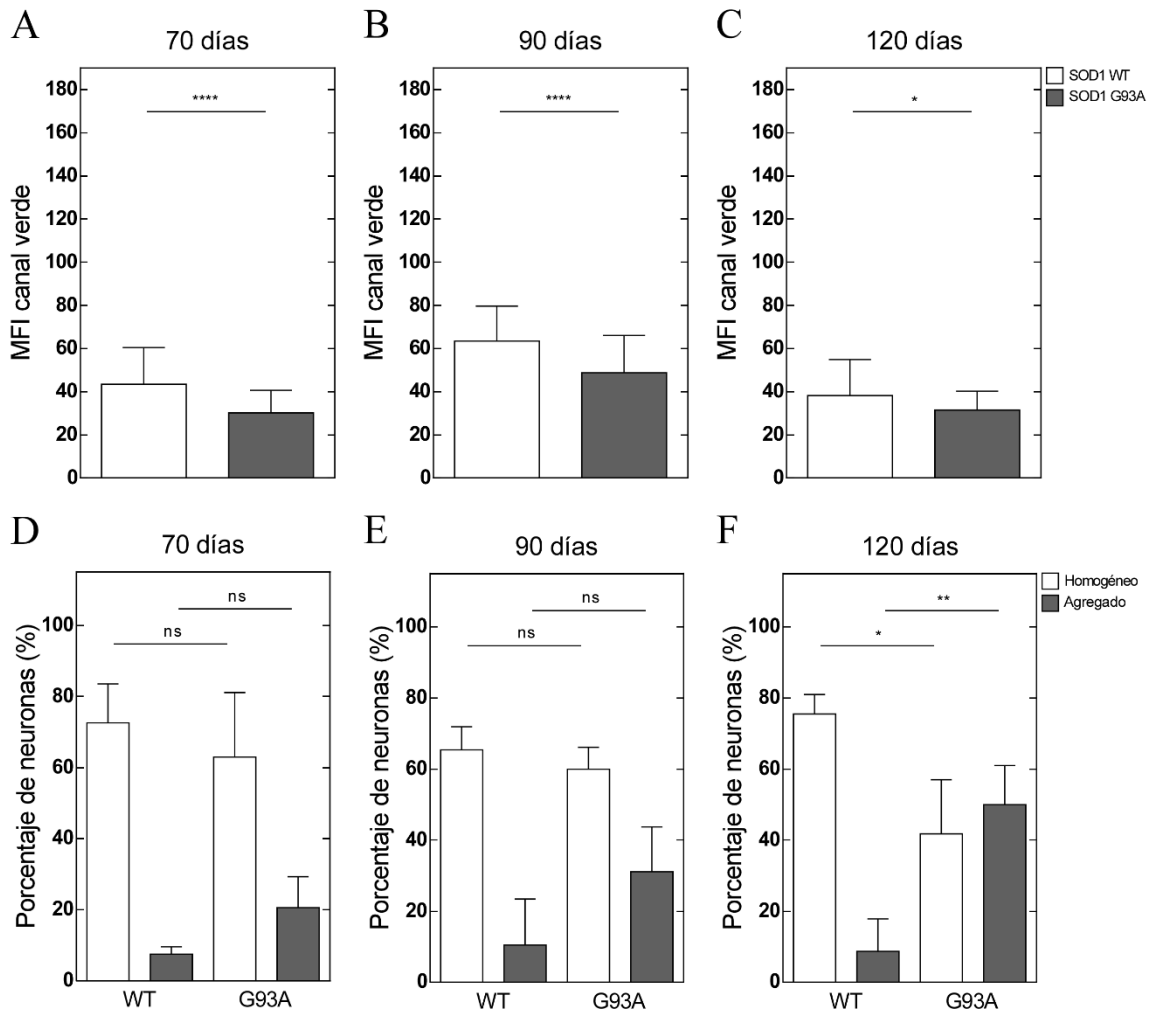


Figura 30: Intensidad de fluorescencia y distribución intracelular para SVCT2 en MNs de la médula espinal lumbar en animales SOD1 WT y G93A.

A-C. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) para el canal verde, correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-SVCT2, en astas ventrales de la médula espinal lumbar de ratones SOD1 WT o G93A a los 70 (**A**), 90 (**B**) o 120 (**C**) días de vida. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; $N=3$)

D-F. Cuantificación del porcentaje de neuronas motoras, ubicadas en las astas ventrales de la médula espinal lumbar, con SVCT2 distribuido en un patrón homogéneo o agregado, en ratones SOD1 WT o G93A de 70 (**D**), 90 (**E**) y 120 (**F**) días de vida. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $N=3$).

SOD1 G93A 90 días

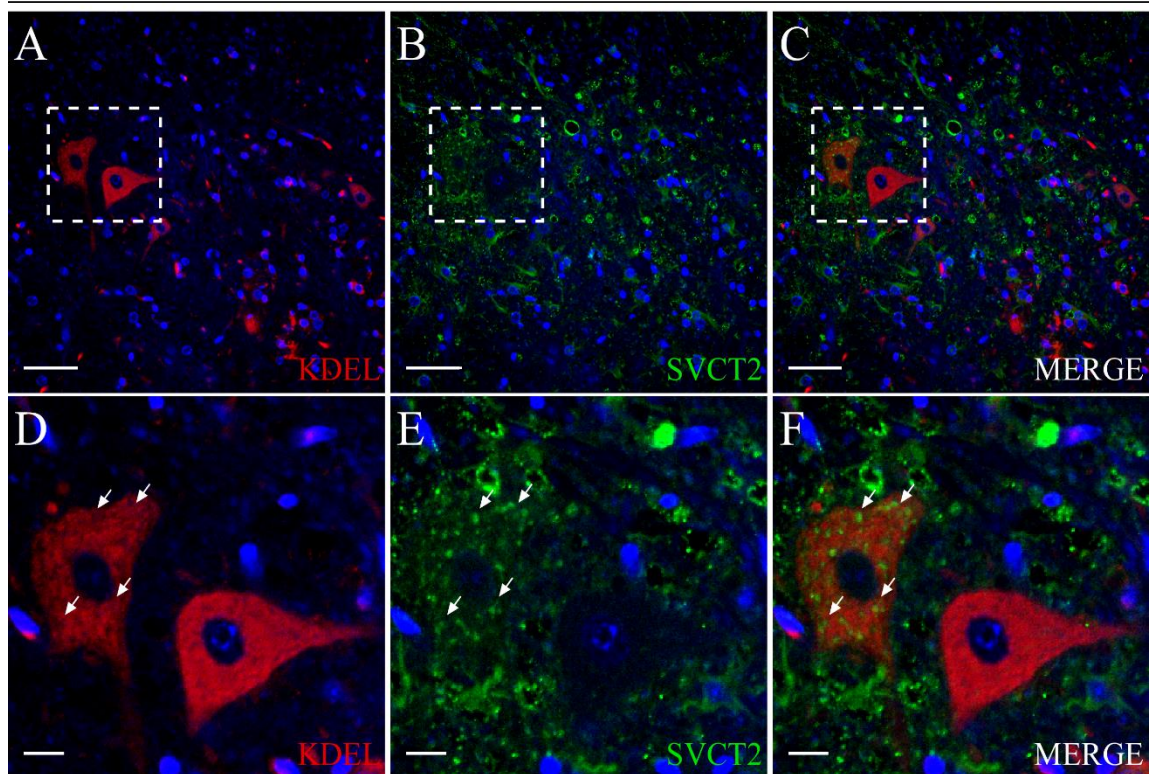


Figura 31: Localización intracelular de SVCT2 en MNs de la médula espinal lumbar en animales SOD1 G93A.

A-C. Tinción inmunohistoquímica de las astas ventrales, en la médula espinal de ratones SOD1 G93A de 90 días, utilizando anticuerpos anti-KDEL (**A**, rojo) y anti-SVCT2 (**B**, verde). En **C** se muestra la superposición de canales. Barra de tamaño: 50 μm . **D-F.** Amplificación de las imágenes A-C, respectivamente. Las flechas indican zonas donde SVCT2 se encuentra agregado. Barra de tamaño: 5 μm .

13.3.4. Análisis de la expresión y localización de SVCT2 en astrocitos de la médula espinal en animales SOD1 WT y G93A

Por otro lado, reportes previos han indicado que la astrogliosis reactiva, evento común en patologías del SNC, se acompaña de un aumento en la expresión de SVCT2 en astrocitos (Salazar et al., 2018). De esta forma, el siguiente paso fue estudiar el estado de los astrocitos y la expresión de este transportador en ellos.

En medulas espinales de animales SOD1 WT, el análisis a los 70 días de vida reveló astas ventrales con una baja población de astrocitos (**Figura 32 A**), en los cuales además se detectan ramificaciones finas y poco voluminosas (**Figura 32 B**) y donde se observa poca o nula reacción anti-SVCT2 (**Figura 32 C, D**). Estas características se mantienen a los 90 (**Figura 32 E-H**) y 120 (**Figura 32 I-L**) días de edad, con médulas espinales que presentan una baja población de astrocitos con finas ramificaciones y que, en general, no muestran expresión de SVCT2.

En contraste, en médulas espinales de ratones SOD1 G93A reveló importantes cambios. Ya a los 70 días de vida observamos un aumento en el marcaje anti-GFAP con respecto a muestras control (**Figura 33 A**), donde los astrocitos se observan con ramificaciones numerosas y gruesas (**Figura 33 B**). Adicionalmente, destacamos la expresión del transportador SVCT2 en toda la estructura (**Figura 33 C, D**). Nuevamente, detectamos resultados similares en muestras de 90 y 120 días, observando una intensa inmunorreacción anti-GFAP en las astas ventrales (**Figura 33 E, I** respectivamente), con astrocitos de gruesas

ramificaciones y con un fuerte marcaje anti-SVCT2 en ellos (**Figura 33** F-H y J-L respectivamente).

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia del canal blanco, correspondiente al marcaje anti-GFAP, reveló un aumento significativo en la fluorescencia a los 70, 90 y 120 días (**Figura 34** A-C) en astrocitos SOD1 G93A, con respecto a astrocitos derivados de muestras SOD1 WT; es más, la cuantificación de área, si bien no mostró diferencias en médulas de 70 días (**Figura 34** D), también mostró un aumento estadísticamente significativo en muestras SOD1 G93A a los 90 y 120 días (**Figura 34** E, F), con respecto a muestras SOD1 WT. Por otro lado, la cuantificación de intensidad de fluorescencia del canal verde, correspondiente al marcaje anti-SVCT2, no mostró variaciones entre astrocitos SOD1 WT y G93A a los 70 días (**Figura 34** G); sin embargo, si detectamos un incremento estadísticamente significativo en la intensidad de fluorescencia del canal correspondiente a SVCT2 en muestras SOD G93A a los 90 y 120 días (**Figura 34** H, I, respectivamente), con respecto a muestras control.

En conjunto, los datos presentados indican que durante la progresión de ALS, los astrocitos adquieren un fenotipo reactivo, lo cual se ve acompañado de un aumento en la expresión de SVCT2. Por otro lado, este transportador se ve redistribuido en MNs, observándose la formación de agregados en el soma neuronal.

SOD1 WT

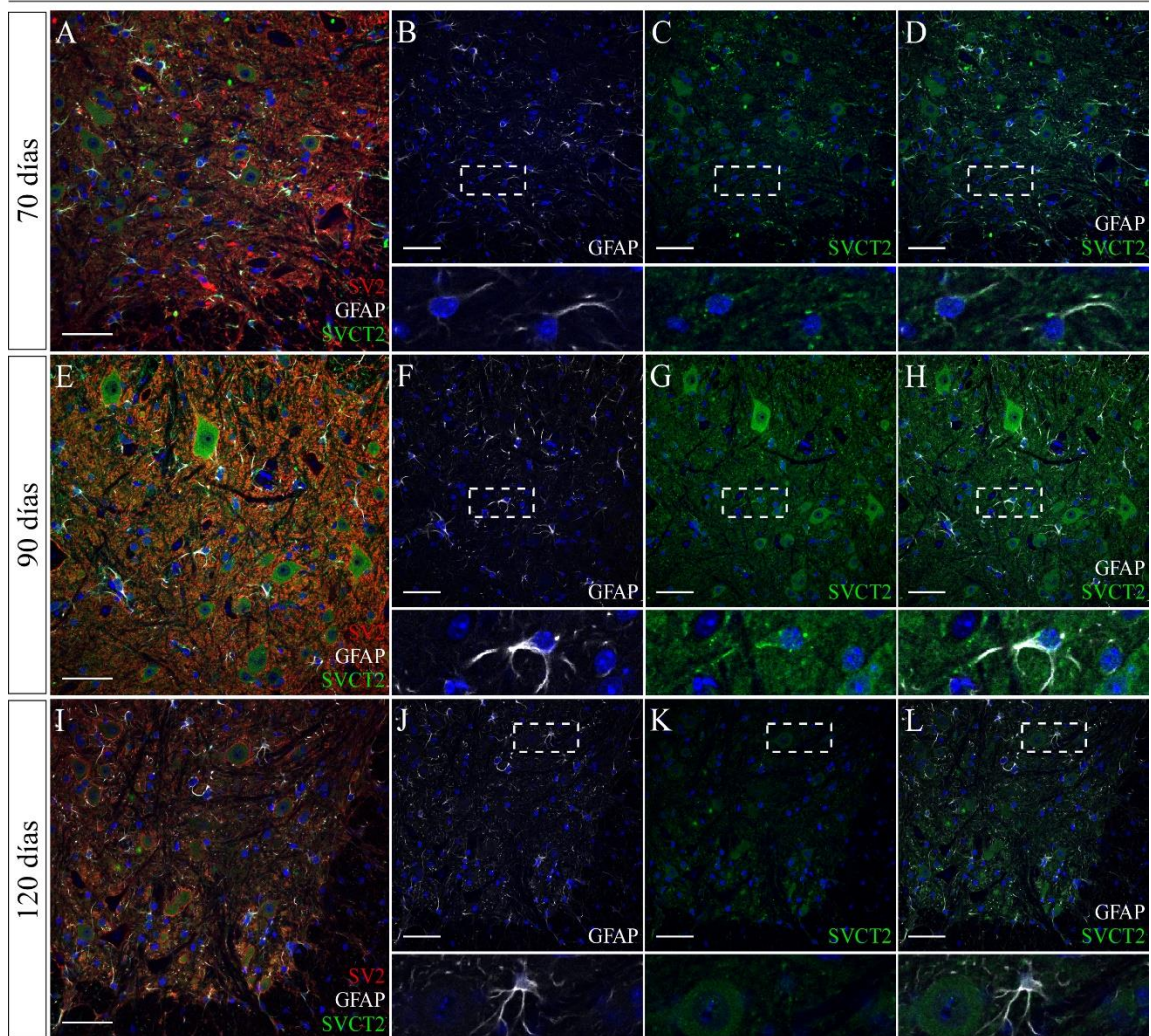


Figura 32: Expresión y localización de SVCT2 en astrocitos de animales SOD1 WT.

A-L. Estudio inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en astas ventrales de la médula espinal lumbar en animales SOD1 WT de 70 (**A-D**), 90 (**E-H**) y 120 (**I-K**) días de vida, a través de marcaje inmunofluorescente con anticuerpos específicos anti-SV2 (**A, E, J**, rojo), anti-GFAP (**B, F, J**, blanco) y anti-SVCT2 (**C, G, K**, verde). En **A, E, J** se muestra la superposición de los canales rojo, blanco y verde y en **D, H, L** se muestra la superposición sólo de los canales blanco y verde, respectivamente. Barra de tamaño: 50 μm . Tinción nuclear: Hoechst.

SOD1 G93A

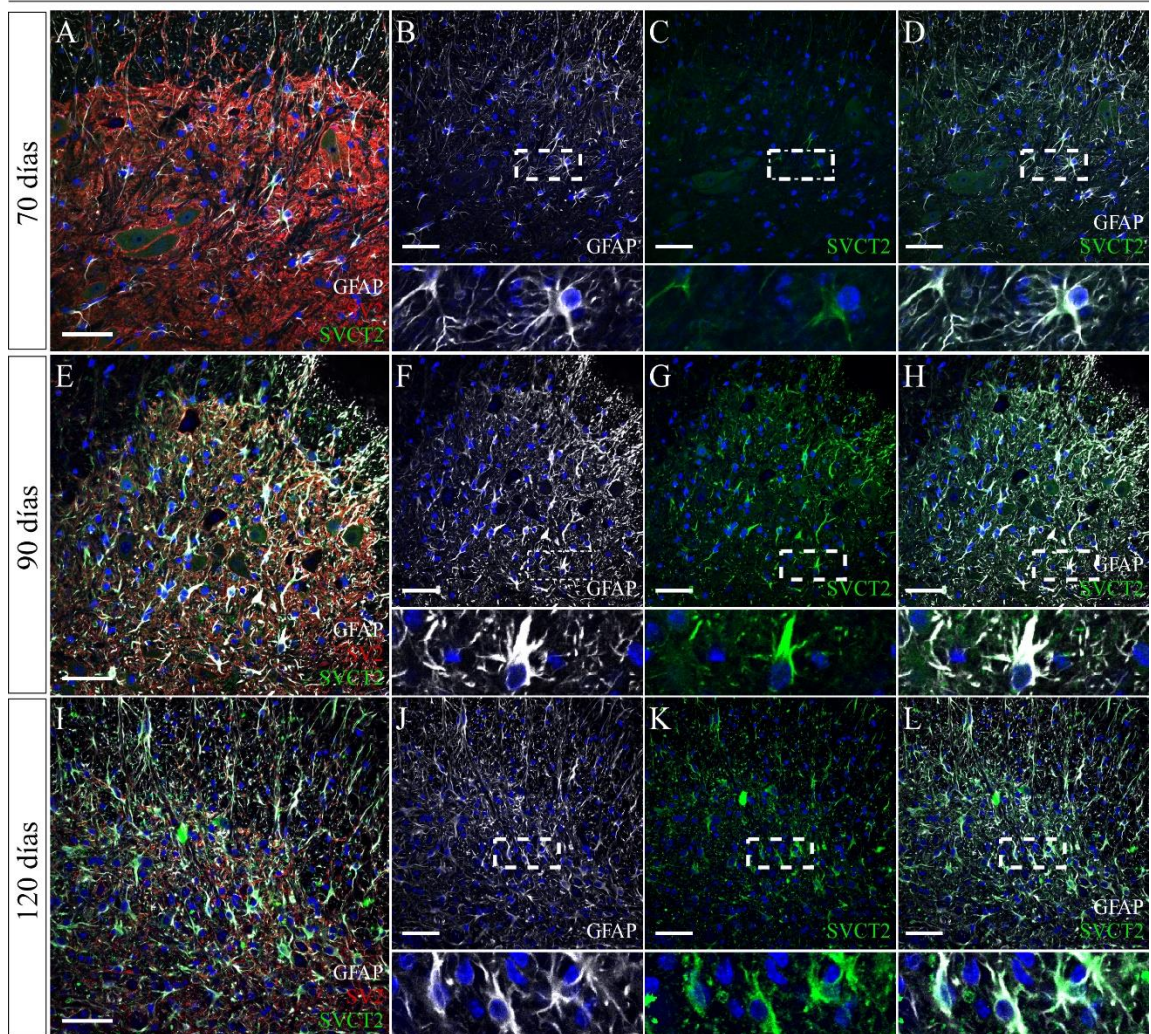
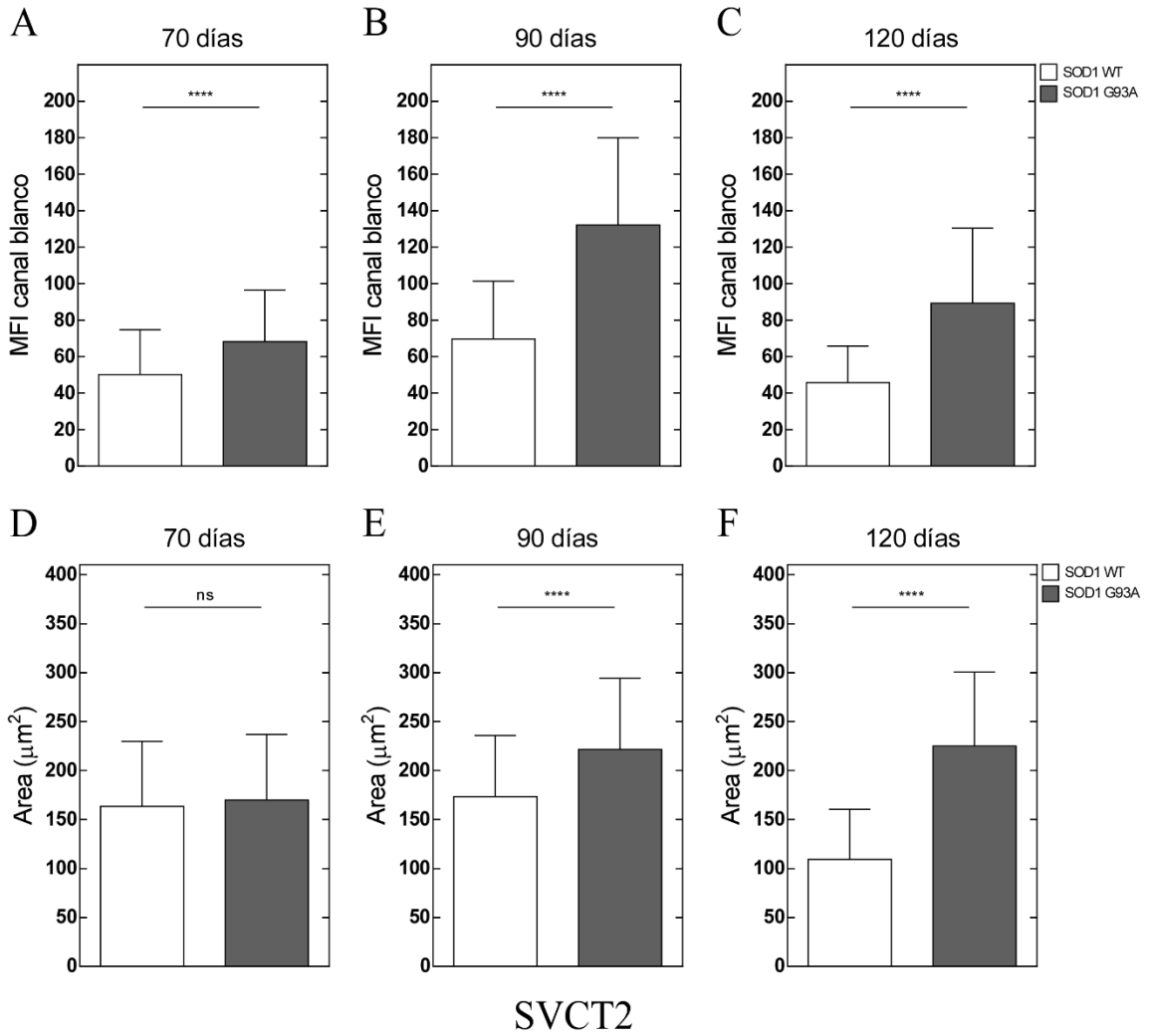


Figura 33: Expresión y localización de SVCT2 en astrocitos de animales SOD1 G93A.

A-L. Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en astas ventrales de la médula espinal lumbar en animales SOD1 G93A de 70 (**A-D**), 90 (**E-H**) y 120 (**I-K**) días de vida, a través de marcaje inmunofluorescente con anticuerpos específicos anti-SV2 (**A, E, J**, rojo), anti-GFAP (**B, F, J**, blanco) y anti-SVCT2 (**C, G, K**, verde). En **A, E, J** se muestra la superposición de los canales rojo, blanco y verde y en **D, H, L** se muestra la superposición sólo de los canales blanco y verde, respectivamente. Barra de tamaño: 50 μm . Tinción nuclear: Hoechst.

GFAP



SVCT2

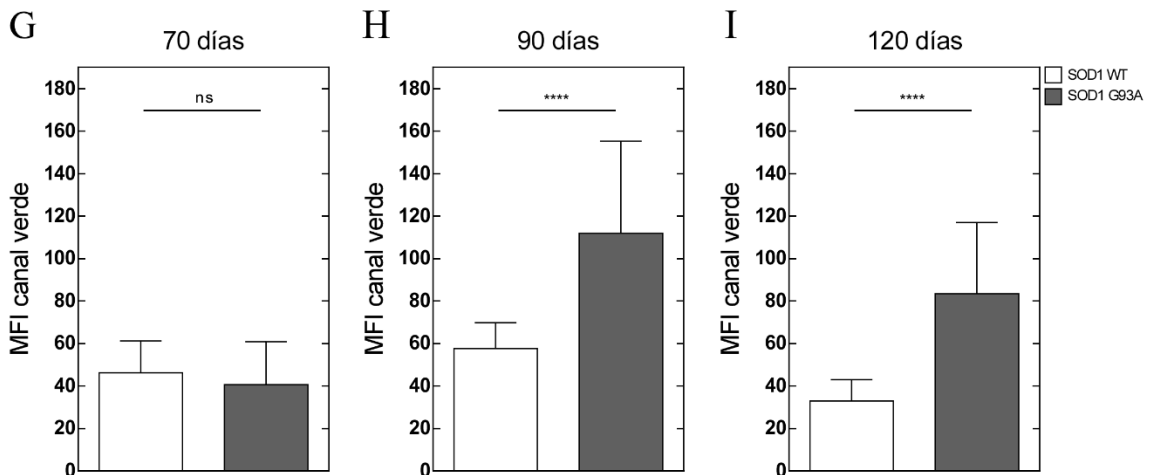


Figura 34: Análisis de la intensidad de fluorescencia y área para GFAP y SVCT2 en astrocitos de la médula espinal de animales SOD1 WT y G93A.

A-C. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) del canal blanco, correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-GFAP, en astas ventrales de la médula espinal lumbar de ratones SOD1 WT y G93A a los 70 (**A**), 90 (**B**) y 120 (**C**) días de vida. **D-F.** Cuantificación del área del canal blanco, correspondiente al marcaje anti-GFAP y medida en μm^2 , en astas ventrales de la médula espinal lumbar de animales SOD1 WT y G93A a los 70 (**D**), 90 (**E**) y 120 (**F**) días de vida. **G-I.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) del canal verde, correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-SVCT2, en astas ventrales de la médula espinal lumbar de ratones SOD1 WT y G93A a los 70 (**G**), 90 (**H**) y 120 (**I**) días de vida. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (**** $p < 0,0001$; N=3).

13.3.5. Efecto de la inyección intracerebroventricular de DHA en animales SOD1 WT y G93A

Como ha sido anteriormente descrito, durante el desarrollo de patologías neurodegenerativas es común la generación de un ambiente oxidante en el SNC (Sbodio et al., 2019), lo cual podría favorecer un incremento en la oxidación de vitamina C y producción de DHA. Con el objetivo de evaluar si esta molécula cumple un rol en la progresión de ALS, se implantaron cánulas dirigidas hacia el IV ventrículo en animales SOD1 WT o G93A de 50-60 días de vida, a los cuales se les administraron 2 dosis semanales de 5 μ L DHA 6 mM (para alcanzar una concentración de DHA en el líquido cefalorraquídeo de aproximadamente 200 μ M) hasta que estos alcanzaron un score neurológico de 4, momento en el que fueron sacrificados y las médulas espinales extraídas.

En primer lugar, evaluamos la función motora de los ratones a través de un ensayo rotarod acelerado, en el cual se mide el tiempo (en segundos) que los animales tardan en caer de una barra en movimiento. En este sentido, observamos un deterioro y progresión de la patología mucho más rápida en las hembras con respecto a los machos, de manera que el análisis fue realizado en hembras de 120 días y en machos de 130 días de edad.

En el caso de hembras control inyectadas con DHA (**Figura 35 A**), observamos que su rendimiento en el rotarod es de $58,19 \pm 9,28$ s, mientras que en hembras SOD1 G93A no tratadas el promedio es de $66,96 \pm 5,10$ s, no observándose

diferencias significativas entre ambas condiciones. Por otro lado, en hembras SOD1 G93A tratadas con DHA hay una disminución significativa en el tiempo que estas permanecen en el rotarod con respecto a las condiciones anteriores, con un promedio de $11,83 \pm 6,02$ s. En el caso de los ratones macho SOD1 WT inyectados (**Figura 35 B**) su rendimiento es de 45,62 s, mientras que en animales SOD1 G93A sin inyectar es, en promedio, $39,10 \pm 11,27$ s. En el caso de los machos G93A inyectados con DHA 6 mM, observamos una disminución significativa en el tiempo de rendimiento, con un promedio de $11,50 \pm 8,46$ s. Así, estos análisis indican que la inyección de DHA en el IV ventrículo de animales SOD1 G93A disminuye de forma significativa la función motora de los mismos.

Posteriormente, realizamos el análisis histológico de muestras derivadas de estos animales. El análisis inmunofluorescente de la médula espinal lumbar, en ratones SOD1 WT inyectados con DHA, mostró resultados similares a los descritos anteriormente, una población de astrocitos de finos procesos, con baja o nula expresión de SVCT2 (**Figura 36 A, C**). La población de MNs fué numerosa y el transportador de AA se observó preferentemente intracelular (**Figura 36 B, C**). Por otro lado, en animales SOD1 G93A no inyectados con DHA, detectamos un incremento significativo en la población astrocítica con respecto a animales control, los cuales además muestran un importante incremento en la expresión de SVCT2 (**Figura 36 D, G**); adicionalmente, si bien se observa una intensa inmunoreacción anti-NF, la población neuronal es significativamente menor que aquella observada en animales SOD1 WT (**Figura 36 E, F**). De forma interesante,

en muestras de animales SOD1 G93A inyectados con DHA 6 mM observamos una importante disminución en la reacción anti-GFAP, junto a una menor tinción anti-SVCT2 (**Figura 36 G, I**) y una población neuronal similar a la observada en animales G93A no inyectados (**Figura 36 H-I**).

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) para el canal correspondiente a GFAP, observándose una disminución significativa en este parámetro en astrocitos de animales SOD1 G93A tratados con DHA, con respecto a animales no tratados (**Figura 37 A**), lo cual se vio acompañado de un incremento estadísticamente significativo en el área de los astrocitos (**Figura 37 B**) y a una importante disminución en la intensidad de fluorescencia promedio para el canal correspondiente a SVCT2 (**Figura 37 C**), sugiriendo una pérdida de ciertas características de astrogliosis reactiva, pero también una posible muerte de los astrocitos. Por otro lado, los análisis cuantitativos revelaron un incremento en la intensidad de fluorescencia promedio para el canal correspondiente a NF en muestras de animales G93A inyectados con DHA (**Figura 37 D**), junto a una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia para el canal correspondiente a SVCT2 (**Figura 37 E**), apuntando a una pérdida del transportador en las MNs.

En conjunto, los datos descritos recientemente apuntan a que, si bien un aumento en las concentraciones de DHA en el líquido cefalorraquídeo afecta significativamente la función motora de los animales SOD1 G93A, también

favorece la pérdida de ciertas características de reactividad astrocítica (menor intensidad en el marcaje anti-GFAP o una menor expresión de SVCT2), además de incrementar el marcaje anti-neurofilamentos. Adicionalmente, la presencia de DHA también estimula una reducción en la expresión de SVCT2 en MNs.

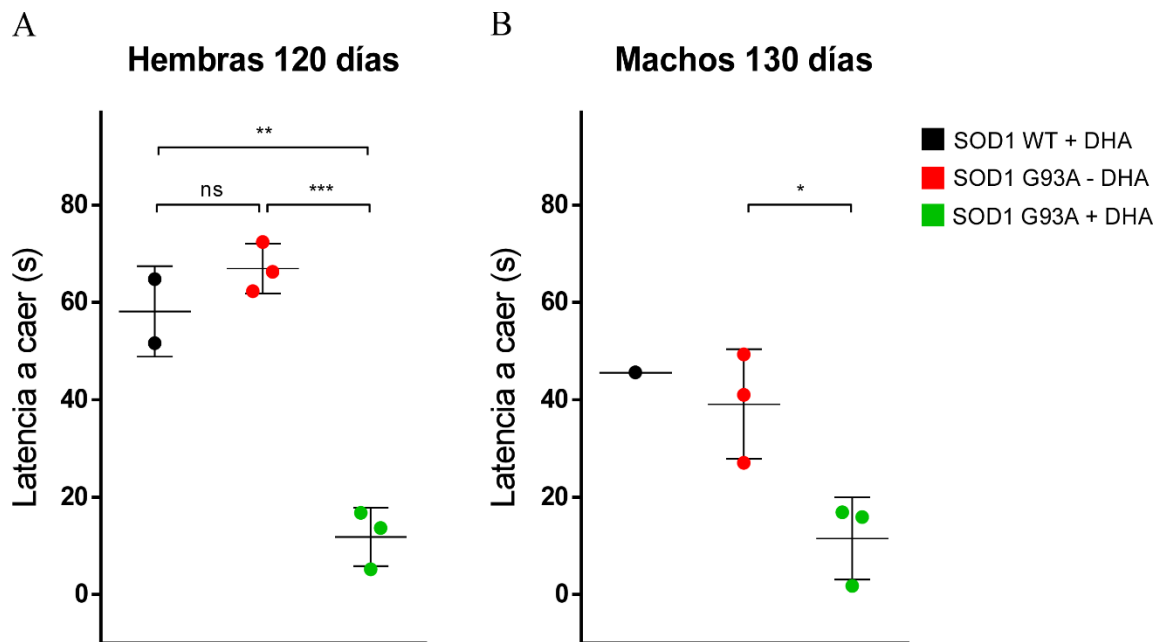


Figura 35: Función locomotora en animales SOD1 WT y G93A canulados.

A-B. Análisis de rotarod acelerado, que mide la latencia (en segundos) de los animales a caer de una barra que gira, en ratones SOD1 WT inyectados con DHA 6 mM, SOD1 G93A no inyectados o inyectados con DHA, en hembras de 120 días (N=2, 3 y 3 respectivamente) (**A**) o machos de 130 días (N=1, 3 y 3 respectivamente) (**B**) de vida. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los datos representan el promedio \pm SD.

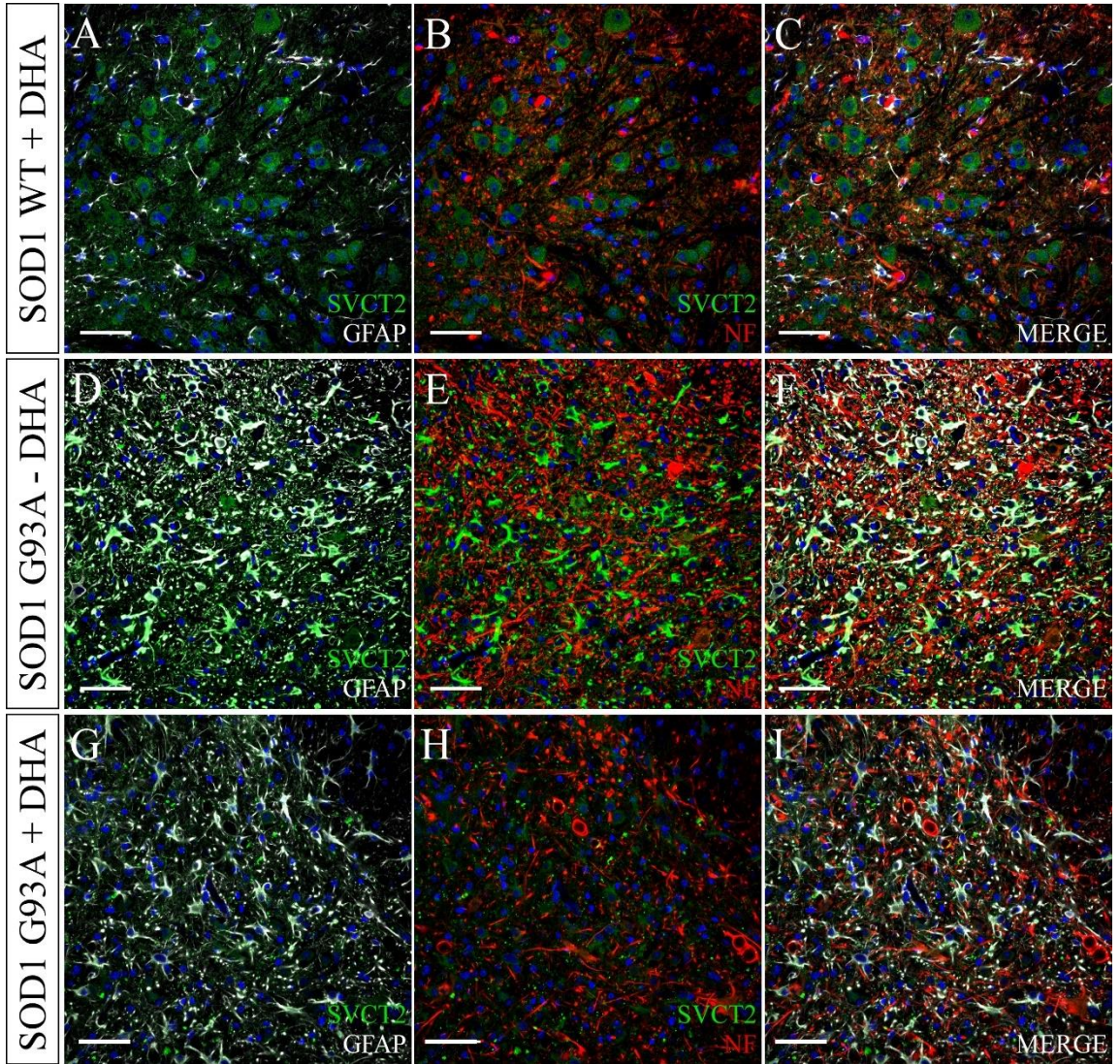
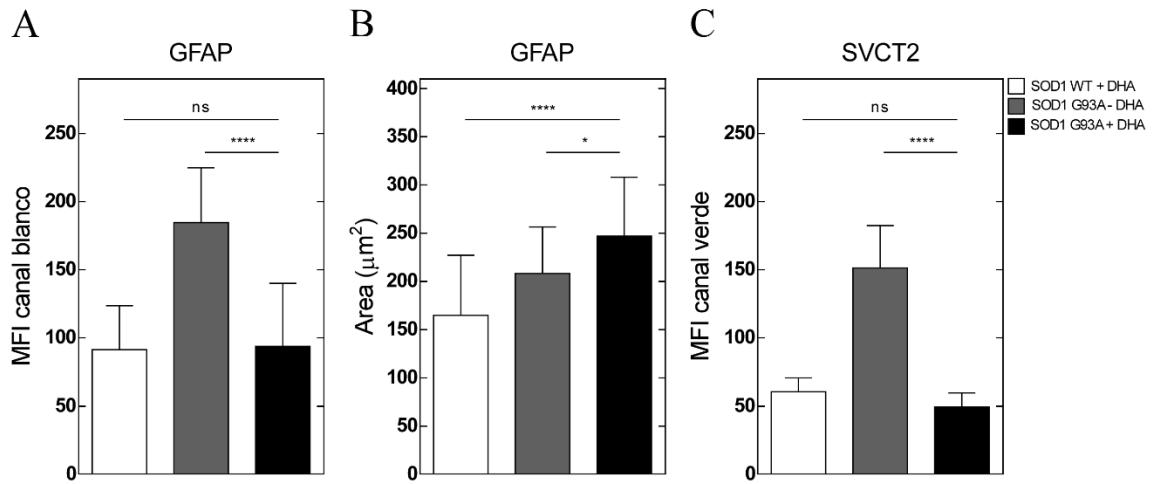


Figura 36: Caracterización inmunohistoquímica de animales SOD1 WT y G93A canulados.

A-I. Análisis inmunohistoquímico de las astas ventrales de la médula espinal lumbar en animales SOD1 WT inyectados con DHA 6 mM (**A-C**), animales SOD1 G93A no inyectados (**D-F**) o inyectados con DHA (**G-I**), utilizando anticuerpos específicos anti-SVCT2 (**A-B, D-E, G-H**, verde), anti-GFAP (**A, D, G**, blanco) y anti-NF (**B, E, H**, rojo). En **C, F, I** se muestra la superposición de canales. Barra de tamaño: 50 μ m. Tinción nuclear: Hoechst.

Astrocitos



Neuronas motoras

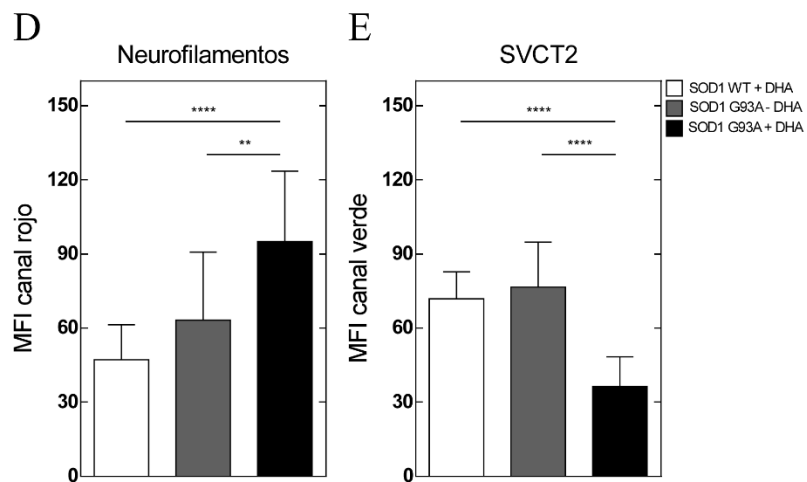


Figura 37: Análisis de la intensidad de fluorescencia para GFAP, NF y SVCT2 en animales SOD1 WT y G93A canulados.

A, C. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) del canal blanco (**A**) y verde (**C**), correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-GFAP y SVCT2, respectivamente, en astas ventrales de la médula espinal lumbar de animales SOD1 WT inyectados con DHA 6 mM, SOD1 G93A no inyectados o SOD1 G93A inyectados con DHA. **B.** Cuantificación del área del canal blanco (GFAP), medida en μm^2 , en astas ventrales de la médula espinal lumbar de animales SOD1 WT inyectados con DHA, SOD1 G93A no inyectados o SOD1 G93A inyectados con DHA. **D, E.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) del canal rojo (**D**) y verde (**E**), correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-NF y SVCT2, respectivamente, en astas ventrales de la médula espinal lumbar de animales SOD1 WT inyectados con DHA, SOD1 G93A no inyectados o SOD1 G93A inyectados con DHA. Análisis estadístico ANOVA, test Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; $N=1$).

13.3.6. Expresión de marcadores de las vías apoptótica y necroptótica en médulas espinales de animales SOD1 WT y G93A

Con el objetivo de evaluar el rol de RIPK1 y la vía involucrada en la progresión de ALS, tomamos cortes transversales de la zona lumbar de la médula espinal y analizamos la expresión y localización de marcadores celulares de las vías apoptótica y necroptótica en las astas ventrales.

El análisis de marcadores de la vía necroptótica en médulas derivadas de animales SOD1 WT, tanto a los 70, 90 y 120 días de edad, mostró patrones de expresión similares: en todas las condiciones observamos una baja expresión de RIPK1, cuya reacción observamos fundamentalmente en un patrón homogéneo en las astas ventrales (**Figura 38 A-C**). De forma similar, también detectamos una baja expresión de RIPK1 fosforilada (RIPK1-P **Figura 38 D-F**), la cual detectamos en un patrón punteado en la región intracelular de las MNs (**Figura 38 G-I, Inset**). Sin embargo, en ninguna de las condiciones analizadas observamos inmunorreacción positiva para la proteína efectora de la necroptosis, MLKL (**Figura 38 J-L**).

Por otro lado, en astas ventrales de la médula espinal de animales SOD1 G93A de 70, 90 y 120 días, si bien no observamos diferencias en la expresión de RIPK1 con respecto a muestras WT (**Figura 39 A-C**), si logramos detectar un incremento en el marcaje anti-RIPK1 fosforilada (**Figura 39 D-F**) en el soma neuronal (**Figura 39 G-I, Inset y flechas**) con respecto a médulas de animales control. Similar a lo

observado en condiciones control, no detectamos inmunoreacción positiva anti-MLKL en médulas SOD1 G93A (**Figura 39 J-L**). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio para el marcaje anti-RIPK1 fosforilada, si bien no mostró diferencias estadísticamente significativas entre muestras SOD1 WT y G93A de 70 días (**Figura 40 A**), si observamos un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia para RIPK1 fosforilada en MNs de médulas SOD1 G93A a los 90 (**Figura 40 B**) y 120 días de vida (**Figura 40 C**), con respecto a muestras control, indicando un incremento en la activación de RIPK1 con el transcurso de ALS.

Por último, evaluamos la activación de la vía apoptótica en médulas espinales de ratones SOD1 WT y G93A utilizando para ello el marcaje anti-caspasa-3 clivada (CASP3cl), caspasa efectora activada por caspasa-8 (Taylor et al., 2008). En muestras control de 70, 90 y 120 días de edad, observamos un débil marcaje para caspasa-3 clivada (**Figura 41 A-C**), el cual detectamos débilmente en el neurópilo, pero se encontró fundamentalmente en la región intracelular de las MNs del asta ventral, detectadas con el anticuerpo anti-NF (**Figura 41 D-F e Inset**). Por otro lado, en médulas SOD1 G93A de 70 días, observamos un aparente incremento en la tinción para caspasa-3 clivada en las MNs (**Figura 42 A, D e Inset**) y cuya intensidad de marcaje incrementó a los 90 (**Figura 42 B, E e Inset**) y 120 días de edad (**Figura 42 C, F e Inset**). Asimismo, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio para el canal blanco, correspondiente al marcaje anti-caspasa-3 clivada, mostró un incremento significativo en la

fluorescencia, en MNs derivadas de médulas SOD1 G93A, en los tres estadios analizados (**Figura 42** G-I), con respecto a MNs derivadas de médulas SOD1 WT.

En conjunto, estas observaciones sugieren que durante la progresión de ALS ocurre la activación de la proteína de andamiaje RIPK1 y el clivaje de la caspasa efectora caspasa-3, apuntando a la activación de una vía de muerte apoptótica dependiente de RIPK1. Adicionalmente, y concordando con reportes de la literatura (Wang, Perera, et al., 2020), no observamos la expresión de MLKL en médulas espinales de ratones SOD1 WT o G93A, apuntando a que la vía necroptótica no participaría de la muerte neuronal en ALS.

SOD1 WT

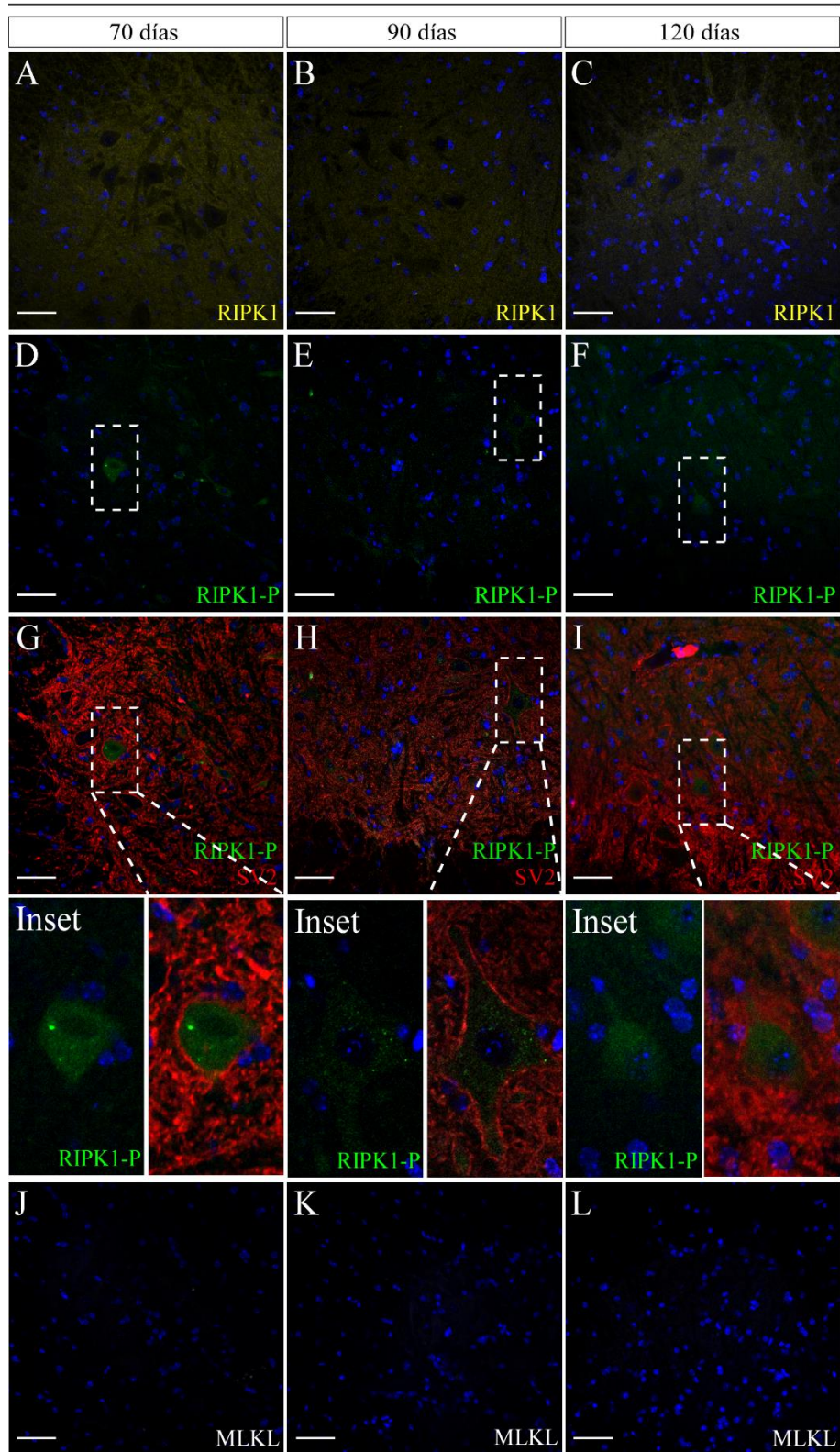


Figura 38: Expresión de marcadores de la vía necroptótica en la médula espinal de animales SOD1 WT.

A-L. Análisis inmunohistoquímico en las astas ventrales de la médula espinal lumbar, en animales SOD1 WT de 70 (**A, D, G, J**), 90 (**B, E, H, K**) y 120 días (**C, F, I, L**) de vida, utilizando anticuerpos específicos anti-RIPK1 (**A-C**, amarillo), anti-RIPK1 fosforilada (**D-F**, verde) anti-SV2 (**G-I**, rojo) y anti-MLKL (**J-L**, blanco).

Inset. Magnificación de las imágenes **D** y **G** (70 días), **E** y **H** (90 días) y **F** e **I** (120 días), respectivamente. Barra de tamaño: 50 μm . Tinción nuclear: Hoechst.

SOD1 G93A

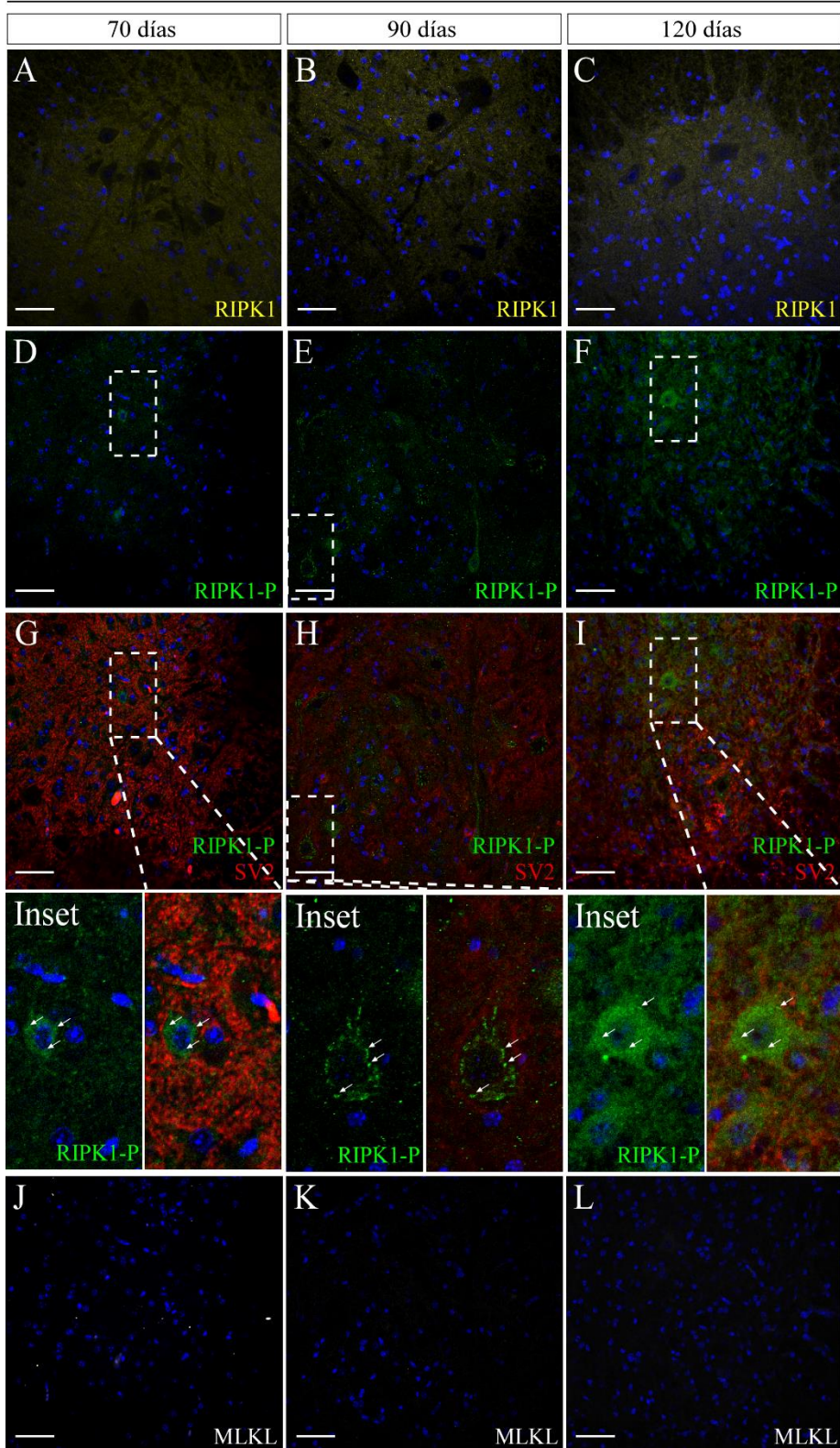


Figura 39: Expresión de marcadores de la vía necroptótica en la médula espinal de animales SOD1 G93A.

A-L. Análisis inmunohistoquímico en las astas ventrales de la médula espinal lumbar, en animales SOD1 G93A de 70 (**A, D, G, J**), 90 (**B, E, H, K**) y 120 días (**C, F, I, L**) de vida, utilizando anticuerpos específicos anti-RIPK1 (**A-C**, amarillo), anti-RIPK1 fosforilada (**D-F**, verde) anti-SV2 (**G-I**, rojo) y anti-MLKL (**J-L**, blanco).

Inset. Magnificación de las imágenes **D** y **G** (70 días), **E** y **H** (90 días) y **F** e **I** (120 días), respectivamente. Barra de tamaño: 50 μm . Tinción nuclear: Hoechst.

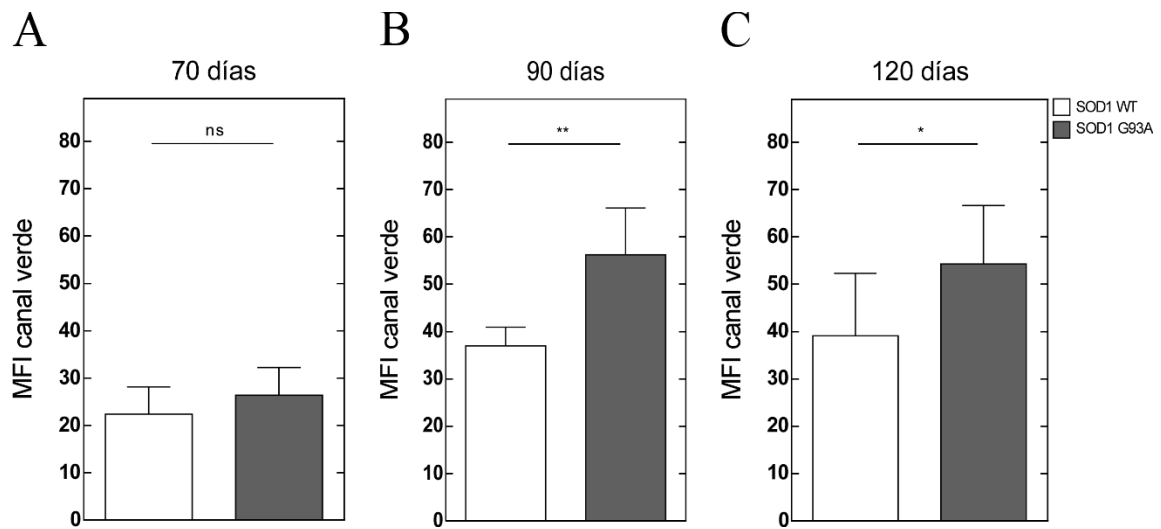


Figura 40: Análisis de la intensidad de fluorescencia para RIPK1-P en MNs de animales SOD1 WT y G93A

A-C. Intensidad de fluorescencia promedio (MFI) para el canal verde, correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-RIPK1-P, en MNs de la médula espinal lumbar de animales SOD1 WT y G93A de 70 (A), 90 (B) y 120 (C) días de vida. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=6-10 MNs por condición).

SOD1 WT

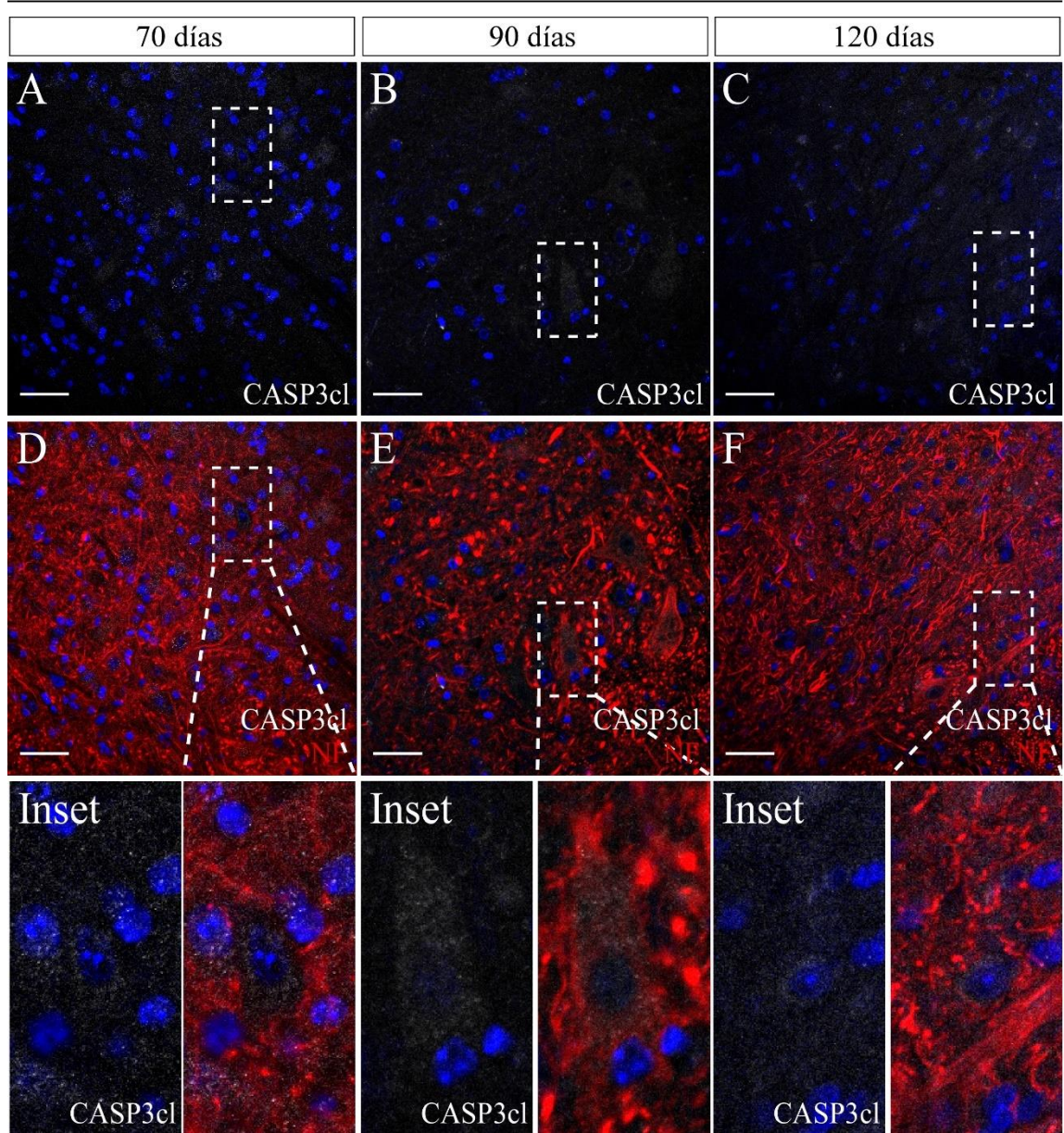


Figura 41: Expresión de caspasa-3 clivada en la médula espinal de animales SOD1 WT.

A-F. Análisis inmunohistoquímico en las astas ventrales de la médula espinal lumbar, en animales SOD1 WT de 70 (**A, D**), 90 (**B, E**) y 120 días (**C, F**) de edad, utilizando anticuerpos específicos anti-caspasa-3 clivada (**A-C**, blanco) y anti-neurofilamentos (**D-F**, rojo). **Inset.** Magnificación de las imágenes **A** y **D** (70 días), **B** y **E** (90 días) y **C** y **F** (120 días), respectivamente. Barra de tamaño: 50 μm . Tinción nuclear: Hoechst.

SOD1 G93A

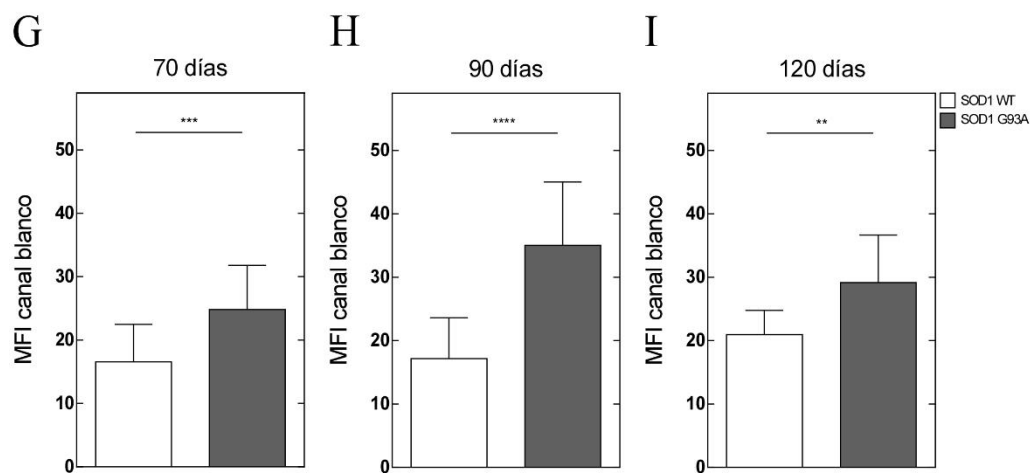
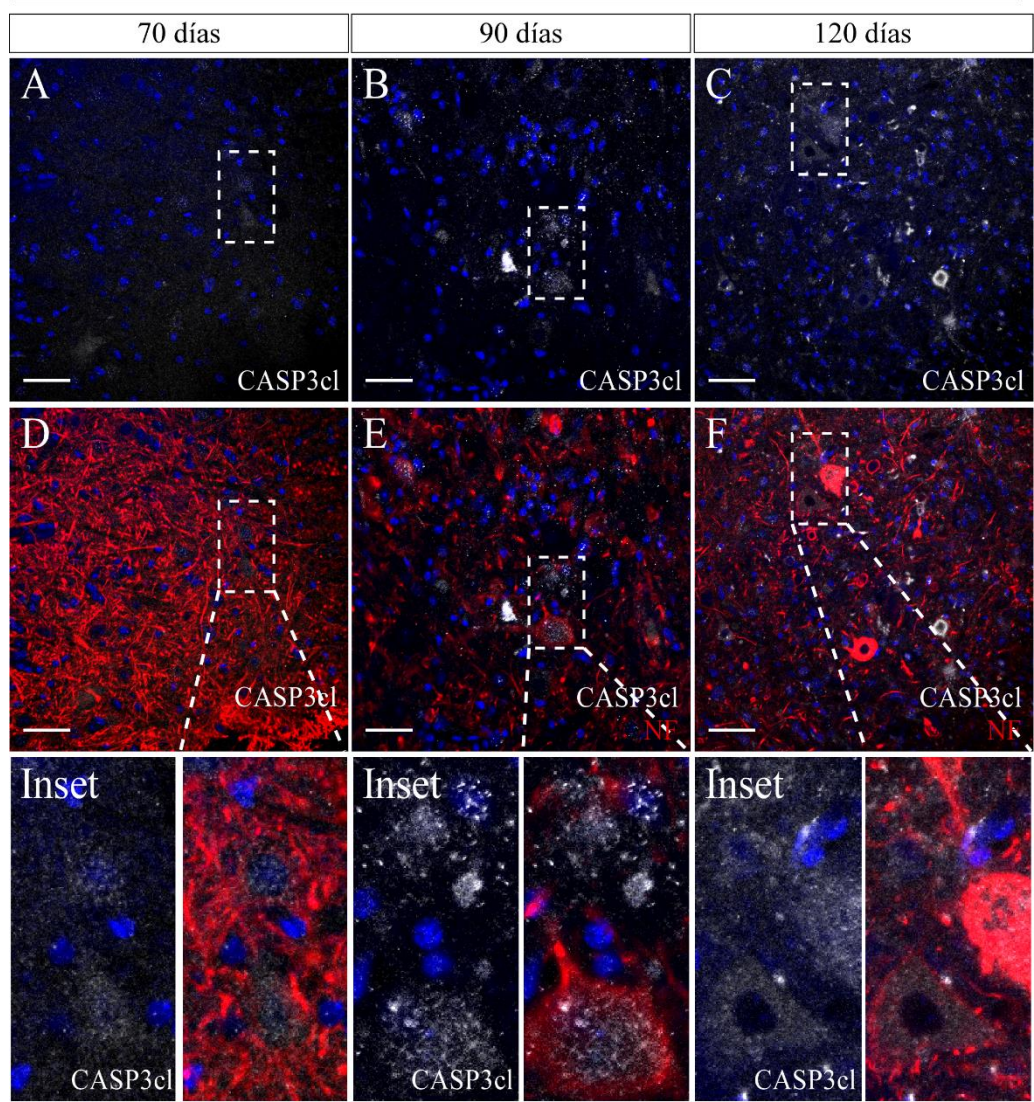


Figura 42: Expresión de caspasa-3 clivada en la médula espinal de animales SOD1 G93A.

A-F. Análisis inmunohistoquímico en las astas ventrales de la médula espinal lumbar, en animales SOD1 G93A de 70 (**A, D**), 90 (**B, E**) y 120 días (**C, F**) de edad, utilizando anticuerpos específicos anti-caspasa-3 clivada (**A-C**, blanco) y anti-neurofilamentos (**D-F**, rojo). **Inset.** Magnificación de las imágenes **A** y **D** (70 días), **B** y **E** (90 días) y **C** y **F** (120 días), respectivamente. Barra de tamaño: 50 μm . Tinción nuclear: Hoechst. **G-I.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) del canal blanco, correspondiente al marcaje con el anticuerpo anti-caspasa-3 clivada, en MNs de la médula espinal lumbar, en animales SOD1 WT y G93A de 70 (**G**), 90 (**H**) y 120 (**I**) días de vida. Análisis estadístico t-student, test paramétrico (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; N=10-20 neuronas por condición).

14. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado anteriormente, la vitamina C es un micronutriente esencial para las funciones metabólicas del organismo, donde se encuentra fundamentalmente en su forma reducida, AA, cumpliendo no solo funciones antioxidantes, sino que también actuando como cofactor en variadas reacciones enzimáticas, entre otros (Carr y Frei, 1999; Ferrada et al., 2021; Harrison y May, 2009; Salazar et al., 2023). En el SNC, el alto metabolismo neuronal implica el uso de elevadas concentraciones de AA y la generación de DHA, por lo que resulta esencial el reciclamiento de vitamina C para mantener concentraciones constantes en el parénquima: esta función la cumplen los astrocitos, células que poseen un alto poder reductor y por lo tanto pueden captar el DHA liberado por las neuronas y reducirlo nuevamente hacia AA. Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas crónicas, donde hay un incremento en las especies oxidantes y los astrocitos adquieren características neurotóxicas, este reciclamiento se puede perder y el DHA se puede acumular. En este contexto, han sido poco estudiados los efectos de DHA: se ha reportado que DHA estimula modificaciones en el metabolismo neuronal, disminuyendo la tasa glicolítica e incrementando la actividad de la vía de las pentosas fosfato e (Cisternas et al., 2014), lo cual está asociado a la inhibición de la enzima glicolítica GAPDH (Yun et al., 2015). Adicionalmente, DHA disminuye el porcentaje de neuritas en NE *in vitro*, lo cual es prevenido cuando una célula recicladora (como los astrocitos) está presente (Espinoza et al., 2020; Salazar et al., 2021); sin embargo, cuando

esto no ocurre, DHA induce muerte neuronal (Garcia-Krauss et al., 2016) de tipo necroptótica (Ferrada et al., 2020), la cual depende de la activación de la proteína de andamiaje RIPK1. En este escenario, hasta la fecha se desconoce si DHA activa mecanismos que dependan de la actividad de RIPK1 y participen en la degeneración de neuritas.

Así, en esta tesis trabajamos con NE derivadas de células de rata y MNs diferenciadas desde iPSCs humanas, donde evaluamos el efecto de altas concentraciones de DHA y la inhibición de RIPK1 sobre los procesos neuríticos. Adicionalmente, extrapolamos nuestro trabajo hacia el estudio de ALS, donde trabajamos con ratones SOD1 G93A y SOD1 WT y evaluamos el estado de MNs y astrocitos, relevantes para el reciclamiento de vitamina C y mantención de las concentraciones de AA y DHA.

En el primer capítulo se trabajó con NE, obtenidas a partir de células madre neurales aisladas desde la corteza cerebral de embriones de rata, las cuales se cultivaron en suspensión en presencia de los factores de crecimiento EGF y bFGF, para luego ser adheridas en placas con poli-L-lisina. Bajo estas condiciones, las NE dan origen a una población neuronal altamente enriquecida, dada por la expresión del marcador neuronal tubulina β III; adicionalmente, se destaca la presencia de una pequeña población celular positiva a los marcadores de indiferenciación SOX2 y nestina, sugiriendo que existe un pequeño porcentaje de células dentro de la NE que mantienen su potencial proliferativo y de formación

de esta estructura (Jensen y Parmar, 2006). Por otro lado, mediante qPCR y tinción inmunocitoquímica observamos la expresión de los transportadores de vitamina C SVCT2, GLUT1 y GLUT3; además, los análisis mostraron la acumulación intracelular de AA y un transporte efectivo de DHA, confirmando que las NE expresan transportadores de vitamina C funcionales, tal como ha sido previamente descrito en la literatura (Espinoza et al., 2020; Pastor et al., 2013).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento durante 72 horas con AA, la forma reducida de la vitamina C, favorece una disminución en el volumen de procesos celulares en NE (Espinoza et al., 2020), efecto que también ha sido observado frente a la sobreexpresión del transportador de AA, SVCT2, en cultivos primarios de neuronas corticales (Salazar et al., 2021). En este trabajo, el tratamiento con AA 100 μ M durante 24 horas indujo el crecimiento de neuritas significativamente más cortas y menos ramificadas, con respecto a una condición control; adicionalmente, nuestro análisis de los niveles intracelulares de AA mostró una disminución progresiva en su concentración en el tiempo, lo cual sugiere un aumento concomitante en los niveles de DHA y que, en conjunto con lo anterior, apunta a esta molécula como la responsable de los efectos observados.

En efecto, posteriormente analizamos el crecimiento de neuritas en presencia de DHA 100, 200 y 400 μ M, observando una disminución progresiva en el largo de los procesos celulares y número de ramificaciones, a la vez que las

concentraciones de DHA aumentan, con el efecto más prominente observado en presencia de DHA 400 μ M. En este sentido, se ha observado que el menor porcentaje de NE con neuritas, luego del tratamiento prolongado con AA, es prevenido en presencia de la línea astrocítica U87 o astrocitos corticales (Espinoza et al., 2020). La adición de astrocitos al cultivo celular también ha mostrado prevenir el acortamiento de neuritas observado frente a la sobreexpresión de SVCT2 en neuronas *in vitro* (Salazar et al., 2021). Estos datos indican que la presencia de una célula recicladora, capaz de captar el DHA del medio, permite mantener la morfología y largo de las neuritas, y además sugiere nuevamente que el menor largo de neuritas observado en nuestros análisis, ocurriría debido a la presencia de DHA. Cabe destacar que, la delección genética de SVCT2 mediante el sistema CRISPR/Cas9 en la línea celular N2a, ha mostrado prevenir completamente la muerte celular inducida por el tratamiento combinado con AA y H₂O₂ (Ferrada et al., 2020); adicionalmente, se ha reportado un aumento en los niveles de proteínas glicadas en células PC12, luego del tratamiento con vitamina C (Scheffler et al., 2019), y un incremento en los niveles del producto de glicación carboximetil-lisina y de proteínas carboniladas de alto peso molecular, luego del tratamiento prolongado con AA (Espinoza et al., 2020), lo que en conjunto permite proponer que DHA induce un efecto tóxico en neuronas.

Previamente se ha descrito que AA inhibe la fisión mitocondrial (Li et al., 2015), lo que consecuentemente sugiere que DHA podría activar la fisión. Así,

analizamos la relación entre la forma oxidada de la vitamina C y las mitocondrias. Si bien luego del tratamiento con DHA no detectamos cambios en el volumen mitocondrial, ni tampoco en el reclutamiento de Drp1 a estas estructuras, indicando que DHA no participaría en la activación de la fisión, si detectamos una disminución progresiva en el potencial de membrana mitocondrial en NE, lo cual ocurrió de forma concomitante al incremento en las concentraciones de DHA.

El potencial de membrana mitocondrial se genera a partir del movimiento de protones a través de la membrana mitocondrial interna y es esencial para la síntesis de ATP, paso final en el proceso de fosforilación oxidativa (Angelova y Abramov, 2018), donde la producción de especies oxidantes es un evento común (Murphy, 2009). En este contexto, las mitocondrias cuentan con un sistema antioxidante capaz de reducir las especies oxidantes generadas, formado por Mn-SOD, glutatión peroxidasa y el sistema perirredoxina (Rabilloud et al., 2001); adicionalmente, estos organelos también acumulan vitamina C a la forma de AA, que también participaría de la defensa antioxidante (Kc et al., 2005). En este sentido, se ha descrito que la vitamina C ingresaría a las mitocondrias como DHA a través de GLUT1 (Kc et al., 2005) y GLUT10 (Lee et al., 2010), siendo reciclado mediante un mecanismo dependiente de la cadena transportadora de electrones (Li et al., 2002; May et al., 2007); sin embargo, elevados niveles de DHA podrían superar la capacidad reductora mitocondrial, favoreciendo su acumulación en este organelo y, sumado a la continua producción de especies oxidantes, estimulando un desbalance redox y consecuentemente una pérdida del potencial

de membrana mitocondrial. En la literatura, se ha descrito que el tratamiento con 5 mM vitamina C es capaz de disminuir significativamente el potencial transmembrana en células de cáncer colorrectal *KRAS* (Cenigaonandia-Campillo et al., 2021) donde la hiperpolarización de las membranas mitocondriales es un evento común. En este sentido, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ha sido previamente asociada a la necroptosis (Sawai, 2014) y también se ha observado durante la activación de la vía necroptótica mediada por DHA (Ferrada et al., 2020), sugiriendo que este evento podría ocurrir como una consecuencia de la activación de RIPK1.

Así, para evaluar si DHA activa a RIPK1, primero confirmamos su expresión en NE. Si bien el tratamiento con DHA durante 12 o 24 horas no indujo cambios en la expresión de su ARNm, los análisis de Western blot sí mostraron una disminución importante en la intensidad de la banda para la proteína endógena, sugiriendo que la proteína podría estar siendo degradada o clivada. Efectivamente, también observamos un incremento en la intensidad de banda para RIPK1 clivada, consistentes con las bandas descritas para su clivaje por acción de caspasa-8 (Lalaoui et al., 2020; Newton et al., 2019). En este sentido, se ha descrito como el clivaje de RIPK1 por caspasa-8 en Ser324 (Lin et al., 1999) inhibe la activación de la necroptosis y apoptosis RIPK1-dependiente (Newton et al., 2019). Similar a lo descrito anteriormente, el tratamiento de NE con DHA 400 μ M indujo la formación de neuritas significativamente más cortas y menos ramificadas con respecto a condiciones control, efecto que fue parcial, pero

significativamente revertido por la presencia del inhibidor específicos de RIPK1, Nec-1s, apuntando a un rol para esta proteína en el efecto inducido por DHA. En este sentido, nuestras cuantificaciones de largo de neuritas y puntos de *branching* en NE sugieren una activación temprana de RIPK1, además, se ha descrito que los eventos de fosforilación de quinasas río abajo de un receptor ocurren de forma rápida (Blazek et al., 2015); así, luego de 1 hora de tratamiento con DHA observamos un incremento significativo en la fosforilación de RIPK1 en Ser166, la cual fue inhibida en presencia de Nec-1s. Si bien la inhibición no fue total, es posible que esto se deba a la concentración de Nec-1s utilizada (10 μ M), pues se ha descrito que el efecto inhibitorio sobre la autofosforilación de RIPK1 ocurre de forma dosis-dependiente (Takahashi et al., 2012).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la vía de señalización de TNFR1, la actividad de RIPK1 es inhibida mediante distintos eventos de ubiquitinación y fosforilación, en donde el reclutamiento de las quinasas p38 MAPK y MK2 permiten la fosforilación inhibitoria de un *pool* citosólico de esta proteína (Dondelinger et al., 2017; Jaco et al., 2017), mientras que el reclutamiento de TAK1, IKK α/β y TBK/IKK ϵ permite la fosforilación inhibitoria de RIPK1 en el complejo I (Dondelinger et al., 2015; Geng et al., 2017; Lafont et al., 2018), dando cuenta de la fuerte regulación bajo la que RIPK1 se encuentra. La importancia de la regulación de RIPK1 es evidente en el desarrollo, donde ratones *RIPK1^{D325A/D325A}*, que expresan RIPK1 no-clivable por caspasa-8, mueren en el período embrionario, observándose anomalías en el embrión y

deformaciones en la vasculatura del saco vitelino (Lalaoui et al., 2020; Newton et al., 2019; Zhang, Dowling, et al., 2019), además de un incremento en la autofosforilación de RIPK1, clivaje de caspasa-3 y -8 y la muerte celular en MEFs derivados de estos animales, luego del tratamiento con TNF α (Lalaoui et al., 2020; Newton et al., 2019). *In vivo*, pacientes con mutaciones heterocigotas en el sitio de aspartato clivado por caspasa-8, presentan el llamado Síndrome auto inflamatorio inducido por RIPK1 resistente a clivaje, caracterizado, entre otros, por fiebre, linfadenopatía y un incremento en marcadores de inflamación (Lalaoui et al., 2020). Sin embargo, cabe mencionar que los animales *RIPK1*^{-/-} no sobreviven después del primer día postnatal (Kelliher et al., 1998), situación que es revertida frente a la delección génica de *RIPK3* y *CASP8* o *RIPK3* y *FADD* (Dillon et al., 2014); de forma paralela, ratones que expresan RIPK1 inactiva, *RIPK1*^{D138N/D138N}, sobreviven hasta la adultez (Polykratis et al., 2014). En conjunto, estos reportes apuntan a que, fallas o modificaciones en la regulación de RIPK1 que favorezcan su activación, pueden desencadenar la activación de mecanismos de muerte.

Por otro lado, también se ha descrito el rol de RIPK1 en la activación de la vía apoptótica (Amin et al., 2018), observándose el ensamblaje del complejo IIb (FADD, caspasa-8 y RIPK1) frente a la estimulación de MEFs con TNF α y en presencia de un inhibidor de TAK1 (Dondelinger et al., 2013); por otro lado, en embriones *TBK1*^{-/-}, que sobreviven sólo hasta el estadio embrionario 13.5, se ha observado degeneración hepática severa con un incremento en la activación de

caspasa-3, lo cual es prevenido por la introducción de la mutación D138N en RIPK1 (Xu et al., 2018), lo que en conjunto indica que, la inhibición o ausencia de al menos una de las proteínas que inhiben a RIPK1, permitiría la activación de una vía apoptótica dependiente de caspasas y de la actividad de RIPK1. De esta forma, evaluamos si el efecto de DHA sobre los procesos celulares, además de estar asociado a la activación de RIPK1, está relacionado con un mecanismo dependiente de caspasas, observando una recuperación significativa, pero no completa, en el largo y ramificación de neuritas en nuestros cultivos de NE en presencia del inhibidor de pan-caspasa zVAD-FMK, con respecto al tratamiento con DHA y el tratamiento control.

Hasta el momento, nuestros datos sugieren que en NE *in vitro*, DHA induce la formación de neuritas significativamente más cortas y menos ramificadas, fundamentalmente a través de un mecanismo asociado a la activación de RIPK1, dado por los resultados obtenidos en presencia de Nec-1s. Sin embargo, nuestros experimentos en presencia de zVAD también apuntan a un mecanismo dependiente de caspasas. En este contexto, reportes previos de la literatura han mostrado que DHA es un inhibidor directo de IKK α/β (Carcamo et al., 2002; Carcamo et al., 2004), y han sugerido que DHA podría actuar como un inhibidor directo e indirecto de TAK1 y MK2, todas proteínas quinasa encargadas de fosforilar inhibitoriamente a RIPK1; además, reportes previos en nuestro laboratorio han mostrado que la vitamina C activa la necroptosis *in vitro*, mecanismo de muerte que depende de la activación de RIPK1 (Ferrada et al.,

2020). En conjunto, estos datos sugieren que el menor largo y ramificación de neuritas en NE, ocurre debido a la activación de una vía apoptótica RIPK1-dependiente, dada por la interacción de RIPK1 activa con el adaptador FADD y caspasa-8 en el Complejo IIb citosólico (Delanghe et al., 2020). En este contexto, se ha descrito la presencia de un intermediario de RIPK1 altamente insoluble y ubiquitinado, el cual se forma en el complejo I (asociado a la membrana plasmática) mediante un mecanismo que involucra la activación por fosforilación de RIPK1, y el cual actuaría como un “puente” entre el Complejo I y la formación del Complejo IIb (Amin et al., 2018). Este mecanismo sería desencadenado por la acumulación de DHA en neuronas, dada por la ausencia de una célula recicladora (como el astrocito) que pueda captarlo y reducirlo hacia AA. En este escenario, dado por una falta de reciclamiento de vitamina C, DHA actuaría como un regulador negativo de 3 puntos de control de la actividad de RIPK1. Así, por primera vez, proponemos a DHA, la forma oxidada de la vitamina C, como una molécula reguladora de la actividad de RIPK1, lo cual podría tener relevancia patológica (**Figura 43**).

Posteriormente, buscamos analizar si los efectos observados en nuestras NE derivadas de NSCs de rata, son reproducidos en células humanas. Para ello, nos acercamos al estudio de la esclerosis lateral amiotrófica utilizando neuronas motoras, obtenidas a partir de la diferenciación de células humanas indiferenciadas.

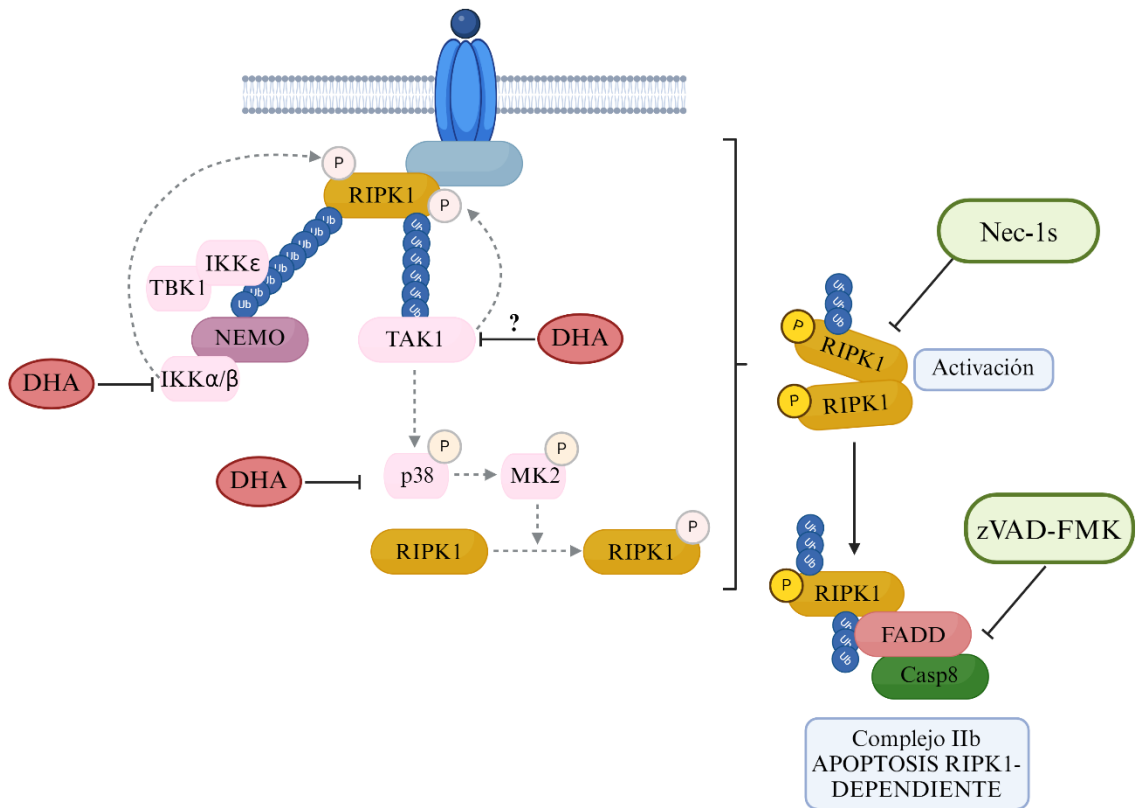


Figura 43: Regulación de RIPK1 mediada por DHA.

La acumulación de DHA en neuronas, dada por falta de reciclamiento de vitamina C, favorecería la inhibición directa de IKK α/β y la inhibición indirecta de MK2; además, también podría inhibir directamente a TAK1, todas proteínas reguladoras de la actividad de RIPK1, por acción de DHA. En este escenario, se estimularía la activación de RIPK1 por autofosforilación (inhibido por Nec-1s) y el ensamblaje del complejo IIb, formado por el adaptador FADD, RIPK1 activa y caspasa-8 (inhibido por zVAD).

La caracterización de MNs obtenidas desde células HUES9, línea que deriva de células madre embrionarias humanas (Cowan et al., 2004), mostró la presencia de SVCT2 y una reacción positiva para el marcador de presinápsis Piccolo; además, reveló una disminución progresiva en el marcaje para GLUT1 durante el proceso de diferenciación, consistente con reportes de una disminución en la expresión de GLUT1 y un aumento en la expresión de GLUT3, durante la diferenciación neuronal (Bondy et al., 1992; Vannucci, 1994). Adicionalmente, se observó un incremento en la expresión de SVCT2, lo cual ha sido previamente descrito durante los primeros días de desarrollo postnatal en neuronas corticales (Salazar et al., 2014), periodo donde ocurren los eventos de maduración neuronal (Lee et al., 2009), lo que en conjunto con lo anterior, sugiere un efectivo proceso de diferenciación neuronal.

De forma paralela, también caracterizamos MNs diferenciadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (hiPSCs), obtenidas de pacientes control y pacientes con la mutación M337V en el gen *TDP43*, asociada al desarrollo de ALS (Bilican et al., 2012; Brown y Al-Chalabi, 2017). Similar al caso anterior, en hiMNs control también logramos observar la expresión de SVCT2 y Piccolo; sin embargo, con respecto a células control, en hiMNs *TDP43* observamos una disminución significativa en la expresión de SVCT2, junto con un incremento en la expresión del transportador GLUT1, sugiriendo una menor capacidad de las células para captar AA, pero además un incremento en la capacidad de transporte de DHA.

Debido al cese en la donación de células HUES9 y hiPSCs *TDP43*, continuamos nuestros análisis con la línea celular AF22, las cuales derivan de hiPSCs, poseen características de neuroepitelio (Falk et al., 2012) y utilizamos como células control. Así, diferenciamos estas células hacia MNs espinales utilizando un protocolo basado en los mecanismos de neuralización, ventralización y caudalización que ocurren durante el desarrollo de la médula espinal, seguido de un período de maduración (Bos et al., 2019; Calvo-Garrido et al., 2021; Davis-Dusenbery et al., 2014; Faravelli et al., 2014; Maury et al., 2015), permitiendo la obtención de células de morfología neuronal, arborizadas, y que muestran expresión de marcadores asociados a MNs, como el factor de transcripción HB9 (Arber et al., 1999) y la enzima colina acetiltransferasa (Maury et al., 2015), indicando un exitoso proceso de diferenciación y obtención de neuronas motoras maduras. Adicionalmente, estudios recientes en nuestro laboratorio han revelado la expresión de los transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1 en estas MNs (Tesis Magister Javiera Smith-Ghigliotto).

Por último, trabajamos con hiPSCs UCLi004-A, derivadas de un paciente con diagnóstico de ALS/FTD y una expansión en la repetición GGGGCC en el gen *C9ORF72*, donde comprobamos la expresión del glicolípido de superficie SSEA4, como ha sido observado en otros cultivos de iPSCs (Abujarour et al., 2013) y la capacidad de estas células de diferenciarse hacia las 3 capas germinales. A partir de nuestras iPSCs UCLi004-A logramos la obtención de MNs espinales, sin embargo, observamos una elevada muerte celular durante el proceso de

maduración neuronal, lo cual limitó nuestras posibilidades de caracterización y desarrollo de algunos análisis posteriores. En este sentido, análisis por RNA-seq de célula única, realizados en hiMNs derivadas de hiPSCs *C9ORF72*, han mostrado una regulación negativa de genes previamente asociados a la maduración y envejecimiento de MNs espinales (Ho et al., 2016; Ho et al., 2021), lo cual podría ser una respuesta al fenómeno de muerte observado en nuestros cultivos.

A nuestro conocimiento, no ha sido previamente descrita la expresión de SVCT2 en células HUES9 o hiPSCs; por otro lado, estudios en curso de nuestro laboratorio sí han revelado la expresión del transportador de AA en células AF22 (Tesis Magister Javiera Smith-Ghigliotto). De forma interesante, la expresión de SVCT2 tampoco ha sido previamente descrita en neuronas motoras diferenciadas *in vitro*; así, este constituye el primer registro de la presencia de este transportador en MNs obtenidas a partir de la diferenciación de células HUES9 y hiPSCs.

Utilizando nuestras MNs derivadas de células AF22 y hiPSCs *C9ORF72*, evaluamos el efecto de DHA sobre los procesos neuronales. Para ello, utilizamos como una medida de daño la presencia de varicosidades, descritas como “engrosamientos”, esferoides o perlas que se forman focalmente en los axones (Beirowski et al., 2010). Estas han sido ampliamente estudiadas en el contexto de lesiones traumáticas o daño, como modelos *in vitro* de daño axonal difuso

(Kilinc et al., 2008) o aplastamiento del nervio óptico (Beirowski et al., 2010), donde se han observado varicosidades que contienen acumulaciones de mitocondrias, cuerpos multivesiculares y elementos desorganizados del citoesqueleto (Beirowski et al., 2010; Kilinc et al., 2008; Yong et al., 2021). Por otro lado, la presencia de varicosidades también ha sido observada en patologías neurodegenerativas del SNC como ALS, en donde muestras de pacientes han revelado la presencia de esferoides axonales en las vías corticospinales del cerebro y tronco encefálico (Okamoto et al., 1990), los cuales también han sido descritos en las astas anteriores de la médula espinal lumbar (Delisle y Carpenter, 1984; Sasaki et al., 1988).

Para nuestros análisis trabajamos con MNs aisladas, pero adicionalmente logramos la generación de NE, a través del cultivo de células diferenciadas durante 2 días en condiciones de suspensión, similar a la metodología utilizada para la generación de NE de rata (Espinoza et al., 2020; Oyarce et al., 2018; Pastor et al., 2013). Al igual que nuestras MNs, las NE también presentan reacción positiva para el marcador de maduración ChAT, indicando que estas estructuras contienen neuronas motoras maduras.

Tanto en MNs aisladas como NE obtenidas desde células AF22, la presencia de DHA indujo un número significativamente mayor de varicosidades/neurita con respecto al tratamiento control; en este sentido, la cantidad de varicosidades observada luego de 24 horas de tratamiento con DHA es mayor que aquella

detectada luego de 12 horas, mientras que en condiciones control, las varicosidades se mantienen relativamente constantes, apuntando a que una mayor exposición a DHA induce un mayor daño.

Resultados similares fueron observados en MNs y NE obtenidas a partir de la diferenciación de hiPSCs *C9ORF72*, sin embargo, destacamos el mayor número de varicosidades/neurita que se observa cuando hay una mutación presente, sugiriendo que estas células son más susceptibles al daño. En este sentido, se ha observado que la disminución en la expresión de *C9orf72* induce la acumulación de agregados de ataxina-2, proteína de unión a ARN; en conjunto, la presencia de estas dos condiciones induce una disrupción en la arborización neuronal y el acortamiento de los axones de neuronas motoras en pez cebra (Sellier et al., 2016). Por otro lado, estudios en hiMNs derivadas de pacientes ALS *C9ORF72* han revelado una disminución en el tráfico axonal de mitocondrias y lisosomas con respecto a células control, primero en la región del axón más distal y luego en la más cercana al soma neuronal, efecto que es prevenido frente a la escisión de la expansión en G_4C_2 en el gen *C9ORF72* (Abo-Rady et al., 2020; Pal et al., 2021). Como ya se mencionó recientemente, se ha observado la acumulación de mitocondrias y cuerpos vesiculares en varicosidades, consistente con fallas en su transporte a lo largo del axón; en conjunto, estos datos apoyan la noción de que la presencia de la expansión en la repetición G_4C_2 otorga mayor susceptibilidad de las MNs al daño, lo cual se ve exacerbado en presencia de DHA.

En MNs y NE derivadas de células AF22 también evaluamos el efecto del inhibidor de RIPK1, Nec-1s, sobre la formación de varicosidades luego del tratamiento con DHA; en ambos casos, observamos una disminución significativa en el número de varicosidades por proceso neurítico, apuntando a un rol para RIPK1 en la formación de estas estructuras.

En modelos de enfermedad de Parkinson, el tratamiento con Nec-1s previene completamente la fragmentación y *beading* de neuritas observado en neuronas mesencefálicas *in vitro* tratadas con 6-hidroxidopamina (Onate et al., 2020); por otro lado, el tratamiento con Nec-1 previene la degeneración axonal en explantes de nervio ciático y nervio óptico de ratón, lo cual también es observado al inyectar Nec-1 en el nervio ciático *in vivo* previo al aplastamiento del mismo (Arrazola et al., 2019). En modelos de ALS, la expresión de RIPK1 inactiva (RIPK1 D138N) en animales K.O para el gen *OPTN*, o bien el tratamiento con Nec-1s, previene la pérdida de axones motores en la médula espinal (Ito et al., 2016), lo que en conjunto apoya la noción de que RIPK1 participaría en la inducción de varicosidades luego del tratamiento con DHA. Así, estos resultados recientemente descritos reproducen y avalan los datos obtenidos en NE de rata *in vitro*, indicando que la acumulación de DHA, dada por la ausencia de una célula recicladora que pueda captarlo y reciclarlo, genera un daño en las neuritas y axones de células humanas *in vitro*. En este contexto, los datos aquí presentados, en conjunto con los reportes de la literatura, sugieren que la formación de varicosidades y eventual pérdida de neuritas y axones en MNs humanas *in vitro*

ocurriría a través de un mecanismo que involucra la activación de RIPK1, dada por la regulación negativa de sus puntos de control mediada por DHA (**Figura 43**).

Por último, en el tercer objetivo de esta tesis buscamos acercar nuestro estudio a los análisis *in situ* e *in vivo*. Para ello, trabajamos con el modelo animal más utilizado para el estudio de ALS, los ratones SOD1 G93A y su control, ratones SOD1 WT. Tal como se ha descrito en la literatura, alrededor de los 3 a 4 meses de edad, los animales comenzaron a presentar sintomatología: una disminución en el peso corporal y la retracción de las patas traseras al tomarlos desde la cola, observándose la parálisis de una o ambas en un período de dos semanas, asociado a un incremento en el *score* neurológico (Gurney et al., 1994; Hatzipetros et al., 2015).

Posteriormente, realizamos una caracterización de la médula espinal utilizando distintos marcadores. Para ello, tomamos cortes de la zona lumbar, donde se ha observado el mayor daño en animales SOD1 G93A (Guo et al., 2010), y analizamos las astas ventrales, zona donde se ubican las neuronas motoras de la médula espinal y donde también se han observado los mayores efectos asociados a la presencia de esta mutación (Guo et al., 2010; Gurney et al., 1994). Así, logramos la detección de neurofilamentos, el marcador de presinápsis neuronal, SV2, junto con el marcador de núcleos neuronales, NeuN, en la sustancia gris, confirmando la presencia de una población neuronal en las astas

ventrales. Adicionalmente, observamos reacción positiva para GFAP en la zona más externa de la sustancia blanca, indicando la presencia de astrocitos marginales de la médula espinal, tal como se ha descrito en la literatura (Liu et al., 2013; Liuzzi y Miller, 1987); en la sustancia gris, se observaron astrocitos con procesos discretos. Por otro lado, observamos una reacción positiva para los transportadores de vitamina C en neuronas, GLUT1 y SVCT2. En este contexto, sólo se ha reportado la presencia del ARNm de SVCT2 en la médula espinal de ratas (Zarebkohan et al., 2009); de esta forma, este constituye el primer reporte indicando la expresión del transportador de AA en neuronas motoras de la médula espinal de ratón, a través de técnicas inmunohistoquímicas. Por el contrario, SVCT2 ha sido previamente detectado en múltiples tipos neuronales del SNC, como neuronas corticales, hipocampales, neuronas del hipotálamo y células de Purkinje en el cerebelo (García Mde et al., 2005; Mun et al., 2006; Oyarce et al., 2018; Salazar et al., 2014; Tsukaguchi et al., 1999). Finalmente, nuestros resultados indican que las motoneuronas de la médula espinal poseen la maquinaria necesaria para captar ambas formas químicas de la vitamina C.

Paralelamente, la expresión de SVCT2 no fue observada en los astrocitos de la sustancia gris, consistente con reportes previos indicando que SVCT2 no es expresado en astrocitos (Pastor et al., 2013); sin embargo, sí observamos la presencia de este transportador en los astrocitos marginales, tal como ha sido previamente descrito para astrocitos del área externa de la corteza entorrinal y la

glia limitans, barrera astrocítica asociada a la lámina basal que rodea el cerebro (Nualart et al., 2012).

Adicionalmente, analizamos cambios en la expresión y localización de SVCT2 en neuronas motoras de la médula espinal durante la progresión de ALS, en animales SOD1 WT y G93A a los 70, 90 y 120 días de vida, correspondientes con un estadio pre-sintomático, sintomático y de punto final (Fischer et al., 2004). Mientras que en médulas de animales SOD1 WT observamos MNs con una distribución del transportador fundamentalmente homogénea en el soma neuronal, en médulas SOD1 G93A observamos un incremento progresivo en el porcentaje de neuronas con SVCT2 agregado intracelularmente. En este sentido, estudios de sobreexpresión de SVCT2 en células HSVT-C3 han mostrado la presencia del transportador en las cisternas del retículo endoplásmico, además de complejos vesiculares cerca de la membrana plasmática, sugiriendo una rápida síntesis y transporte de SVCT2 a la membrana (Salazar et al., 2021). La presencia de estas estructuras vesiculares positivas a SVCT2, también ha sido observada en células hepáticas HepG2 que sobreexpresan el transportador (Subramanian et al., 2010); adicionalmente, también ha sido descrita la importancia de las regiones N- y C-terminal de SVCT2 para su localización en la membrana plasmática (Subramanian et al., 2010).

Sin embargo, nuestros análisis muestran que el marcaje para SVCT2 no colocaliza con KDEL en MNs lumbares de ratones SOD1 G93A, sugiriendo que

SVCT2 no es retenido en el retículo endoplásmico. En este sentido, previamente se ha reportado la internalización de SVCT2 en microglías activadas por lipopolisacárido, en un mecanismo mediado por caveolina-1 y c-Src (Portugal et al., 2017), resultando en un incremento en la producción de ROS y citoquinas proinflamatorias (Portugal et al., 2017). En el contexto de la vitamina C, la menor expresión de SVCT2 en la membrana plasmática resultaría en una disminución en la captación de AA, lo que se traduce en un menor poder antioxidante; por otro lado, el incremento en los niveles de especies oxidantes favorecería la oxidación del AA remanente en las células hacia DHA, pudiendo estimular cambios en el metabolismo neuronal, inhibiendo la enzima glicolítica GAPDH y disminuyendo la tasa glicolítica, aumentando la actividad de la vía de las pentosas fosfato (Cisternas et al., 2014; Yun et al., 2015) y favoreciendo la muerte celular mediada por la activación de RIPK1 (Ferrada et al., 2020; Garcia-Krauss et al., 2016). Adicionalmente, se ha descrito que DHA es capaz de inhibir la activación de la vía NF- κ B al inhibir directamente la actividad del complejo IKK α / β (Carcamo et al., 2002; Carcamo et al., 2004), encargado de fosforilar a I κ B α , permitiendo la liberación de NF- κ B y su translocación al núcleo. De forma interesante, se han identificado dos sitios de reconocimiento de NF- κ B en la secuencia de SVCT2 (Savini et al., 2007); es más, estudios han reportado que NF- κ B es capaz de incrementar la expresión de SVCT2 en neuronas retinales de pollo (Portugal et al., 2012) y que su inhibición disminuye la expresión de este transportador en miotubos C2C12 (Savini et al., 2007).

En conjunto, los datos entregados por la literatura sugieren, por una parte, la internalización de SVCT2 como un posible mecanismo regulatorio en MNs SOD1 G93A, pero por otro lado, también apuntan a un mecanismo donde el alto estrés oxidativo, observado en condiciones neurodegenerativas como ALS, estimula un incremento en las concentraciones de DHA, y con ello la inhibición de la vía NF- κ B y una menor expresión de SVCT2 en la membrana de las neuronas, favoreciendo la muerte neuronal y progresión de la patología. En este contexto, tanto en médulas espinales de ratones SOD1 G93A como en muestras *post-mortem* de pacientes ALS se ha descrito un aumento significativo en los niveles de ROS en las astas ventrales, además de un incremento en los niveles de proteínas carboniladas, eventos asociados a una mayor expresión de la subunidad catalítica de la enzima NADPH oxidasa (encargada de la producción de anión superóxido), gp91^{phox} (Wu et al., 2006); de forma interesante, nuestro grupo de trabajo ha reportado que la acumulación de DHA en cultivos de NE *in vitro* incrementa los niveles de proteínas carboniladas (Espinoza et al., 2020), sugiriendo nuevamente un rol para la forma oxidada de DHA en ALS.

Por otro lado, un incremento en las concentraciones de DHA en la médula espinal podría sugerir alteraciones en el reciclamiento de vitamina C dado por el acoplamiento entre neuronas y astrocitos. En este sentido, el análisis de la médula espinal reveló un incremento significativo en la población de astrocitos en las astas ventrales de ratones SOD1 G93A, lo cual estuvo asociado a un incremento en el área celular, la intensidad de fluorescencia en el marcaje para

GFAP y, de manera importante, un aumento significativo en la expresión de SVCT2, características que no fueron observadas en astrocitos de médulas SOD1 WT y que apuntan a la adquisición de un fenotipo reactivo. En este sentido, se ha descrito la presencia de reactividad astrocítica, en las astas ventrales de la médula espinal lumbar de pacientes ALS, a la forma de astrocitos con morfología alargada y largos procesos (Schiffer et al., 1996). En ratones SOD1 G93A, el incremento en la población de astrocitos en la médula espinal ha sido reportado ya a los 47 días de vida, indicando que es un evento que inicia temprano en el desarrollo de ALS (Fischer et al., 2004). La astrogliosis reactiva ha sido descrita como una respuesta celular que ocurre frente al daño en el SNC (Escartin et al., 2021), durante la cual los astrocitos pueden liberar tanto factores neuroprotectores como neurotóxicos (Patani et al., 2023; Phatnani y Maniatis, 2015). Así, se ha descrito cómo la presencia de mutaciones en los astrocitos puede resultar tóxica, favoreciendo cambios en la expresión génica (Ziff et al., 2022), la liberación de moléculas tóxicas (Arredondo et al., 2022; Haidet-Phillips et al., 2011) y la progresión de ALS (Di Giorgio et al., 2008; Haidet-Phillips et al., 2011; Re et al., 2014).

En este contexto, la expresión del ARNm SVCT2 en astrocitos *in situ* fue observada por primera vez luego de la inducción de isquemia cerebral (Berger et al., 2003). Mas recientemente, nuestro grupo de trabajo ha descrito la expresión de SVCT2 en astrocitos bajo variadas condiciones patológicas, como la inyección de neuraminidasa, daño cortical o epilepsia, aunque este fenotipo no fue

observado en muestras *post-mortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Salazar et al., 2018), sin embargo, la expresión de este transportador es una característica que no fue observada en astrocitos de muestras control (Salazar et al., 2018). De manera similar, en el presente trabajo detectamos la presencia de SVCT2 en astrocitos derivados de médulas espinales SOD1 G93A, células que además presentan características asociadas a eventos de astrogliosis reactiva, a diferencia de lo observado en médulas control. En conjunto con lo descrito en la literatura, estos datos apuntan a que la expresión de SVCT2 en astrocitos es un evento observado fundamentalmente bajo condiciones en las que estas células adquieren un fenotipo reactivo, y sugieren que la presencia de este transportador podría actuar como un marcador de astrogliosis reactiva.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las patologías neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de elevados niveles de especies reactivas. En particular, en astrocitos de médulas *post-mortem* de pacientes ALS y de ratones SOD1 G93A, se ha descrito un incremento en los niveles de nitrotirosina y en los niveles de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (Almer et al., 1999; Sasaki et al., 2000), sugiriendo elevados niveles de óxido nítrico (NO). En este sentido, se ha descrito que NO modula la expresión de SVCT2 a través de la activación de la vía NF- κ B (Portugal et al., 2012), complejo de señalización que se ha visto regulado positivamente en astrocitos derivados de iPSCs de pacientes ALS (Haidet-Phillips et al., 2011). En conjunto, estos datos sugieren que el incremento en la expresión de SVCT2 en los astrocitos podría ocurrir mediante

un mecanismo mediado por NO y la vía NF- κ B, en respuesta al incremento en los niveles de especies reactivas. En el contexto de la vitamina C, la presencia de SVCT2 en astrocitos sugiere una mayor capacidad para captar AA y así incrementar su poder reductor, pero también implica una menor disponibilidad extracelular de esta molécula para ser captada por las MNs presentes en la médula, células que adicionalmente internalizan SVCT2 y, por lo tanto, no pueden captar AA. Bajo estas circunstancias, el acoplamiento neurona-astrocito que permite el reciclamiento de vitamina C se pierde, favoreciendo un incremento en las concentraciones de DHA (**Figura 44**).

En este contexto, nuestros análisis *in vivo* mostraron que la inyección de DHA en el IV ventrículo disminuyó significativamente el tiempo en que ratones SOD1 G93A tardan en caer desde un equipo de rotarod acelerado, apuntando a un empeoramiento de la función motora por acción de DHA. Sin embargo, también observamos una disminución significativa en la expresión de GFAP y SVCT2 en astrocitos de médulas G93A, sugiriendo una pérdida de algunas características asociadas a gliosis reactiva, pero tampoco podemos descartar la muerte de los astrocitos. Adicionalmente, observamos un incremento en la expresión de neurofilamentos en MNs, con respecto a ratones G93A no inyectados, lo que podría sugerir una mejora en la integridad de las neuronas; sin embargo, esto no se traduce en mayores niveles de expresión de SVCT2, es más, la adición de DHA al líquido cefalorraquídeo estimula una disminución significativa en la expresión del transportador en MNs. En conjunto, estos datos sugieren una

aparente mejora en la salud de la médula espinal, no obstante, esto no se reflejado en la función motora de los animales.

Con respecto a los efectos del tratamiento con DHA, se ha descrito que puede reducir el tamaño de la zona infartada en modelos de infarto isquémico agudo (Spector, 2016); por otro lado, estudios recientes han mostrado que la inyección intraperitoneal con DHA en el modelo de animales envejecidos SAMP8, puede mejorar la histología y función renal (Forman et al., 2020). Sin embargo, a la fecha no se ha reportado en la literatura los efectos del tratamiento con DHA en un contexto patológico crónico. Si bien en nuestros análisis desconocemos por qué ocurriría esta dualidad en el efecto de DHA, los análisis inmunohistoquímicos sugieren que podría ocurrir una recuperación parcial del reciclamiento de vitamina C en el médula espinal, reflejado en un incremento en la expresión de neurofilamentos en MNs y que estaría dado por la pérdida de algunas características de reactividad en los astrocitos.

Finalmente, en la última parte de este trabajo evaluamos la activación de RIPK1 y cuál es la vía de muerte involucrada en la degeneración neuronal durante la progresión de ALS. En este escenario, han sido múltiples los mecanismos asociados a la muerte de MNs, incluyendo la vía apoptótica (Martin, 1999), necroptótica (Ito et al., 2016) y ferroptótica (Wang et al., 2022). En nuestros análisis, observamos un incremento significativo en la fosforilación de RIPK1 en MNs de médulas SOD1 G93A, con respecto a las muestras control; en este

contexto, se ha descrito un incremento en la fosforilación de RIPK1 en Ser14/15 lisados de médula espinal de pacientes ALS (Ito et al., 2016), adicionalmente, la administración oral de Nec-1s a ratones SOD1-G93A retrasó el inicio de la sintomatología motora, apuntando a un rol de RIPK1 en la degeneración neuronal (Ito et al., 2016). Por otro lado, en MNs (diferenciadas desde células madre humanas o de ratón) cocultivadas con astrocitos obtenidos de pacientes ALS, se ha observado una reducción significativa en la muerte neuronal luego del tratamiento con Nec-1, indicando que la actividad de RIPK1 también tiene un rol *in vitro* (Re et al., 2014). Sin embargo, a nuestro conocimiento no se ha reportado previamente la fosforilación de RIPK1 en Ser166 en MNs de la médula espinal *in situ*, por lo que este constituiría el primer reporte donde se observa la activación de RIPK1 directamente en neuronas espinales.

De forma interesante, no se ha observado la expresión de MLKL, proteína efectora de la vía necroptótica, en las astas ventrales de médulas espinales SOD1 WT o G93A (Dermentzaki et al., 2019; Wang, Perera, et al., 2020). En este sentido, tampoco se han observado mejoras en el número de MNs o la función motora de ratones SOD1 G93A frente a la delección genética de RIPK3 (Dermentzaki et al., 2019) o MLKL (Wang, Perera, et al., 2020), sugiriendo que la muerte de tipo necroptótica no participaría en la progresión de ALS, contrario a lo que otros grupos de trabajo han descrito (Ito et al., 2016; Re et al., 2014). En este contexto, en nuestros análisis tampoco observamos la expresión de MLKL,

apoyando de esta forma la noción de que la necroptosis no participaría de la progresión de ALS.

Por último, estudiamos la activación de la vía apoptótica en nuestras médulas espinales a través del marcaje de la caspasa efectora activa, caspasa-3 clivada. Así, en muestras control observamos una débil expresión concentrada fundamentalmente en la región intracelular de las MNs, la cual incrementó significativamente en MNs de las astas ventrales en médulas SOD1 G93A. En este contexto, se ha descrito que ciertos tejidos adultos, entre los que se incluyen el cerebro y la médula espinal, son refractarios a la apoptosis, dada una baja expresión de proteínas proapoptóticas como Bax, Bak y caspasas -3 y -8 (Sarosiek et al., 2017). Sin embargo, en MNs espinales de ratones SOD1 G93A en estadio sintomático, se ha reportado un incremento en la expresión y activación de caspasas -1 y -3; es más, la inyección intracerebroventricular del inhibidor zVAD resultó en un incremento en el número de MNs en la zona cervical de la médula, una significativa mejora en la función motora y en la supervivencia de los animales (Li et al., 2000). El análisis morfológico de muestras humanas ALS ha revelado la presencia de neuronas en la médula espinal con características de muerte apoptótica, como la condensación del citoplasma y el núcleo, junto a un incremento en la actividad de caspasa-3 en las astas ventrales y un aumento en la interacción Bax-Bax en la corteza motora, sugerente de la activación de mecanismos proapoptóticos (Martin, 1999). Adicionalmente, análisis de *microarray* combinado con microdissección láser en muestras de

médula espinal de pacientes ALS, han mostrado una regulación positiva de genes asociados a muerte celular, incluyendo caspasa-1, -3 y -9, en MNs (Jiang et al., 2005), lo que en conjunto demuestra que, tanto en modelos animales como en pacientes, hay un incremento en la expresión de proteínas apoptóticas durante la progresión de ALS, sugiriendo un rol para esta vía en la patología. Sin embargo, también existe controversia con respecto al rol de la apoptosis en la muerte de MNs; en este sentido, estudios han fallado en detectar fragmentación del ADN y un marcaje positivo contra caspasa-3 activa en médulas de ratones SOD1 G93A (Migheli et al., 1999), mientras que en muestras *post-mortem* de pacientes con ALS, si bien se ha observado un incremento en el ARNm de caspasa-9 en la médula espinal, no se detectaron diferencias en la tinción anti-caspasa-3 en MNs espinales con respecto a muestras control (Yamazaki et al., 2005), lo que en conjunto ha permitido sugerir que la muerte de neuronas motoras en ALS no ocurriría mediante un mecanismo apoptótico.

Sin embargo, nuestros resultados muestran un incremento en la activación de RIPK1 y de caspasa-3 en neuronas motoras de la médula espinal, además de la ausencia de la proteína efectora de la vía de muerte necroptótica, MLKL. En conjunto, estos datos sugieren que, en ratones SOD1 G93A, la degeneración neuronal observada durante la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica, ocurre a través de un mecanismo apoptótico dependiente de RIPK1, dado por la activación del complejo citosólico IIb y formado por FADD, caspasa-8 y RIPK1, y que culmina con la activación de caspasas efectoras, incluyendo caspasa-3,

llevando a la muerte neuronal. A nuestro conocimiento, en la literatura no hay reportes que relacionen directamente la activación de caspasas y RIPK1 con la pérdida de MNs en ALS.

Así, por primera vez, proponemos que durante la progresión de ALS se altera el reciclamiento de vitamina C, evento dado por un incremento en la expresión de SVCT2 en astrocitos y la internalización de este transportador en neuronas motoras de la médula espinal. En este escenario, sumado al ambiente oxidativo característico de las patologías neurodegenerativas, es altamente probable que el DHA se acumule e ingrese a las neuronas. Dada la condición crónica de ALS, la acumulación de DHA sería un proceso progresivo en el tiempo, donde las neuronas podrían, en primer lugar, modificar su metabolismo y, posteriormente, comenzar a degenerarse. En este contexto, DHA afecta los procesos neuríticos y además puede inducir la muerte celular, lo cual ocurriría a través de la inhibición de quinasas reguladoras de la actividad de RIPK1. Sumado al incremento en la expresión de caspasas, estas condiciones llevarían a la activación de apoptosis mediada por la actividad de RIPK1, que culminaría con la activación de caspasas efectoras como caspasa-3 y la muerte neuronal (**Figura 44**).

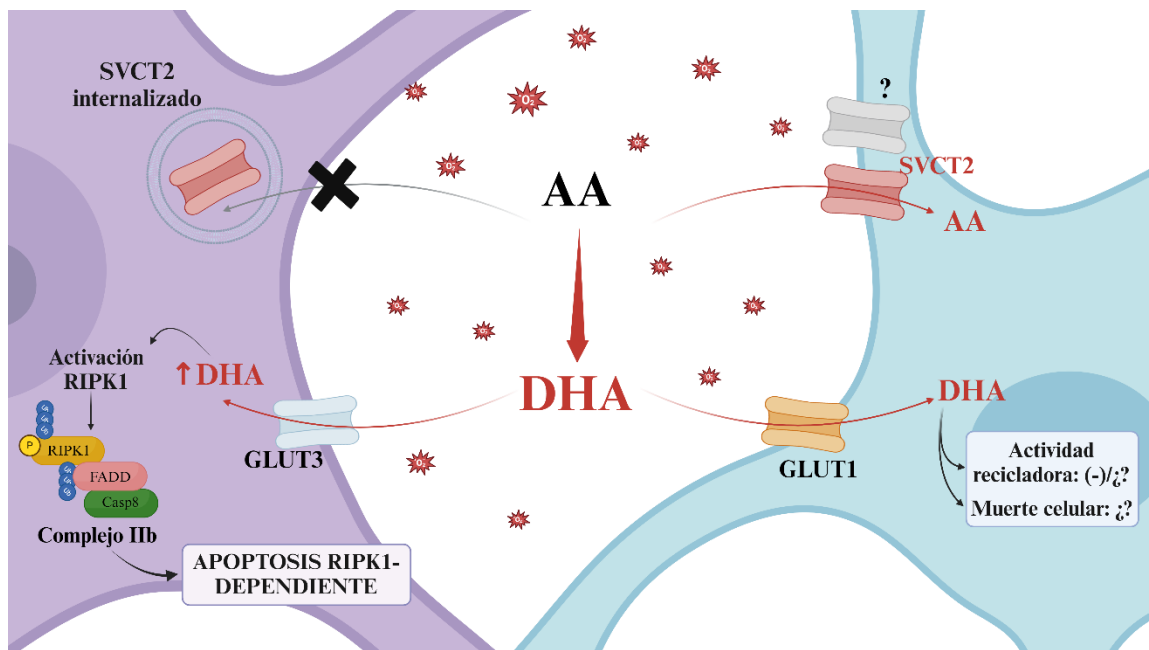


Figura 44: Pérdida del reciclamiento de vitamina C durante la progresión de ALS.

Durante la progresión de ALS, hay un incremento en la expresión de SVCT2 en astrocitos (derecha); por otro lado, este transportador es internalizado en neuronas motoras (izquierda); en este contexto, AA no podría ingresar a las neuronas, pero además podría ser captado el astrocito. Adicionalmente, los altos niveles de especies oxidantes circundantes favorecerían la oxidación extracelular de AA a DHA, el cual podría acumularse e ingresar nuevamente a las MNs. Esto llevaría a modificaciones en el metabolismo y neuronal y la activación de RIPK1, culminando en su reclutamiento al complejo IIb junto a las proteínas FADD y caspasa-8, llevando a la pérdida de axones y la muerte celular en neuronas motoras de la médula espinal. DHA también podría ingresar a los astrocitos, eventualmente afectando su actividad recicladora e induciendo su muerte.

15. CONCLUSIONES

1. En NE de rata *in vitro*, la presencia de altos niveles de DHA inducen la formación de neuritas más cortas y menos ramificadas, a través de un mecanismo dependiente de RIPK1 y la activación de caspasas.
2. En neuronas motoras humanas, diferenciadas desde hiPSCs *in vitro*, DHA induce la formación de varicosidades a través de un mecanismo dependiente de RIPK1, efecto que es incrementado en células que contienen una expansión en la repetición GGGGCC en el gen *C9ORF72*.
3. Durante la progresión de ALS, los astrocitos de la médula espinal adquieren un fenotipo reactivo e incrementan la expresión de SVCT2, sugiriendo una mayor capacidad para captar AA, pero también una disminución en la disponibilidad de AA extracelular para las neuronas. Por otro lado, SVCT2 es internalizado y agregado intracelularmente en MNs, incrementando su vulnerabilidad a especies oxidantes y DHA.
4. La inyección intracerebroventricular de DHA disminuye significativamente la función motora de animales SOD1 G93A; al mismo tiempo, también disminuye la expresión de SVCT2 en astrocitos, sugiriendo la pérdida de algunas características de gliosis reactiva o la pérdida de astrocitos.
5. Bajo circunstancias fisiopatológicas, hay una pérdida del acoplamiento neurona-astrocito que permite el reciclamiento de vitamina C, favoreciendo un

incremento en las concentraciones de DHA y llevando a la activación de mecanismos de muerte apoptóticos dependientes de RIPK1 y caspasa-3, llevando a la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal y a la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica.

16. REFERENCIAS

- Abo-Rady, M., Kalmbach, N., Pal, A., Schludi, C., Janosch, A., Richter, T., Freitag, P., Bickle, M., Kahlert, A. K., Petri, S., Stefanov, S., Glass, H., Staeger, S., Just, W., Bhatnagar, R., Edbauer, D., Hermann, A., Wegner, F., y Sternecker, J. L. (2020). 'Knocking out C9ORF72 Exacerbates Axonal Trafficking Defects Associated with Hexanucleotide Repeat Expansion and Reduces Levels of Heat Shock Proteins', *Stem Cell Reports*, 14: 390-405.
- Abujarour, R., Valamehr, B., Robinson, M., Rezner, B., Vranceanu, F., y Flynn, P. (2013). 'Optimized surface markers for the prospective isolation of high-quality hiPSCs using flow cytometry selection', *Sci Rep*, 3: 1179.
- Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Smith, B., Maekawa, S., Bodi, I., Rogelj, B., Al-Chalabi, A., Hortobagyi, T., y Shaw, C. E. (2011). 'p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS', *Acta Neuropathol*, 122: 691-702.
- Almer, G., Vukosavic, S., Romero, N., y Przedborski, S. (1999). 'Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurochem*, 72: 2415-25.
- Amin, P., Florez, M., Najafov, A., Pan, H., Geng, J., Ofengeim, D., Dziedzic, S. A., Wang, H., Barrett, V. J., Ito, Y., LaVoie, M. J., y Yuan, J. (2018). 'Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNFalpha-mediated apoptosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E5944-E53.
- Angelova, P. R., y Abramov, A. Y. (2018). 'Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration', *FEBS Lett*, 592: 692-702.
- Annibaldi, A., Wicky John, S., Vanden Berghe, T., Swatek, K. N., Ruan, J., Liccardi, G., Bianchi, K., Elliott, P. R., Choi, S. M., Van Coillie, S., Bertin, J., Wu, H., Komander, D., Vandenabeele, P., Silke, J., y Meier, P. (2018). 'Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2', *Mol Cell*, 69: 566-80 e5.

- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., y Oda, T. (2006). 'TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Biochem Biophys Res Commun*, 351: 602-11.
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T. M., y Sockanathan, S. (1999). 'Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity', *Neuron*, 23: 659-74.
- Arrazola, M. S., Saquel, C., Catalan, R. J., Barrientos, S. A., Hernandez, D. E., Martinez, N. W., Catenaccio, A., y Court, F. A. (2019). 'Axonal Degeneration Is Mediated by Necroptosis Activation', *J Neurosci*, 39: 3832-44.
- Arredondo, C., Cefaliello, C., Dyrda, A., Jury, N., Martinez, P., Diaz, I., Amaro, A., Tran, H., Morales, D., Pertusa, M., Stoica, L., Fritz, E., Corvalan, D., Abarzua, S., Mendez-Ruette, M., Fernandez, P., Rojas, F., Kumar, M. S., Aguilar, R., Almeida, S., Weiss, A., Bustos, F. J., Gonzalez-Nilo, F., Otero, C., Tevy, M. F., Bosco, D. A., Saez, J. C., Kahne, T., Gao, F. B., Berry, J. D., Nicholson, K., Sena-Esteves, M., Madrid, R., Varela, D., Montecino, M., Brown, R. H., y van Zundert, B. (2022). 'Excessive release of inorganic polyphosphate by ALS/FTD astrocytes causes non-cell-autonomous toxicity to motoneurons', *Neuron*, 110: 1656-70 e12.
- Ash, P. E., Bieniek, K. F., Gendron, T. F., Caulfield, T., Lin, W. L., Dejesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M. M., Jansen-West, K., Paul, J. W., 3rd, Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., y Petrucelli, L. (2013). 'Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS', *Neuron*, 77: 639-46.
- Astuya, A., Caprile, T., Castro, M., Salazar, K., Garcia Mde, L., Reinicke, K., Rodriguez, F., Vera, J. C., Millan, C., Ulloa, V., Low, M., Martinez, F., y Nualart, F. (2005). 'Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system', *J Neurosci Res*, 79: 146-56.
- Balendra, R., y Isaacs, A. M. (2018). 'C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease', *Nat Rev Neurol*, 14: 544-58.

- Barron, C. C., Bilan, P. J., Tsakiridis, T., y Tsiani, E. (2016). 'Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment', *Metabolism*, 65: 124-39.
- Beirowski, B., Nogradi, A., Babetto, E., Garcia-Alias, G., y Coleman, M. P. (2010). 'Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration', *J Neuropathol Exp Neurol*, 69: 455-72.
- Benoit, E., y Escande, D. (1991). 'Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre', *Pflugers Arch*, 419: 603-9.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., y Meininger, V. (1994). 'A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group', *N Engl J Med*, 330: 585-91.
- Berdynski, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., Zekanowski, C., y Kuzma-Kozakiewicz, M. (2022). 'SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity', *Sci Rep*, 12: 103.
- Berger, U. V., Lu, X. C., Liu, W., Tang, Z., Slusher, B. S., y Hediger, M. A. (2003). 'Effect of middle cerebral artery occlusion on mRNA expression for the sodium-coupled vitamin C transporter SVCT2 in rat brain', *J Neurochem*, 86: 896-906.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S. J., Nishimura, A. L., Sullivan, G. J., Carrasco, M., Phatnani, H. P., Puddifoot, C. A., Story, D., Fletcher, J., Park, I. H., Friedman, B. A., Daley, G. Q., Wyllie, D. J., Hardingham, G. E., Wilmut, I., Finkbeiner, S., Maniatis, T., Shaw, C. E., y Chandran, S. (2012). 'Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 5803-8.
- Blazek, M., Santisteban, T. S., Zengerle, R., y Meier, M. (2015). 'Analysis of fast protein phosphorylation kinetics in single cells on a microfluidic chip', *Lab Chip*, 15: 726-34.
- Boillee, S., Vande Velde, C., y Cleveland, D. W. (2006). 'ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors', *Neuron*, 52: 39-59.

- Bondy, C. A., Lee, W. H., y Zhou, J. (1992). 'Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression', *Mol Cell Neurosci*, 3: 305-14.
- Bos, P. H., Lowry, E. R., Costa, J., Thams, S., Garcia-Diaz, A., Zask, A., Wichterle, H., y Stockwell, B. R. (2019). 'Development of MAP4 Kinase Inhibitors as Motor Neuron-Protecting Agents', *Cell Chem Biol*, 26: 1703-15 e37.
- Brown, R. H., y Al-Chalabi, A. (2017). 'Amyotrophic Lateral Sclerosis', *N Engl J Med*, 377: 162-72.
- Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., y Cleveland, D. W. (1997). 'ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions', *Neuron*, 18: 327-38.
- Bruijn, L. I., Houseweart, M. K., Kato, S., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Ohama, E., Reaume, A. G., Scott, R. W., y Cleveland, D. W. (1998). 'Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1', *Science*, 281: 1851-4.
- Calvo-Garrido, J., Winn, D., Maffezzini, C., Wedell, A., Freyer, C., Falk, A., y Wredenberg, A. (2021). 'Protocol for the derivation, culturing, and differentiation of human iPSC-cell-derived neuroepithelial stem cells to study neural differentiation in vitro', *STAR Protoc*, 2: 100528.
- Carcamo, J. M., Pedraza, A., Borquez-Ojeda, O., y Golde, D. W. (2002). 'Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation', *Biochemistry*, 41: 12995-3002.
- Carcamo, J. M., Pedraza, A., Borquez-Ojeda, O., Zhang, B., Sanchez, R., y Golde, D. W. (2004). 'Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I kappa B alpha kinase beta', *Mol Cell Biol*, 24: 6645-52.
- Carr, A. C., y Frei, B. (1999). 'Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans', *Am J Clin Nutr*, 69: 1086-107.

- Castro, M. A., Pozo, M., Cortes, C., Garcia Mde, L., Concha, II, y Nualart, F. (2007). 'Intracellular ascorbic acid inhibits transport of glucose by neurons, but not by astrocytes', *J Neurochem*, 102: 773-82.
- Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J. C., Vasquez, O., Aguayo, L. G., y Nualart, F. (2001). 'High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons', *J Neurochem*, 78: 815-23.
- Castro, T., Low, M., Salazar, K., Montecinos, H., Cifuentes, M., Yanez, A. J., Slebe, J. C., Figueroa, C. D., Reinicke, K., de los Angeles Garcia, M., Henriquez, J. P., y Nualart, F. (2008). 'Differential distribution of the Sodium-vitamin C cotransporter-1 along the proximal tubule of the mouse and human kidney', *Kidney Int*, 74: 1278-86.
- Cenigaonandia-Campillo, A., Serna-Blasco, R., Gomez-Ocabo, L., Solanes-Casado, S., Banos-Herraiz, N., Puerto-Nevado, L. D., Canas, J. A., Acenero, M. J., Garcia-Foncillas, J., y Aguilera, O. (2021). 'Vitamin C activates pyruvate dehydrogenase (PDH) targeting the mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle in hypoxic KRAS mutant colon cancer', *Theranostics*, 11: 3595-606.
- Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Martinez, F., Fernandez, E., Ferrada, L., Oyarce, K., Salazar, K., Bolanos, J. P., y Nualart, F. (2014). 'The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism', *J Neurochem*, 129: 663-71.
- Corpe, C. P., Eck, P., Wang, J., Al-Hasani, H., y Levine, M. (2013). 'Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8', *J Biol Chem*, 288: 9092-101.
- Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., Wang, S., Morton, C. C., McMahon, A. P., Powers, D., y Melton, D. A. (2004). 'Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts', *N Engl J Med*, 350: 1353-6.
- Croft, M., Benedict, C. A., y Ware, C. F. (2013). 'Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies', *Nat Rev Drug Discov*, 12: 147-68.

- Cuny, G. D., y Degterev, A. (2021). 'RIPK protein kinase family: Atypical lives of typical kinases', *Semin Cell Dev Biol*, 109: 96-105.
- Daruwala, R., Song, J., Koh, W. S., Rumsey, S. C., y Levine, M. (1999). 'Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2', *FEBS Lett*, 460: 480-4.
- Daskalopoulos, R., Korcok, J., Tao, L., y Wilson, J. X. (2002). 'Accumulation of intracellular ascorbate from dehydroascorbic acid by astrocytes is decreased after oxidative stress and restored by propofol', *Glia*, 39: 124-32.
- Davis-Dusenbery, B. N., Williams, L. A., Klim, J. R., y Eggan, K. (2014). 'How to make spinal motor neurons', *Development*, 141: 491-501.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S. M., Gerber, S. A., Lugovskoy, A., y Yuan, J. (2008). 'Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins', *Nat Chem Biol*, 4: 313-21.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., y Yuan, J. (2005). 'Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury', *Nat Chem Biol*, 1: 112-9.
- Degterev, A., Ofengeim, D., y Yuan, J. (2019). 'Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 9714-22.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., Feldman, H., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Miller, B. L., Dickson, D. W., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., y Rademakers, R. (2011). 'Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS', *Neuron*, 72: 245-56.

- Delanghe, T., Dondelinger, Y., y Bertrand, M. J. M. (2020). 'RIPK1 Kinase-Dependent Death: A Symphony of Phosphorylation Events', *Trends Cell Biol*, 30: 189-200.
- Delisle, M. B., y Carpenter, S. (1984). 'Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Sci*, 63: 241-50.
- Dermentzaki, G., Politi, K. A., Lu, L., Mishra, V., Perez-Torres, E. J., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., 2nd, Lotti, F., Shneider, N. A., y Przedborski, S. (2019). 'Deletion of Ripk3 Prevents Motor Neuron Death In Vitro but not In Vivo', *eNeuro*, 6.
- DeVos, S. L., y Miller, T. M. (2013). 'Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system', *J Vis Exp*: e50326.
- Di Giorgio, F. P., Boulting, G. L., Bobrowicz, S., y Eggan, K. C. (2008). 'Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation', *Cell Stem Cell*, 3: 637-48.
- Dillon, C. P., Weinlich, R., Rodriguez, D. A., Cripps, J. G., Quarato, G., Gurung, P., Verbist, K. C., Brewer, T. L., Llambi, F., Gong, Y. N., Janke, L. J., Kelliher, M. A., Kanneganti, T. D., y Green, D. R. (2014). 'RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3', *Cell*, 157: 1189-202.
- Dondelinger, Y., Aguilera, M. A., Goossens, V., Dubuisson, C., Grootjans, S., Dejardin, E., Vandenabeele, P., y Bertrand, M. J. (2013). 'RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition', *Cell Death Differ*, 20: 1381-92.
- Dondelinger, Y., Delanghe, T., Rojas-Rivera, D., Priem, D., Delvaeye, T., Bruggeman, I., Van Herreweghe, F., Vandenabeele, P., y Bertrand, M. J. M. (2017). 'MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death', *Nat Cell Biol*, 19: 1237-47.
- Dondelinger, Y., Jouan-Lanhouet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, P. J., Giansanti, P., Heck, A. J., Dejardin, E., Vandenabeele, P., y Bertrand, M. J. (2015). 'NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in

Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling', *Mol Cell*, 60: 63-76.

Donnelly, C. J., Zhang, P. W., Pham, J. T., Haeusler, A. R., Mistry, N. A., Vidensky, S., Daley, E. L., Poth, E. M., Hoover, B., Fines, D. M., Maragakis, N., Tienari, P. J., Petrucelli, L., Traynor, B. J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C. F., Blackshaw, S., Sattler, R., y Rothstein, J. D. (2013). 'RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention', *Neuron*, 80: 415-28.

Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhauser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., Deneen, B., De Strooper, B., Diaz-Castro, B., Farina, C., Freeman, M., Gallo, V., Goldman, J. E., Goldman, S. A., Gotz, M., Gutierrez, A., Haydon, P. G., Heiland, D. H., Hol, E. M., Holt, M. G., Iino, M., Kastanenka, K. V., Kettenmann, H., Khakh, B. S., Koizumi, S., Lee, C. J., Liddelow, S. A., MacVicar, B. A., Magistretti, P., Messing, A., Mishra, A., Molofsky, A. V., Murai, K. K., Norris, C. M., Okada, S., Oliet, S. H. R., Oliveira, J. F., Panatier, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Pellerin, L., Perea, G., Perez-Nievas, B. G., Pfrieger, F. W., Poskanzer, K. E., Quintana, F. J., Ransohoff, R. M., Riquelme-Perez, M., Robel, S., Rose, C. R., Rothstein, J. D., Rouach, N., Rowitch, D. H., Semyanov, A., Sirko, S., Sontheimer, H., Swanson, R. A., Vitorica, J., Wanner, I. B., Wood, L. B., Wu, J., Zheng, B., Zimmer, E. R., Zorec, R., Sofroniew, M. V., y Verkhratsky, A. (2021). 'Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions', *Nat Neurosci*, 24: 312-25.

Espinoza, F., Magdalena, R., Saldivia, N., Jara, N., Martinez, F., Ferrada, L., Salazar, K., Avila, F., y Nualart, F. (2020). 'Vitamin C Recycling Regulates Neurite Growth in Neurospheres Differentiated In Vitro', *Antioxidants (Basel)*, 9.

Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., Wiskow, O., Taylor, J., Trotter, M., Pollard, S., Smith, A., y Brustle, O. (2012). 'Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons', *PLoS One*, 7: e29597.

- Faravelli, I., Bucchia, M., Rinchetti, P., Nizzardo, M., Simone, C., Frattini, E., y Corti, S. (2014). 'Motor neuron derivation from human embryonic and induced pluripotent stem cells: experimental approaches and clinical perspectives', *Stem Cell Res Ther*, 5: 87.
- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., y Sobue, G. (2022). 'Amyotrophic lateral sclerosis', *Lancet*, 400: 1363-80.
- Ferrada, L., Barahona, M. J., Salazar, K., Vandenabeele, P., y Nualart, F. (2020). 'Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress', *Redox Biol*, 29: 101408.
- Ferrada, L., Barahona, M. J., Vera, M., Stockwell, B. R., y Nualart, F. (2023). 'Dehydroascorbic acid sensitizes cancer cells to system x(c)(-) inhibition-induced ferroptosis by promoting lipid droplet peroxidation', *Cell Death Dis*, 14: 637.
- Ferrada, L., Magdalena, R., Barahona, M. J., Ramirez, E., Sanzana, C., Gutierrez, J., y Nualart, F. (2021). 'Two Distinct Faces of Vitamin C: AA vs. DHA', *Antioxidants (Basel)*, 10.
- Fischer-Hayes, L. R., Brotherton, T., y Glass, J. D. (2013). 'Axonal degeneration in the peripheral nervous system: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis', *Exp Neurol*, 246: 6-13.
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., y Glass, J. D. (2004). 'Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man', *Exp Neurol*, 185: 232-40.
- Fitzgerald, K. C., O'Reilly, E. J., Fondell, E., Falcone, G. J., McCullough, M. L., Park, Y., Kolonel, L. N., y Ascherio, A. (2013). 'Intakes of vitamin C and carotenoids and risk of amyotrophic lateral sclerosis: pooled results from 5 cohort studies', *Ann Neurol*, 73: 236-45.
- Forman, K., Martinez, F., Cifuentes, M., Fernandez, M., Bertinat, R., Torres, P., Salazar, K., Godoy, A., y Nualart, F. (2020). 'Dehydroascorbic acid, the

oxidized form of vitamin C, improves renal histology and function in old mice', *J Cell Physiol*, 235: 9773-84.

Garcia-Krauss, A., Ferrada, L., Astuya, A., Salazar, K., Cisternas, P., Martinez, F., Ramirez, E., y Nualart, F. (2016). 'Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes', *Mol Neurobiol*, 53: 5847-63.

Garcia Mde, L., Salazar, K., Millan, C., Rodriguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., Vera, J. C., Aguayo, L. G., Olate, J., Molina, B., y Nualart, F. (2005). 'Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells', *Glia*, 50: 32-47.

Geng, J., Ito, Y., Shi, L., Amin, P., Chu, J., Ouchida, A. T., Mookhtiar, A. K., Zhao, H., Xu, D., Shan, B., Najafov, A., Gao, G., Akira, S., y Yuan, J. (2017). 'Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis', *Nat Commun*, 8: 359.

Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuniga, F. A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., Guzman, C., Villagran, M., Aguayo, L. G., Onate, S. A., Reyes, A. M., Carcamo, J. G., Rivas, C. I., y Vera, J. C. (2007). 'Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations', *J Biol Chem*, 282: 615-24.

Gomez-Deza, J., Lee, Y. B., Troakes, C., Nolan, M., Al-Sarraj, S., Gallo, J. M., y Shaw, C. E. (2015). 'Dipeptide repeat protein inclusions are rare in the spinal cord and almost absent from motor neurons in C9ORF72 mutant amyotrophic lateral sclerosis and are unlikely to cause their degeneration', *Acta Neuropathol Commun*, 3: 38.

Guo, Y., Duan, W., Li, Z., Huang, J., Yin, Y., Zhang, K., Wang, Q., Zhang, Z., y Li, C. (2010). 'Decreased GLT-1 and increased SOD1 and HO-1 expression in astrocytes contribute to lumbar spinal cord vulnerability of SOD1-G93A transgenic mice', *FEBS Lett*, 584: 1615-22.

Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliando, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., y et al. (1994).

'Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation', *Science*, 264: 1772-5.

Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Adler, D. I., Couthouis, J., Liddelw, S. A., Gitler, A. D., y Barres, B. A. (2020). 'Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model', *Nat Commun*, 11: 3753.

Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M. J., Foust, K. D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J. R., Burghes, A. H., y Kaspar, B. K. (2011). 'Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons', *Nat Biotechnol*, 29: 824-8.

Harrison, F. E., y May, J. M. (2009). 'Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2', *Free Radic Biol Med*, 46: 719-30.

Hatzipetros, T., Kidd, J. D., Moreno, A. J., Thompson, K., Gill, A., y Vieira, F. G. (2015). 'A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS', *J Vis Exp*.

Heger, K., y Dixit, V. M. (2018). 'TBK1 and IKKepsilon restrain cell death', *Nat Cell Biol*, 20: 1330-31.

Henriques, A., Pitzer, C., y Schneider, A. (2010). 'Characterization of a novel SOD-1(G93A) transgenic mouse line with very decelerated disease development', *PLoS One*, 5: e15445.

Hernandez, D. E., Salvadores, N. A., Moya-Alvarado, G., Catalan, R. J., Bronfman, F. C., y Court, F. A. (2018). 'Axonal degeneration induced by glutamate excitotoxicity is mediated by necroptosis', *J Cell Sci*, 131.

Ho, R., Sances, S., Gowing, G., Amoroso, M. W., O'Rourke, J. G., Sahabian, A., Wichterle, H., Baloh, R. H., Sareen, D., y Svendsen, C. N. (2016). 'ALS disrupts spinal motor neuron maturation and aging pathways within gene co-expression networks', *Nat Neurosci*, 19: 1256-67.

- Ho, R., Workman, M. J., Mathkar, P., Wu, K., Kim, K. J., O'Rourke, J. G., Kellogg, M., Montel, V., Banuelos, M. G., Arogundade, O. A., Diaz-Garcia, S., Oheb, D., Huang, S., Khrebtukova, I., Watson, L., Ravits, J., Taylor, K., Baloh, R. H., y Svendsen, C. N. (2021). 'Cross-Comparison of Human iPSC Motor Neuron Models of Familial and Sporadic ALS Reveals Early and Convergent Transcriptomic Disease Signatures', *Cell Syst*, 12: 159-75 e9.
- Ito, Y., Ofengeim, D., Najafov, A., Das, S., Saberi, S., Li, Y., Hitomi, J., Zhu, H., Chen, H., Mayo, L., Geng, J., Amin, P., DeWitt, J. P., Mookhtiar, A. K., Florez, M., Ouchida, A. T., Fan, J. B., Pasparakis, M., Kelliher, M. A., Ravits, J., y Yuan, J. (2016). 'RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS', *Science*, 353: 603-8.
- Jaco, I., Annibaldi, A., Lalaoui, N., Wilson, R., Tenev, T., Laurien, L., Kim, C., Jamal, K., Wicky John, S., Liccardi, G., Chau, D., Murphy, J. M., Brumatti, G., Feltham, R., Pasparakis, M., Silke, J., y Meier, P. (2017). 'MK2 Phosphorylates RIPK1 to Prevent TNF-Induced Cell Death', *Mol Cell*, 66: 698-710 e5.
- Jaiswal, M. K. (2019). 'Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs', *Med Res Rev*, 39: 733-48.
- Jensen, J. B., y Parmar, M. (2006). 'Strengths and limitations of the neurosphere culture system', *Mol Neurobiol*, 34: 153-61.
- Jiang, Y. M., Yamamoto, M., Kobayashi, Y., Yoshihara, T., Liang, Y., Terao, S., Takeuchi, H., Ishigaki, S., Katsuno, M., Adachi, H., Niwa, J., Tanaka, F., Doyu, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., y Sobue, G. (2005). 'Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Ann Neurol*, 57: 236-51.
- Kc, S., Carcamo, J. M., y Golde, D. W. (2005). 'Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury', *FASEB J*, 19: 1657-67.
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., y Leder, P. (1998). 'The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal', *Immunity*, 8: 297-303.

- Kilinc, D., Gallo, G., y Barbee, K. A. (2008). 'Mechanically-induced membrane poration causes axonal beading and localized cytoskeletal damage', *Exp Neurol*, 212: 422-30.
- Korcok, J., Dixon, S. J., Lo, T. C., y Wilson, J. X. (2003). 'Differential effects of glucose on dehydroascorbic acid transport and intracellular ascorbate accumulation in astrocytes and skeletal myocytes', *Brain Res*, 993: 201-7.
- Lafont, E., Draber, P., Rieser, E., Reichert, M., Kupka, S., de Miguel, D., Draberova, H., von Massenhausen, A., Bhamra, A., Henderson, S., Wojdyla, K., Chalk, A., Surinova, S., Linkermann, A., y Walczak, H. (2018). 'TBK1 and IKKepsilon prevent TNF-induced cell death by RIPK1 phosphorylation', *Nat Cell Biol*, 20: 1389-99.
- Lai, J. D., y Ichida, J. K. (2019). 'C9ORF72 protein function and immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis', *Neurosci Lett*, 713: 134523.
- Lalaoui, N., Boyden, S. E., Oda, H., Wood, G. M., Stone, D. L., Chau, D., Liu, L., Stoffels, M., Kratina, T., Lawlor, K. E., Zaal, K. J. M., Hoffmann, P. M., Etemadi, N., Shield-Artin, K., Biben, C., Tsai, W. L., Blake, M. D., Kuehn, H. S., Yang, D., Anderton, H., Silke, N., Wachsmuth, L., Zheng, L., Moura, N. S., Beck, D. B., Gutierrez-Cruz, G., Ombrello, A. K., Pinto-Patarroyo, G. P., Kueh, A. J., Herold, M. J., Hall, C., Wang, H., Chae, J. J., Dmitrieva, N. I., McKenzie, M., Light, A., Barham, B. K., Jones, A., Romeo, T. M., Zhou, Q., Aksentijevich, I., Mullikin, J. C., Gross, A. J., Shum, A. K., Hawkins, E. D., Masters, S. L., Lenardo, M. J., Boehm, M., Rosenzweig, S. D., Pasparakis, M., Voss, A. K., Gadina, M., Kastner, D. L., y Silke, J. (2020). 'Mutations that prevent caspase cleavage of RIPK1 cause autoinflammatory disease', *Nature*, 577: 103-08.
- Laurien, L., Nagata, M., Schunke, H., Delanghe, T., Wiederstein, J. L., Kumari, S., Schwarzer, R., Corona, T., Kruger, M., Bertrand, M. J. M., Kondylis, V., y Pasparakis, M. (2020). 'Autophosphorylation at serine 166 regulates RIP kinase 1-mediated cell death and inflammation', *Nat Commun*, 11: 1747.
- Lawrence, J. M., Schardien, K., Wigdahl, B., y Nonnemacher, M. R. (2023). 'Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review', *Acta Neuropathol Commun*, 11: 42.

- Lee, K. H., Yu, D. H., y Lee, Y. S. (2009). 'Gene expression profiling of rat cerebral cortex development using cDNA microarrays', *Neurochem Res*, 34: 1030-8.
- Lee, Y. C., Huang, H. Y., Chang, C. J., Cheng, C. H., y Chen, Y. T. (2010). 'Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome', *Hum Mol Genet*, 19: 3721-33.
- Leigh, P. N., Anderton, B. H., Dodson, A., Gallo, J. M., Swash, M., y Power, D. M. (1988). 'Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease', *Neurosci Lett*, 93: 197-203.
- Li, C. J., Sun, L. Y., y Pang, C. Y. (2015). 'Synergistic protection of N-acetylcysteine and ascorbic acid 2-phosphate on human mesenchymal stem cells against mitoptosis, necroptosis and apoptosis', *Sci Rep*, 5: 9819.
- Li, M., Ona, V. O., Guegan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L. J., Olszewski, A. J., Stieg, P. E., Lee, J. P., Przedborski, S., y Friedlander, R. M. (2000). 'Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model', *Science*, 288: 335-9.
- Li, W., y Yuan, J. (2023). 'Targeting RIPK1 kinase for modulating inflammation in human diseases', *Front Immunol*, 14: 1159743.
- Li, X., Cobb, C. E., y May, J. M. (2002). 'Mitochondrial recycling of ascorbic acid from dehydroascorbic acid: dependence on the electron transport chain', *Arch Biochem Biophys*, 403: 103-10.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Munch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., y Barres, B. A. (2017). 'Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia', *Nature*, 541: 481-87.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., y Liu, Z. G. (1999). 'Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis', *Genes Dev*, 13: 2514-26.

- Liu, B., Li, M., Zhang, L., Chen, Z., y Lu, P. (2022). 'Motor neuron replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis', *Neural Regen Res*, 17: 1633-39.
- Liu, X., Zhang, Z., Guo, W., Burnstock, G., He, C., y Xiang, Z. (2013). 'The superficial glia limitans of mouse and monkey brain and spinal cord', *Anat Rec (Hoboken)*, 296: 995-1007.
- Liuzzi, F. J., y Miller, R. H. (1987). 'Radially oriented astrocytes in the normal adult rat spinal cord', *Brain Res*, 403: 385-8.
- Lopez, M. E. (2012). 'A Quick, No Frills Approach to Mouse Genotyping', *Bio Protoc*, 2.
- Lowe, J., Lennox, G., Jefferson, D., Morrell, K., McQuire, D., Gray, T., Landon, M., Doherty, F. J., y Mayer, R. J. (1988). 'A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin', *Neurosci Lett*, 94: 203-10.
- Maher, F., Davies-Hill, T. M., Lysko, P. G., Henneberry, R. C., y Simpson, I. A. (1991). 'Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3', *Mol Cell Neurosci*, 2: 351-60.
- Martin, D., Thompson, M. A., y Nadler, J. V. (1993). 'The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1', *Eur J Pharmacol*, 250: 473-6.
- Martin, L. J. (1999). 'Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism', *J Neuropathol Exp Neurol*, 58: 459-71.
- Masrori, P., y Van Damme, P. (2020). 'Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review', *Eur J Neurol*, 27: 1918-29.
- Maurer, M. H., Geomor, H. K., Burgers, H. F., Schelshorn, D. W., y Kuschinsky, W. (2006). 'Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression', *FEBS Lett*, 580: 4430-4.

- Maury, Y., Come, J., Piskorowski, R. A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., y Nedelec, S. (2015). 'Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes', *Nat Biotechnol*, 33: 89-96.
- May, J. M., Li, L., Qu, Z. C., y Cobb, C. E. (2007). 'Mitochondrial recycling of ascorbic acid as a mechanism for regenerating cellular ascorbate', *Biofactors*, 30: 35-48.
- Mifflin, L., Ofengeim, D., y Yuan, J. (2020). 'Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target', *Nat Rev Drug Discov*, 19: 553-71.
- Migheli, A., Atzori, C., Piva, R., Tortarolo, M., Girelli, M., Schiffer, D., y Bendotti, C. (1999). 'Lack of apoptosis in mice with ALS', *Nat Med*, 5: 966-7.
- Miller, S. J. (2018). 'Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System', *Front Cell Neurosci*, 12: 401.
- Miyata, H., Toyoda, Y., Takada, T., Hiragi, T., Kubota, Y., Shigesawa, R., Koyama, R., Ikegaya, Y., y Suzuki, H. (2022). 'Identification of an exporter that regulates vitamin C supply from blood to the brain', *iScience*, 25: 103642.
- Mizoule, J., Meldrum, B., Mazadier, M., Croucher, M., Ollat, C., Uzan, A., Legrand, J. J., Gueremy, C., y Le Fur, G. (1985). '2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission--I. Anticonvulsant properties', *Neuropharmacology*, 24: 767-73.
- Mori, K., Arzberger, T., Grasser, F. A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S. M., Schludi, M. H., van der Zee, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Kremmer, E., Kretschmar, H. A., Haass, C., y Edbauer, D. (2013). 'Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins', *Acta Neuropathol*, 126: 881-93.
- Mori, K., Weng, S. M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretschmar, H. A., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Haass, C., y

- Edbauer, D. (2013). 'The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS', *Science*, 339: 1335-8.
- Mun, G. H., Kim, M. J., Lee, J. H., Kim, H. J., Chung, Y. H., Chung, Y. B., Kang, J. S., Hwang, Y. I., Oh, S. H., Kim, J. G., Hwang, D. H., Shin, D. H., y Lee, W. J. (2006). 'Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain', *J Neurosci Res*, 83: 919-28.
- Murphy, M. P. (2009). 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochem J*, 417: 1-13.
- Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Ayaki, T., Takahashi, H., Takeda, H., Ishitani, R., Kamei, K., Takeyoshi, I., Kawakami, H., Iwai, K., Hatada, I., Sawasaki, T., Ito, H., Nureki, O., y Tokunaga, F. (2016). 'Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis', *Nat Commun*, 7: 12547.
- Nemeth, C. E., Marcolongo, P., Gamberucci, A., Fulceri, R., Benedetti, A., Zoppi, N., Ritelli, M., Chiarelli, N., Colombi, M., Willaert, A., Callewaert, B. L., Coucke, P. J., Grof, P., Nagy, S. K., Meszaros, T., Banhegyi, G., y Margittai, E. (2016). 'Glucose transporter type 10-lacking in arterial tortuosity syndrome-facilitates dehydroascorbic acid transport', *FEBS Lett*, 590: 1630-40.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., y Lee, V. M. (2006). 'Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Science*, 314: 130-3.
- Newton, K., Wickliffe, K. E., Dugger, D. L., Maltzman, A., Roose-Girma, M., Dohse, M., Komuves, L., Webster, J. D., y Dixit, V. M. (2019). 'Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis', *Nature*, 574: 428-31.

- Nishikimi, M., y Yagi, K. (1991). 'Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis', *Am J Clin Nutr*, 54: 1203S-08S.
- Nualart, F., Castro, T., Low, M., Henriquez, J. P., Oyarce, K., Cisternas, P., Garcia, A., Yanez, A. J., Bertinat, R., Montecinos, V. P., y Garcia-Robles, M. A. (2013). 'Dynamic expression of the sodium-vitamin C co-transporters, SVCT1 and SVCT2, during perinatal kidney development', *Histochem Cell Biol*, 139: 233-47.
- Nualart, F., Godoy, A., y Reinicke, K. (1999). 'Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain', *Brain Res*, 824: 97-104.
- Nualart, F. J., Rivas, C. I., Montecinos, V. P., Godoy, A. S., Guaiquil, V. H., Golde, D. W., y Vera, J. C. (2003). 'Recycling of vitamin C by a bystander effect', *J Biol Chem*, 278: 10128-33.
- Nualart, F., Mack, L., Garcia, A., Cisternas, P., Bongarzone, E. R., Heitzer, M., Jara, N., Martinez, F., Ferrada, L., Espinoza, F., Baeza, V., y Salazar, K. (2014). 'Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts', *J Stem Cell Res Ther*, 4: 209.
- Nualart, F., Salazar, K., Oyarce, K., Cisternas, P., Jara, N., Silva-Alvarez, C., Pastor, P., Martinez, F., Garcia, A., Garcia-Robles Mde, L., y Tapia, J. C. (2012). 'Typical and atypical stem cells in the brain, vitamin C effect and neuropathology', *Biol Res*, 45: 243-56.
- Ofengeim, D., y Yuan, J. (2013). 'Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 727-36.
- Okamoto, K., Hirai, S., Shoji, M., Senoh, Y., y Yamazaki, T. (1990). 'Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis', *Acta Neuropathol*, 80: 222-6.
- Onate, M., Catenaccio, A., Salvadores, N., Saquel, C., Martinez, A., Moreno-Gonzalez, I., Gamez, N., Soto, P., Soto, C., Hetz, C., y Court, F. A. (2020).

'The necroptosis machinery mediates axonal degeneration in a model of Parkinson disease', *Cell Death Differ*, 27: 1169-85.

Oyarce, K., Silva-Alvarez, C., Ferrada, L., Martinez, F., Salazar, K., y Nualart, F. (2018). 'SVCT2 Is Expressed by Cerebellar Precursor Cells, Which Differentiate into Neurons in Response to Ascorbic Acid', *Mol Neurobiol*, 55: 1136-49.

Padayatty, S. J., y Levine, M. (2016). 'Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks', *Oral Dis*, 22: 463-93.

Pal, A., Kretner, B., Abo-Rady, M., Glabeta, H., Dash, B. P., Naumann, M., Japtok, J., Kreiter, N., Dhingra, A., Heutink, P., Bockers, T. M., Gunther, R., Sternecker, J., y Hermann, A. (2021). 'Concomitant gain and loss of function pathomechanisms in C9ORF72 amyotrophic lateral sclerosis', *Life Sci Alliance*, 4.

Pastor, P., Cisternas, P., Salazar, K., Silva-Alvarez, C., Oyarce, K., Jara, N., Espinoza, F., Martinez, A. D., y Nualart, F. (2013). 'SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche', *Front Cell Neurosci*, 7: 119.

Patani, R., Hardingham, G. E., y Liddel, S. A. (2023). 'Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration', *Nat Rev Neurol*, 19: 395-409.

Pati, S., Singh Gautam, A., Dey, M., Tiwari, A., y Kumar Singh, R. (2023). 'Molecular and functional characteristics of receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) and its therapeutic potential in Alzheimer's disease', *Drug Discov Today*, 28: 103750.

Perez-Gonzalez, A., y Galano, A. (2011). 'OH radical scavenging activity of Edaravone: mechanism and kinetics', *J Phys Chem B*, 115: 1306-14.

Phatnani, H., y Maniatis, T. (2015). 'Astrocytes in neurodegenerative disease', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.

- Polykratis, A., Hermance, N., Zelic, M., Roderick, J., Kim, C., Van, T. M., Lee, T. H., Chan, F. K. M., Pasparakis, M., y Kelliher, M. A. (2014). 'Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo', *J Immunol*, 193: 1539-43.
- Portugal, C. C., da Encarnacao, T. G., Socodato, R., Moreira, S. R., Brudzewsky, D., Ambrosio, A. F., y Paes-de-Carvalho, R. (2012). 'Nitric oxide modulates sodium vitamin C transporter 2 (SVCT-2) protein expression via protein kinase G (PKG) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)', *J Biol Chem*, 287: 3860-72.
- Portugal, C. C., Socodato, R., Canedo, T., Silva, C. M., Martins, T., Coreixas, V. S., Loiola, E. C., Gess, B., Rohr, D., Santiago, A. R., Young, P., Minshall, R. D., Paes-de-Carvalho, R., Ambrosio, A. F., y Relvas, J. B. (2017). 'Caveolin-1-mediated internalization of the vitamin C transporter SVCT2 in microglia triggers an inflammatory phenotype', *Sci Signal*, 10.
- Rabilloud, T., Heller, M., Rigobello, M. P., Bindoli, A., Aebersold, R., y Lunardi, J. (2001). 'The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress', *Proteomics*, 1: 1105-10.
- Raff, M. C., Whitmore, A. V., y Finn, J. T. (2002). 'Axonal self-destruction and neurodegeneration', *Science*, 296: 868-71.
- Ragagnin, A. M. G., Shadfar, S., Vidal, M., Jamali, M. S., y Atkin, J. D. (2019). 'Motor Neuron Susceptibility in ALS/FTD', *Front Neurosci*, 13: 532.
- Ravits, J. M., y La Spada, A. R. (2009). 'ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration', *Neurology*, 73: 805-11.
- Re, D. B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M. W., Politi, K. A., Phani, S., Ikiz, B., Hoffmann, L., Koolen, M., Nagata, T., Papadimitriou, D., Nagy, P., Mitsumoto, H., Kariya, S., Wichterle, H., Henderson, C. E., y Przedborski, S. (2014). 'Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS', *Neuron*, 81: 1001-08.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L.,

Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R. J., Orrell, R. W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I. E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J. B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M. A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V. M., Kaivorinne, A. L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Consortium, Italsgen, Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J. D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E. E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N. M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H. R., Tienari, P. J., y Traynor, B. J. (2011). 'A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD', *Neuron*, 72: 257-68.

Rice, M. E. (2000). 'Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain', *Trends Neurosci*, 23: 209-16.

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., y et al. (1993). 'Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nature*, 362: 59-62.

Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D. E., y Volterra, A. (2008). 'Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis', *Cell Death Differ*, 15: 1691-700.

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

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

Salazar, K., Cerda, G., Martinez, F., Sarmiento, J. M., Gonzalez, C., Rodriguez, F., Garcia-Robles, M., Tapia, J. C., Cifuentes, M., y Nualart, F. (2014). 'SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons

and its function is regulated by its short isoform', *J Neurochem*, 130: 693-706.

Salazar, K., Espinoza, F., Cerda-Gallardo, G., Ferrada, L., Magdalena, R., Ramirez, E., Ulloa, V., Saldivia, N., Troncoso, N., Oviedo, M. J., Barahona, M. J., Martinez, F., y Nualart, F. (2021). 'SVCT2 Overexpression and Ascorbic Acid Uptake Increase Cortical Neuron Differentiation, Which Is Dependent on Vitamin C Recycling between Neurons and Astrocytes', *Antioxidants (Basel)*, 10.

Salazar, K., Jara, N., Ramirez, E., de Lima, I., Smith-Ghigliotto, J., Munoz, V., Ferrada, L., y Nualart, F. (2023). 'Role of vitamin C and SVCT2 in neurogenesis', *Front Neurosci*, 17: 1155758.

Salazar, K., Martinez, F., Perez-Martin, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., Espinoza, F., Saldivia, N., Bertinat, R., Forman, K., Oviedo, M. J., Lopez-Gambero, A. J., Bonansco, C., Bongarzone, E. R., y Nualart, F. (2018). 'SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies', *Mol Neurobiol*, 55: 5439-52.

Sarosiek, K. A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P. D., Chang, W., McBrayer, S. K., Cantlon, A., Fisch, S., Golomb-Mello, G., Ryan, J. A., Deng, J., Jian, B., Corbett, C., Goldenberg, M., Madsen, J. R., Liao, R., Walsh, D., Sedivy, J., Murphy, D. J., Carrasco, D. R., Robinson, S., Moslehi, J., y Letai, A. (2017). 'Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics', *Cancer Cell*, 31: 142-56.

Sasaki, S., Kamei, H., Yamane, K., y Maruyama, S. (1988). 'Swelling of neuronal processes in motor neuron disease', *Neurology*, 38: 1114-8.

Sasaki, S., Shibata, N., Komori, T., y Iwata, M. (2000). 'iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis', *Neurosci Lett*, 291: 44-8.

Savini, I., Rossi, A., Catani, M. V., Ceci, R., y Avigliano, L. (2007). 'Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes', *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 385-90.

- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., y Catani, M. V. (2008). 'SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake', *Amino Acids*, 34: 347-55.
- Sawai, H. (2014). 'Characterization of TNF-induced caspase-independent necroptosis', *Leuk Res*, 38: 706-13.
- Sbodio, J. I., Snyder, S. H., y Paul, B. D. (2019). 'Redox Mechanisms in Neurodegeneration: From Disease Outcomes to Therapeutic Opportunities', *Antioxid Redox Signal*, 30: 1450-99.
- Scheffler, J., Bork, K., Bezold, V., Rosenstock, P., Gnanapragassam, V. S., y Horstkorte, R. (2019). 'Ascorbic acid leads to glycation and interferes with neurite outgrowth', *Exp Gerontol*, 117: 25-30.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., y Migheli, A. (1996). 'Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Sci*, 139 Suppl: 27-33.
- Sellier, C., Campanari, M. L., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E., y Charlet-Berguerand, N. (2016). 'Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death', *EMBO J*, 35: 1276-97.
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K. A., Li, Y., Chang, W. H., Hung, S. T., Hendricks, E., Linares, G. R., Wang, Y., Son, E. Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M. J., Ge, B., Koutsodendris, N., Sandor, K. P., Komberg, J., Vangoor, V. R., Senthilkumar, K., Hennes, V., Seah, C., Nelson, A. R., Cheng, T. Y., Lee, S. J., August, P. R., Chen, J. A., Wisniewski, N., Hanson-Smith, V., Belgard, T. G., Zhang, A., Coba, M., Grunseich, C., Ward, M. E., van den Berg, L. H., Pasterkamp, R. J., Trotti, D., Zlokovic, B. V., y Ichida, J. K. (2018). 'Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons', *Nat Med*, 24: 313-25.
- Sofroniew, M. V., y Vinters, H. V. (2010). 'Astrocytes: biology and pathology', *Acta Neuropathol*, 119: 7-35.

- Song, J. H., Shin, S. H., y Ross, G. M. (2001). 'Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system', *Brain Res*, 895: 66-72.
- Spector, R. (2016). 'Dehydroascorbic acid for the treatment of acute ischemic stroke', *Med Hypotheses*, 89: 32-6.
- Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., y Seed, B. (1995). 'RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death', *Cell*, 81: 513-23.
- Subramanian, V. S., Marchant, J. S., y Said, H. M. (2010). 'Molecular determinants dictating cell surface expression of the human sodium-dependent vitamin C transporter-2 in human liver cells', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298: G267-74.
- Sugimoto, K., Liu, J., Li, M., Song, Y., Zhang, C., Zhai, Z., y Gao, Y. (2021). 'Neuroprotective Effects of Shenqi Fuzheng Injection in a Transgenic SOD1-G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Front Pharmacol*, 12: 701886.
- Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J. B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., Declercq, W., Callewaert, N., Prendergast, G. C., Degterev, A., Yuan, J., y Vandenameele, P. (2012). 'Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models', *Cell Death Dis*, 3: e437.
- Tang, Y., Tu, H., Zhang, J., Zhao, X., Wang, Y., Qin, J., y Lin, X. (2019). 'K63-linked ubiquitination regulates RIPK1 kinase activity to prevent cell death during embryogenesis and inflammation', *Nat Commun*, 10: 4157.
- Taylor, J. P., Brown, R. H., Jr., y Cleveland, D. W. (2016). 'Decoding ALS: from genes to mechanism', *Nature*, 539: 197-206.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., y Martin, S. J. (2008). 'Apoptosis: controlled demolition at the cellular level', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 231-41.

- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F., y Hediger, M. A. (1999). 'A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters', *Nature*, 399: 70-5.
- Ulloa, V., Garcia-Robles, M., Martinez, F., Salazar, K., Reinicke, K., Perez, F., Godoy, D. F., Godoy, A. S., y Nualart, F. (2013). 'Human choroid plexus papilloma cells efficiently transport glucose and vitamin C', *J Neurochem*, 127: 403-14.
- Ulloa, V., Saldivia, N., Ferrada, L., Salazar, K., Martinez, F., Silva-Alvarez, C., Magdalena, R., Oviedo, M. J., Montecinos, H., Torres-Vergara, P., Cifuentes, M., y Nualart, F. (2019). 'Basal Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions', *Sci Rep*, 9: 14422.
- van Blitterswijk, M., Gendron, T. F., Baker, M. C., DeJesus-Hernandez, M., Finch, N. A., Brown, P. H., Daugherty, L. M., Murray, M. E., Heckman, M. G., Jiang, J., Lagier-Tourenne, C., Edbauer, D., Cleveland, D. W., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Petrucelli, L., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., y Rademakers, R. (2015). 'Novel clinical associations with specific C9ORF72 transcripts in patients with repeat expansions in C9ORF72', *Acta Neuropathol*, 130: 863-76.
- Vandenabeele, P., Grootjans, S., Callewaert, N., y Takahashi, N. (2013). 'Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models', *Cell Death Differ*, 20: 185-7.
- Vannucci, S. J. (1994). 'Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain', *J Neurochem*, 62: 240-6.
- Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischbarg, J., y Golde, D. W. (1993). 'Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid', *Nature*, 364: 79-82.
- Wang, M., He, J., Li, S., Cai, Q., Zhang, K., y She, J. (2023). 'Structural basis of vitamin C recognition and transport by mammalian SVCT1 transporter', *Nat Commun*, 14: 1361.

- Wang, M., Liu, Z., Sun, W., Yuan, Y., Jiao, B., Zhang, X., Shen, L., Jiang, H., Xia, K., Tang, B., y Wang, J. (2020). 'Association Between Vitamins and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Center-Based Survey in Mainland China', *Front Neurol*, 11: 488.
- Wang, T., Perera, N. D., Chiam, M. D. F., Cuic, B., Wanniarachchillage, N., Tomas, D., Samson, A. L., Cawthorne, W., Valor, E. N., Murphy, J. M., y Turner, B. J. (2020). 'Necroptosis is dispensable for motor neuron degeneration in a mouse model of ALS', *Cell Death Differ*, 27: 1728-39.
- Wang, T., Tomas, D., Perera, N. D., Cuic, B., Luikinga, S., Viden, A., Barton, S. K., McLean, C. A., Samson, A. L., Southon, A., Bush, A. I., Murphy, J. M., y Turner, B. J. (2022). 'Ferroptosis mediates selective motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis', *Cell Death Differ*, 29: 1187-98.
- Webster, C. P., Smith, E. F., Bauer, C. S., Moller, A., Hautbergue, G. M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M. A., Higginbottom, A., Walsh, M. J., Whitworth, A. J., Kaspar, B. K., Meyer, K., Shaw, P. J., Grierson, A. J., y De Vos, K. J. (2016). 'The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy', *EMBO J*, 35: 1656-76.
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., y Price, D. L. (1995). 'An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria', *Neuron*, 14: 1105-16.
- Writing, Group, y Edaravone, A. L. S. Study Group. (2017). 'Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet Neurol*, 16: 505-12.
- Wu, D. C., Re, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., y Przedborski, S. (2006). 'The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12132-7.
- Wu, W., y Stork, B. (2020). 'The phospho-barcode of RIPK1: complementarity or redundancy?', *Mol Cell Oncol*, 7: 1776085.

- Xie, T., Peng, W., Liu, Y., Yan, C., Maki, J., Degterev, A., Yuan, J., y Shi, Y. (2013). 'Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins', *Structure*, 21: 493-9.
- Xu, D., Jin, T., Zhu, H., Chen, H., Ofengeim, D., Zou, C., Mifflin, L., Pan, L., Amin, P., Li, W., Shan, B., Naito, M. G., Meng, H., Li, Y., Pan, H., Aron, L., Adiconis, X., Levin, J. Z., Yankner, B. A., y Yuan, J. (2018). 'TBK1 Suppresses RIPK1-Driven Apoptosis and Inflammation during Development and in Aging', *Cell*, 174: 1477-91 e19.
- Yamamoto, Y., Kuwahara, T., Watanabe, K., y Watanabe, K. (1996). 'Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one', *Redox Rep*, 2: 333-8.
- Yamazaki, M., Esumi, E., y Nakano, I. (2005). 'Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis?', *Neuropathology*, 25: 381-7.
- Yong, Y., Hunter-Chang, S., Stepanova, E., y Deppmann, C. (2021). 'Axonal spheroids in neurodegeneration', *Mol Cell Neurosci*, 117: 103679.
- Yuan, J., Amin, P., y Ofengeim, D. (2019). 'Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases', *Nat Rev Neurosci*, 20: 19-33.
- Yun, J., Mullarky, E., Lu, C., Bosch, K. N., Kavalier, A., Rivera, K., Roper, J., Chio, II, Giannopoulou, E. G., Rago, C., Muley, A., Asara, J. M., Paik, J., Elemento, O., Chen, Z., Pappin, D. J., Dow, L. E., Papadopoulos, N., Gross, S. S., y Cantley, L. C. (2015). 'Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH', *Science*, 350: 1391-6.
- Zarebkohan, A., Javan, M., Satarian, L., y Ahmadiani, A. (2009). 'Effect of chronic administration of morphine on the gene expression level of sodium-dependent vitamin C transporters in rat hippocampus and lumbar spinal cord', *J Mol Neurosci*, 38: 236-42.
- Zhang, X., Dowling, J. P., y Zhang, J. (2019). 'RIPK1 can mediate apoptosis in addition to necroptosis during embryonic development', *Cell Death Dis*, 10: 245.

- Zhang, X., Zhang, H., Xu, C., Li, X., Li, M., Wu, X., Pu, W., Zhou, B., Wang, H., Li, D., Ding, Q., Ying, H., Wang, H., y Zhang, H. (2019). 'Ubiquitination of RIPK1 suppresses programmed cell death by regulating RIPK1 kinase activation during embryogenesis', *Nat Commun*, 10: 4158.
- Zhang, Y., Su, S. S., Zhao, S., Yang, Z., Zhong, C. Q., Chen, X., Cai, Q., Yang, Z. H., Huang, D., Wu, R., y Han, J. (2017). 'RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome', *Nat Commun*, 8: 14329.
- Zhao, H., Jaffer, T., Eguchi, S., Wang, Z., Linkermann, A., y Ma, D. (2015). 'Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury', *Cell Death Dis*, 6: e1975.
- Zhu, G., Wu, C. J., Zhao, Y., y Ashwell, J. D. (2007). 'Optineurin negatively regulates TNFalpha- induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP', *Curr Biol*, 17: 1438-43.
- Ziff, O. J., Clarke, B. E., Taha, D. M., Crerar, H., Luscombe, N. M., y Patani, R. (2022). 'Meta-analysis of human and mouse ALS astrocytes reveals multi-omic signatures of inflammatory reactive states', *Genome Res*, 32: 71-84.