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

EFECTOS CELULARES DEL DÉFICIT DE VITAMINA C EN NEURONAS MOTORAS BULBARES

POR VALENTINA ANDREA MUÑOZ MONJE

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magister en Neurobiología

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

Agosto, 2026
Concepción, Chile

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

Profesores integrantes del comité evaluador:

_____
Dr. Francisco Nualart
Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

_____
Dra. Viviana Pérez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

_____
Dr. Marco Fuenzalida
Evaluador externo
Universidad de Valparaíso

_____
Dr. Patricio Castro
Director del programa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

© 2026, Valentina Andrea Muñoz Monje

DEDICATORIA

A mi abuelo, Rene A. Monje Silvestre (Q.E.P.D).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi profesor guía, el Dr. Francisco Nualart, por su confianza, paciencia y por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio. Estoy muy agradecida por todo lo que me ha enseñado durante este tiempo, por darme la oportunidad de conocer y aplicar distintas técnicas, y por compartir su entusiasmo por la ciencia.

A la Dra. Katterine Salazar, al Dr. Fernando Martínez y a Ximena Koch, muchas gracias por su disposición, paciencia y por enseñarme tantas técnicas, tanto en histología como en el área molecular, su apoyo fue fundamental en estos años.

A mis compañeros de laboratorio, Eder, Isa, Feña, Cote y Jesu, gracias por las tantas risas, los cafecitos y el apoyo tanto en los buenos como malos momentos. Me alegra mucho haber compartido esta etapa con ustedes y me llevo con mucho cariño todos los momentos que hemos vivido juntos.

Finalmente a mi familia, mi hermana Sofia, mis padres Roberto y Natalia, y mi esposo Rodrigo, muchas gracias siempre por su apoyo y amor incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS IX

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES X

RESUMEN XIV

ABSTRACT XVI

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Escorbuto y déficit de vitamina C 1

1.2 Vitamina C 3

1.3 Daño oxidativo 9

1.4 Enfermedades de la neurona motora 15

1.5 Alteraciones motoras en un modelo de deficiencia de vitamina C 19

1.6 Neurona motora bulbar y el modelo de estudio in vitro 22

2. HIPOTESIS 27

3. OBJETIVO GENERAL 27

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS 27

5. MATERIALES Y MÉTODOS 28

5.1 Animales de experimentación 28

5.1.2 Parámetros de comportamiento 29

5.2 Tinciones histológicas 31

5.2.1 Muestras y procesamiento histológico 31

5.2.2 Tinción de Hematoxilina y Cromotropo 32

5.2.3 Tinción de Nissl 33

5.3 Ensayos de inmunolocalización 33

5.3.1 Inmunohistoquímica 33

5.3.2 Inmunofluorescencia 34
5.4 Hibridación *in situ*.....35
5.4.1 Muestras para hibridación *in situ*.....35
5.4.2 Obtención de las sondas para el transportador SVCT2.....35
5.4.3 *Dot blot* para ácidos nucleicos 37
5.4.4 Hibridación *in situ* 37
5.5 Proteómica.....39
5.5.1 Muestras para proteómica.....39
5.5.2 Análisis de datos 41
5.6 Western blot.....42
5.6.1 Obtención de extractos de proteínas totales.....42
5.6.2 Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia.....43
5.6.3 Inmunodetección de proteínas.....44
5.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) 44
5.8 Cultivo celular 45
5.8.1 Cultivo de células AF22.....45
5.8.2 Obtención de neuronas motoras espinales a partir de células AF22.46
5.8.3 Obtención de neuronas motoras cervicales a partir de células AF22 47
5.9 Tratamiento cultivo celular 48
5.10 Extracción de ARN y RT-PCR.....49
5.10.1 Extracción de ARN total 49
5.10.2 RT-PCR convencional.....50
5.11 Inmunocitoquímica.....52
5.12 Determinación del AA intracelular.....52
5.13 Análisis de ROS intracelular 53
5.14 Microscopía y análisis de datos.....53

6. RESULTADOS.....58

6.1 Parte I. Caracterización celular y subcelular de neuronas motoras bulbares en el modelo de cobayo escorbútico. 58

6.1.1 Evaluación neurológica y motora del cobayo escorbútico. 58

6.1.2 Caracterización histológica de neuronas motoras en los núcleos craneales bulbares. 62

6.1.3 Evaluación de la distribución de los cuerpos de Nissl (acúmulos de retículo endoplasmático y ribosomas) y estructuras subcelulares en neuronas motoras escorbúticas. 72

6.1.4 Evaluación de la respuesta astrocítica en cobayos escorbúticos. 90

6.1.5 Evaluación del transportador de vitamina C SVCT2 en neuronas motoras escorbúticas. 96

6.1.6 Análisis proteómico de bulbo raquídeo en condiciones escorbúticas. 105

6.2 Parte II. Caracterización celular y subcelular de neuronas motoras diferenciadas *in vitro* de iPSC humanas en déficit de vitamina C. 115

6.2.1 Análisis en neuronas motoras espinales. 115

6.2.2 Diferenciación de AF22 a neuronas motoras cervicales. 119

6.2.2 Análisis morfológico y subcelular de neuronas motoras cervicales inducidas a un déficit de vitamina C. 125

6.2.3 Análisis de neuronas motoras cervicales inducidas a déficit de vitamina C y exposición a daño oxidativo. 137

7. DISCUSIÓN.....145

8. CONCLUSIONES.....164

9. ANEXO 165

10. BIBLIOGRAFÍA.....169

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en análisis inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos. 54
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en análisis de Western blot. 56
Tabla 3. Partidores utilizados para RT-PCR. 57

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Absorción e ingreso del AA en el sistema nervioso. 5
Figura 2. Degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores en las enfermedades de la neurona motora. 16
Figura 3. Nervios craneales involucrados en la enfermedad motora bulbar. 23
Figura 4. Caracteristicas morfologicas y marcadores específicos de neuronas motoras derivadas de iPSC. 26
Figura 5. El déficit de vitamina C disminuye el peso corporal, la ingesta de alimentos y la frecuencia respiratoria en cobayos. 60
Figura 6. Evaluación de reflejos sensoriales y motores en cobayos control y escorbúticos. 61
Figura 7. El escorbuto induce la depleción de glicógeno en el hígado. 63
Figura 8. Las neuronas motoras presentaron una morfología neuronal clásica con cuerpos de Nissl evidentes, preferentemente en neuronas del tronco encefálico y la médula espinal. 65
Figura 9. Localización de los núcleos neuronales craneales en el bulbo raquídeo del cerebro de cobayo. 66
Figura 10. El análisis histológico en el bulbo raquídeo evidenció una disminución neuronal en los núcleos dorsal del vago y del tracto solitario, de los animales escorbúticos. 68
Figura 11. El escorbuto induce una disminución en la inmunoreactividad para tubulina-βIII, fundamentalmente en neuronas del núcleo hipogloso y dorsal vago. 71
Figura 12. El análisis de Nissl evidenció una distribución periférica heterogénea y una mayor agregación en las neuronas del tronco encefálico y la médula espinal. 73
Figura 13. Los cuerpos de Nissl presentaron escasa tinción en neuronas especificas del bulbo raquídeo de cobayos escorbúticos. 74

Figura 14. El análisis inmunohistoquímico con KDEL mostró un incremento de tinción en neuronas de la corteza motora, el tronco encefálico y la médula espinal de cobayos escorbúticos. 76
Figura 15. El análisis inmunohistoquímico con KDEL en bulbo raquídeo evidenció un aumento de tinción en neuronas en los núcleos craneales de los cobayos escorbúticos. 78
Figura 16. El análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal determinó un incremento de intensidad para KDEL en diferentes núcleos del bulbo raquídeo de cobayos escorbúticos. 80
Figura 17. El análisis ultraestructural evidenció alteraciones en el RE de neuronas de la corteza cerebral de cobayos escorbúticos. 83
Figura 18. El escorbuto induce alteraciones en el RE, mitocondrias y la vaina de mielina en neuronas del bulbo raquídeo. 84
Figura 19. El escorbuto induce un incremento de DRP1 y VDAC en los procesos neuronales, en los núcleos hipogloso y dorsal del vago. 87
Figura 20. El escorbuto induce un incremento de DRP1 y VDAC en los procesos neuronales en el núcleo solitario. 89
Figura 21. El escorbuto aumenta la activación astrocítica en regiones específicas del cerebro de cobayos. 91
Figura 22. El análisis para GFAP evidenció múltiples procesos astrociticos positivos entre las neuronas de los núcleos subependimarios escorbúticos. 93
Figura 23. El análisis para GFAP mostró largos procesos astrociticos positivos, particularmente asociados a la región del tracto espinal del nervio trigémino. ..95
Figura 24. El escorbuto genera una disminución del transportador SVCT2 tanto en corteza cerebral como en la médula espinal. 97
Figura 25. Astrocitos activados del tronco encefálico GFAP y vimentina positivos, inducen la expresión de SVCT2 en cobayos escorbúticos. 98
Figura 26. La inmunotinción para SVCT2 mostró una baja señal para el marcador en los núcleos del bulbo raquídeo. 100

Figura 27. Las neuronas corticales de cobayos escorbúticos presentaron una tendencia a una menor señal de hibridación para el transportador SVCT2.....103
Figura 28. El análisis de hibridación in situ evidenció una disminución de la señal de SVCT2 en neuronas bulbares de cobayos escorbúticos. 104
Figura 29. El análisis de Heatmap mostró un patrón diferencial de expresión de proteínas entre las muestras control y escorbúticas de bulbo raquídeo de cobayo. 107
Figura 30. El análisis de Volcano plot identificó proteínas sobreexpresadas y subexpresadas en las muestras escorbúticas. 109
Figura 31. El análisis de enriquecimiento de vías evidenció alteraciones en procesos asociados al procesamiento de proteínas en el RE, entre otros procesos biológicos.....110
Figura 32. Análisis mediante Western blot de proteínas asociadas a los procesos alterados por el déficit de vitamina C. 113
Figura 33. El déficit de vitamina C reduce la densidad de procesos neuronales in vitro en sMN diferenciadas. 116
Figura 34. El déficit de vitamina C reduce la densidad de procesos axonales MAP1B positivos en sMN. 118
Figura 35. Protocolo de diferenciación de células AF22 humanas a neuronas motoras cervicales (cMN). 120
Figura 36. Etapas y cambios morfológicos durante la diferenciación y maduración in vitro de cMN a partir de las células madre neuronales AF22. 121
Figura 37. Caracterización del fenotipo neuronal y motor de las cMN diferenciadas in vitro.....123
Figura 38. Disminución del contenido intracelular de AA en cMN bajo condiciones de déficit de vitamina C. 126
Figura 39. Alteraciones morfológicas de los procesos neuronales en las cMN en déficit de vitamina C. 128

Figura 40. Seguimiento de la dinámica morfológica de neuronas motoras mediante holotomografía. 130
Figura 41. Caracterización inmunocitoquimica del RE en cMN sometidas a déficit de vitamina C....132
Figura 42. Distribución intracelular de la señal de CellROX en cMN suplementadas y deficientes en vitamina C. 134
Figura 43. Redistribución de DRP1 y VDAC hacia los procesos neuronales MAP1B-positivos en cMN deficientes en vitamina C....136
Figura 44. Alteraciones de la densidad y extensión de los procesos neuronales de cMN inducidas por el déficit de vitamina y daño oxidativo. 140
Figura 45. Distribución de DRP1 y VDAC en procesos neuronas de cMN sometidas a déficit de vitamina C y daño oxidativo. 143
Figura 46. Esquema resumen de las alteraciones neuronales asociadas al déficit de vitamina C....163
Figura Suplementaria 1....165
Figura Suplementaria 2....166
Figura Suplementaria 3....167
Figura Suplementaria 4....168

RESUMEN

El déficit de vitamina C está presente en distintos grupos de la población humana. En el sistema nervioso, esta vitamina desempeña un papel fundamental como antioxidante, contribuyendo en la mantención de la homeostasis redox y la prevención del daño oxidativo, un proceso asociado a enfermedades neurodegenerativas. Basándose en un modelo de cobayo escorbútico, nuestro laboratorio evaluó el efecto del déficit de vitamina C en neuronas motoras espinales. Las observaciones evidenciaron debilidad de las extremidades y una menor frecuencia respiratoria, lo que sugiere una afección asociada al bulbo raquídeo. Para este trabajo se planteó la hipótesis de que el déficit de vitamina C o escorbuto induce daño oxidativo en las neuronas motoras bulbares, generando muerte neuronal. De esta manera, se establecieron dos objetivos: (1) Determinar si la inducción del escorbuto altera las características celulares y subcelulares de las neuronas motoras bulbares en el cerebro de cobayo. (2) Definir las características subcelulares de neuronas motoras cervicales sometidas a un déficit de vitamina C y daño oxidativo. Nuestros resultados mostraron que el déficit de vitamina se asoció con un deterioro motor, una disminución de neuronas y de SVCT2 en el bulbo raquídeo, junto con la generación de astrocitos reactivos positivos a SVCT2 en el tronco encefálico. A nivel subcelular, se identificaron alteraciones en la homeostasis del retículo endoplasmático y la organización mitocondrial. En las neuronas motoras humanas, con características cervicales

diferenciadas *in vitro*, el déficit de vitamina C alteró la organización de los procesos neuronales y la distribución de marcadores mitocondriales, efectos que se intensificaron frente al daño oxidativo. Estos hallazgos demostraron alteraciones neuronales y efectos subcelulares asociados al déficit de vitamina C en modelos *in vivo* e *in vitro*.

ABSTRACT

Vitamin C deficiency is present in different groups of the human population. In the nervous system, this vitamin plays a fundamental role as an antioxidant, contributing to the maintenance of redox homeostasis and the prevention of oxidative damage, a process associated with neurodegenerative diseases. Using a scorbutic guinea pig model, our laboratory evaluated the effects of vitamin C deficiency on spinal motor neurons. Our observations revealed limb weakness and a reduced respiratory rate, suggesting an impairment associated with the medulla oblongata. In this study, we hypothesized that vitamin C deficiency, or scurvy, induces oxidative damage in bulbar motor neurons, leading to neuronal death. Accordingly, two objectives were established: (1) to determine whether the induction of scurvy alters the cellular and subcellular characteristics of bulbar motor neurons in the guinea pig brain; and (2) to define the subcellular characteristics of cervical motor neurons subjected to vitamin C deficiency and oxidative damage. Our results showed that vitamin C deficiency was associated with motor impairment, a reduction in neuronal number and SVCT2 levels in the medulla oblongata, together with the generation of SVCT2-positive reactive astrocytes in the brainstem. At the subcellular level, alterations in endoplasmic reticulum homeostasis and mitochondrial organization were identified. In human motor neurons with cervical characteristics differentiated *in vitro*, vitamin C deficiency altered the organization of neuronal processes and the distribution of

mitochondrial markers, effects that were exacerbated in response to oxidative damage. These findings demonstrate neuronal alterations and subcellular effects associated with vitamin C deficiency in both *in vivo* and *in vitro* models.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Escorbuto y déficit de vitamina C

El escorbuto es una enfermedad causada por una deficiencia severa y prolongada de vitamina C. Esta enfermedad ha afectado a la población humana desde tiempos antiguos. Históricamente, se manifestaba en soldados y marineros que permanecían largos periodos de tiempo en embarcaciones y sin acceso a frutas y vegetales frescos, lo que llevaba a una deficiencia de vitamina C y el desarrollo de escorbuto, el cual de no ser tratado resultaba en la muerte de los individuos (Gandhi et al., 2023).

La mayoría de los mamíferos son capaces de sintetizar endógenamente la vitamina C a partir de la glucosa en el hígado. Sin embargo, los seres humanos y algunas especies, como los cobayos y murciélagos de la fruta, poseen un gen no funcional para la enzima L-gulonolactona oxidasa, encargada de catalizar la etapa final de la biosíntesis de la vitamina C (Campo, Nishikimi & Yagi, 1991). En consecuencia, estas especies dependen de la dieta para obtener esta vitamina.

Se estima que una ingesta diaria de vitamina C de 100 a 200 mg permite mantener concentraciones plasmáticas suficientes de 50 – 75 μmol/L. Niveles inferiores a 23 μmol/L son característicos de hipovitaminosis C, que puede manifestarse con síntomas como fatiga, disminución del apetito y alteraciones del

ánimo, mientras que niveles por debajo de 11 μmol/L son correspondientes a una deficiencia de vitamina C, la cual puede progresar al desarrollo de la enfermedad escorbútica (Rowe & Carr, 2020). Esta enfermedad se caracteriza por alteraciones en la síntesis de colágeno y la integridad del tejido conectivo, manifestándose clínicamente como hemorragias perifoliculares con aparición de petequias, inflamación, artralgia, síncope y, en casos severos, muerte súbita (Hirschmann & Raugi, 1999).

Aunque el escorbuto se describió clásicamente como una enfermedad común en siglos anteriores, en la actualidad aún se reportan casos de esta patología. Los estudios que han evaluado los niveles de vitamina C en la población son escasos. Sin embargo, una revisión realizada por Rowe y Carr en 2020 recopiló datos de distintos países y señaló que la hipovitaminosis C y la deficiencia de esta vitamina se presentan en proporciones variables a nivel mundial. En esta revisión, señalan una deficiencia de vitamina C de 8,4% en Estados Unidos, 32% en México, 34% en Sudáfrica y sobre un 70% en la India, siendo este último uno de los valores más bajos registrados (Rowe & Carr, 2020). En este contexto, la deficiencia de vitamina C se encuentra asociada principalmente a una alimentación deficiente, tabaquismo, obesidad, trastornos gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, e intervenciones quirúrgicas como la cirugía bariátrica, donde puede verse comprometida la absorción intestinal de esta vitamina (Gandhi et al., 2023; Riess et al., 2009).

1.2 Vitamina C

La vitamina C, también llamada ácido ascórbico (AA), es una vitamina hidrosoluble con propiedades ácidas y reductoras. En el organismo, se puede encontrar en su forma reducida como AA, a pH fisiológico en su forma aniónica como ascorbato y en su forma oxidada como ácido dehidroascorbico (DHA) (Salazar et al., 2023).

Tal como se describió previamente, para los seres humanos la obtención de esta vitamina depende exclusivamente de la dieta. Su absorción ocurre principalmente en el epitelio del intestino delgado a través de los transportadores de vitamina C dependientes de sodio tipo 1 (SVCT1) (Figura 1A). En plasma, el AA alcanzan concentraciones cercanas a 50 μM, mientras que el DHA se encuentra entre 2 y 5 μM, por lo tanto, el AA corresponde a la forma predominante de vitamina C en el plasma sanguíneo (Nualart et al., 2014). Tras su absorción, el AA se distribuye a los distintos tejidos, concentrándose particularmente en el hígado, la musculatura esquelética y el cerebro, los cuales se estima que presentan la mayor proporción de AA en el organismo (Padayatty & Levine, 2016).

En el sistema nervioso, el AA es incorporado a través de los transportadores de vitamina C dependientes de sodio tipo 2 (SVCT2), una isoforma altamente expresada en el cerebro y los ojos, mientras que el DHA es incorporado a través de los transportadores facilitadores de glucosa tipo 1 (GLUT1) (Figura 1B)

(Nualart et al., 2014; Nualart et al., 2003; Tsukaguchi et al., 1999). El ingreso del AA ocurre a través de los transportadores SVCT2 que se encuentran en la membrana basolateral de las células epiteliales del plexo coroideo (Ulloa et al., 2019). Una vez incorporado, el AA es liberado al líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante el transportador GLUT12 (Miyata et al., 2022). En el LCR, el AA alcanza concentraciones de 200 – 400 μM, y difunde al medio extracelular (LEC) por medio de un gradiente de concentración a través de las células ependimarias (Nualart et al., 2014; Portugal, 2024).

En el parénquima cerebral, las neuronas captan el AA a través de los transportadores SVCT2, lo que les permite alcanzar concentraciones intracelulares cercanas a 10 mM. Por otro lado, las células gliales como los astrocitos presentan niveles significativamente menores, alcanzando aproximadamente 1 mM (Rice, 2000). A diferencia de las neuronas, se ha observado que los astrocitos no expresan el transportador SVCT2 en condiciones basales (Castro et al., 2001; Pastor et al., 2013; Salazar et al., 2014). Sin embargo, estudios han demostrado que, en condiciones de cultivo celular *in vitro* y en contextos fisiopatológicos de estrés, como una lesión cerebral y neuroinflamación, los astrocitos son capaces de inducir la expresión de este transportador, por lo que podrían incorporar el AA (Berger & Hediger, 2000; Cisternas et al., 2026; Salazar et al., 2018).

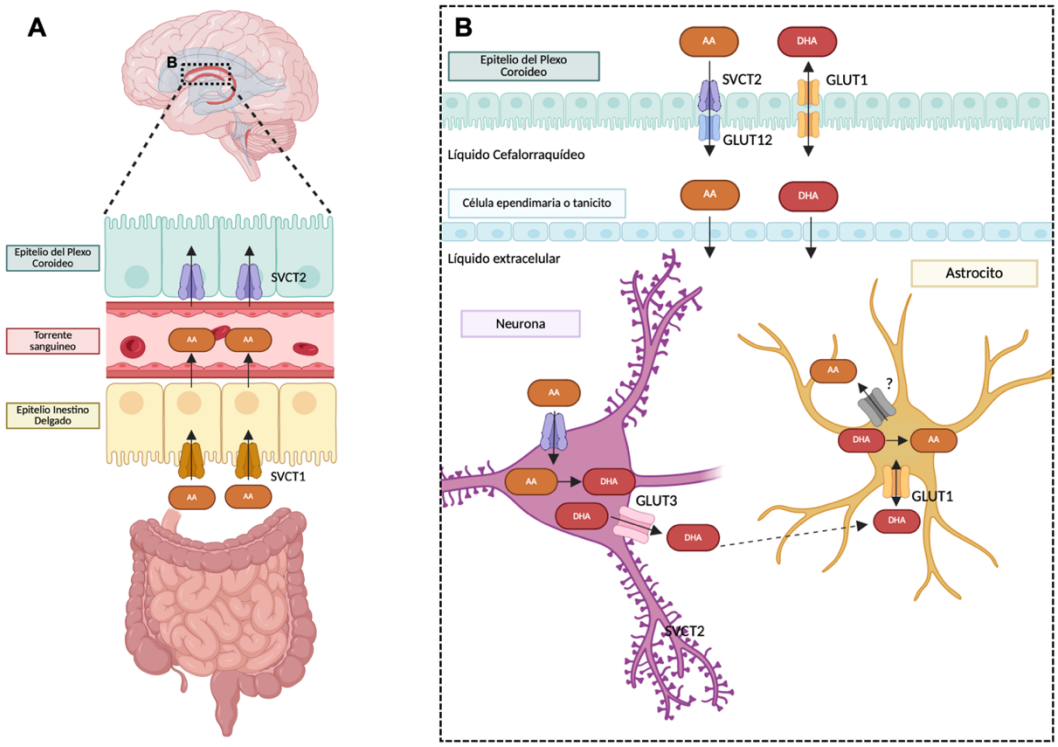


Figura 1. Absorción e ingreso del AA en el sistema nervioso.

(A) El AA se absorbe en el intestino delgado a través de los transportadores SVCT1 y es incorporado a la sangre. **(B)** En el sistema nervioso, el AA ingresa al LCR desde el epitelio del plexo coroideo a través de los transportadores SVCT2 y GLUT12. En el LCR, el AA difunde a través de las células ependimarias llegando al LEC. El AA ingresa a las neuronas mediante SVCT2 donde es oxidado a DHA, el cual es incorporado a los astrocitos y reducido a AA. Imagen modificada de (Harrison & May, 2009; Nualart et al., 2014; Portugal, 2024). Esquema creado en BioRender.com.

Dentro de la célula, el AA actúa como agente reductor y donante de electrones, generando como intermediario el radical libre de ascorbato. Este radical puede ser reducido nuevamente a AA por acción de las reductasas dependientes de

NADH y NADPH. Sin embargo, cuando se produce una acumulación del radical ascorbato, dos de estas moléculas reaccionan entre sí, formando una molécula de AA y otra de DHA (Harrison & May, 2009; Rice, 2000).

Para mantener las concentraciones fisiológicas de AA, se ha propuesto un mecanismo de reciclaje entre la neurona y los astrocitos, denominado el “efecto espectador”. Este mecanismo consiste en que, una vez generando el DHA, este es liberado al parénquima cerebral por la neurona a través de los transportadores GLUT3. Luego, el DHA es incorporado a las células astrocíticas a través del transportador GLUT1. Se estima que los astrocitos poseen hasta cuatro veces más glutatión que las neuronas y, por lo tanto, una mayor capacidad reductora (Rice, 2000). De esta forma, los astrocitos son capaces de reducir el DHA a AA, el cual es liberado nuevamente al parénquima para ser reutilizado (Cisternas et al., 2026; Nualart et al., 2014; Nualart et al., 2003).

Este mecanismo no solo es relevante para mantener las concentraciones de AA, sino también para evitar la acumulación de DHA. En condiciones fisiológicas, el DHA se encuentra en concentraciones muy bajas y, dada su toxicidad para las células neuronales, es rápidamente reducido (Garcia-Krauss et al., 2016). Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas en las que aumenta el estrés oxidativo, puede producirse una oxidación masiva de AA extracelulares, lo que eleva las concentraciones de DHA y provoca daño neuronal (Cisternas et al.,

2014). Nuestro laboratorio ha descrito varios de los efectos del DHA en las células neuronales. Cisternas y colaboradores (2014) demostraron que el tratamiento con DHA provoca una disminución transitoria del glutatión reducido en neuronas corticales, generando un cambio metabólico en las neuronas, caracterizado por la inhibición de la vía glucolítica y el aumento de la utilización de glucosa en la vía de las pentosas fosfato, con el fin de recuperar los niveles de glutatión (Cisternas et al., 2014). García-Krauss y colaboradores (2016) demostraron que el DHA potencia la muerte neuronal bajo condiciones de estrés oxidativo, en comparación con células expuestas únicamente a daño oxidativo (Garcia-Krauss et al., 2016). Espinoza y colaboradores (2020) demostraron que el tratamiento con DHA altera la morfología de las neuritas, reduciendo sus procesos y volumen, además de incrementar las especies reactivas en cultivos de neuroesferas (Espinoza et al., 2020). Ferrada y colaboradores (2020) demostraron que el DHA, en condiciones de estrés oxidativo, induce muerte celular del tipo necroptótica (Ferrada et al., 2020). Finalmente, Magdalena y colaboradores (2025) demostraron que el tratamiento de neuroesferas con DHA reduce la longitud y ramificación de las neuritas, y está asociado a un incremento de RIPK1, una proteína involucrada en vías de muerte celular (Magdalena et al., 2025).

La vitamina C participa en una variedad de funciones en el organismo, entre ellas la síntesis de colágeno, donde actúa como cofactor de las enzimas prolil 3-hidroxilasa, prolil 4-hidroxilasa y lisil hidroxilasa, las cuales hidroxilan residuos de

prolina y lisina para la formación y estabilización de la estructura de triple hélice del colágeno, proteína estructural esencial para la integridad de múltiples tejidos, incluyendo la piel y los vasos sanguíneos (Padayatty & Levine, 2016).

En el cerebro, la vitamina C actúa como cofactor enzimático en diversas reacciones, como la síntesis de catecolaminas, carnitina, colesterol, aminoácidos y ciertas hormonas peptídicas (Harrison & May, 2009). Además, se ha descrito su participación en la regulación epigenética, actuando como cofactor de enzimas implicadas en la desmetilación del ADN, lo que favorece cambios en la expresión génica y la reprogramación de células somáticas hacia células madre pluripotentes inducidas (Esteban et al., 2010; Salazar et al., 2023).

Adicionalmente, otra función atribuida al AA es su participación en el desarrollo neuronal y en el proceso de neurogénesis. Por un lado, en cultivos de neuronas corticales y en líneas celulares neuronales, la sobreexpresión del transportador de AA SVCT2 aumentó la arborización neuronal, promoviendo la formación de procesos neuríticos primarios, secundarios y terciarios (Salazar et al., 2021). Por otro lado, en cobayos deficientes en vitamina C se observó una disminución de los neuroblastos (células madre neurales) en los nichos neurogénicos de la zona subventricular y del ventrículo lateral, lo que sugiere que el AA es importante para el desarrollo de la neurogénesis adulta (Jara et al., 2022).

Por otra parte, una de las funciones más reconocidas de la vitamina C en el cerebro corresponde a su acción antioxidante, mediante la neutralización directa de especies reactivas y radicales libres generados durante el metabolismo celular, como el anión superóxido. El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su elevado consumo energético y a la abundancia de lípidos susceptibles a oxidación. En este contexto, el AA actúa como uno de los principales agentes antioxidantes en el tejido cerebral, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis redox y la protección neuronal frente al estrés oxidativo (Harrison & May, 2009).

1.3 Daño oxidativo

Las neuronas se consideran células metabólicamente muy activas. Por esta razón, se encuentran constantemente expuestas a especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que se generan como subproductos de las reacciones metabólicas que tienen lugar en los distintos compartimentos subcelulares. En concentraciones fisiológicas, las ROS cumplen funciones como moléculas señalizadoras, participando en procesos de plasticidad sináptica y supervivencia celular. Sin embargo, durante el envejecimiento y en ciertas condiciones patológicas, puede producirse un aumento de la generación de ROS y una disminución de los mecanismos antioxidantes, lo que favorece el desarrollo de estrés y daño oxidativo (Kim et al., 2015; Maldonado et al., 2023; Massaad & Klann, 2011).

El estrés oxidativo se produce debido a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas (superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito), y la capacidad antioxidante que presenta la célula para eliminar o reparar el daño inducido por estas moléculas. Las ROS celulares pueden originarse a partir de fuentes exógenas, como la radiación, toxinas y químicos ambientales, o endógenas, donde encontramos la cadena respiratoria mitocondrial, las NADPH oxidasas (NOX), las xantina oxidasas, el citocromo P450 del retículo endoplásmico y las flavin oxidasas en los peroxisomas, siendo la cadena respiratoria mitocondrial y las NOX las principales fuentes de ROS endógeno (Juan et al., 2021; Kim et al., 2015; Olufunmilayo et al., 2023).

Para contrarrestar el daño producido por las especies reactivas, las células cuentan con mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre las principales enzimas se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), como la isoforma citoplasmática SOD1, que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno. También encontramos las glutatión peroxidasas (GRx), que reducen el peróxido de hidrógeno y productos derivados de la peroxidación lipídica utilizando glutatión. Entre los mecanismos no enzimáticos se encuentran antioxidantes endógenos como el glutatión reducido, que participa tanto en la neutralización directa de ROS como en reacciones catalizadas por las GPx, y antioxidantes obtenidos a través de la dieta, donde encontramos la vitamina C (Bono et al., 2021; Jomova et al., 2023; Kim et al., 2015).

El estrés oxidativo afecta múltiples componentes celulares, incluidos lípidos, proteínas y ADN, comprometiendo la función y la supervivencia celular. Uno de los principales procesos inducidos por las especies reactivas es la peroxidación lipídica. En este proceso, un radical libre oxida una cadena lipídica insaturada, particularmente ácidos grasos poliinsaturados, generando lípidos hidroperoxidados, los cuales se degradan y forman aldehídos altamente reactivos como el malonaldehido (MDA) y el 4-hidroxinonenal (HNE) (Ayala et al., 2014; Juan et al., 2021). La peroxidación lipídica compromete la integridad de las membranas celulares y, particularmente en las neuronas, puede alterar la organización de la mielina y la estructura axonal, alterando la transmisión del impulso nervioso. Esto se debe a que la mielina posee un elevado contenido de lípidos, incluidos colesterol, fosfolípidos y glicolípidos, lo que la convierte en una estructura altamente susceptible a la oxidación (Luoma et al., 2015; Smith et al., 1999). En este contexto, la peroxidación lipídica ha sido vinculada a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, en la que el daño oxidativo contribuye a la pérdida de oligodendrocitos y la alteración de la integridad de la mielina (Van San et al., 2023).

Las proteínas constituyen otra de las macromoléculas susceptibles al estrés oxidativo, cuyas modificaciones pueden inducir su desplegamiento o alterar su estructura y, por ende, su función. Estas modificaciones pueden ser reversibles, como la s-nitrosilación, la s-sulfenación y la s-glutationilación, que afectan

preferentemente residuos de cisteína. Por otro lado, pueden generarse modificaciones irreversibles, como la carbonilación, caracterizada por la formación de grupos carbonilo en residuos aminoacídicos como arginina, histidina, lisina, prolina, treonina y cisteína, lo que puede comprometer la estructura y actividad biológica de las proteínas (Cai & Yan, 2013; Dalle-Donne et al., 2006; Wilson & Gonzalez-Billault, 2015). Entre las proteínas susceptibles al daño oxidativo se encuentran las que conforman el citoesqueleto neuronal, como los microfilamentos de actina, microtúbulos y neurofilamentos, los cuales son susceptibles a oxidación. En este contexto, un incremento de especies reactivas puede alterar su organización directamente, a través de modificaciones oxidativas de las proteínas estructurales, o indirectamente, alterando proteínas y vías de señalización que regulan su dinámica (Oswald et al., 2018; Wilson & Gonzalez-Billault, 2015).

Por último, el estrés oxidativo puede comprometer directamente al ADN, alterando su replicación y transcripción y, cuando el daño no puede ser reparado, activando vías de señalización de muerte celular. En este sentido, las especies reactivas pueden inducir modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas y provocar rupturas en las hebras del ADN. En particular, la oxidación de los residuos de guanina, promueven la formación de 8-oxo-2-desoxiguanosina (8-OHdG), que corresponde a uno de los biomarcadores más utilizados para la evaluación del daño oxidativo en el ADN (Ayna et al., 2025; Rahman et al., 2025).

Además del daño sobre las macromoléculas celulares, el estrés oxidativo puede comprometer la función y dinámica de organelos sensibles a un desequilibrio redox, como las mitocondrias y el retículo endoplasmático (RE). Las mitocondrias son esenciales para las neuronas, ya que proporcionan el ATP necesario para mantener su elevada actividad metabólica. Estos organelos presentan una dinámica de fisión y fusión, con la cual regulan su transporte y distribución en los somas y a lo largo de los axones neuronales (Knott et al., 2008). Sin embargo, un incremento de especies reactivas puede alterar esta dinámica, favoreciendo la fisión o fragmentación e inhibiendo la fusión mitocondrial. En este contexto, las mitocondrias dañadas pueden ser eliminadas mediante la mitofagia, un tipo de autofagia selectiva que reconoce y degrada mitocondrias disfuncionales y el cual se encuentra regulado por vías como PINK1-Parkin, en respuesta a una pérdida de potencial de membrana generada a partir del incremento del daño oxidativo (Wang et al., 2019; Xu et al., 2025). Durante este proceso, las mitocondrias fragmentadas son reconocidas y englobadas por autofagosomas, los cuales se fusionan con lisosomas para su degradación (Basak & Holzbaur, 2025). La alteración de la homeostasis mitocondrial se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, donde la fragmentación excesiva favorece la disfunción mitocondrial y el aumento de ROS. En este contexto, la inhibición de la fisión mediada por la proteína DRP1 ha mostrado reducir la fragmentación mitocondrial y la producción de especies reactivas (Baek et al., 2017; Yu et al., 2023).

Por otro lado, el RE es un organelo fundamental para las neuronas, ya que participa en la síntesis, plegamiento y control de calidad de las proteínas, la síntesis de lípidos y el almacenamiento del calcio intracelular, esencial para la transmisión sináptica. El plegamiento de proteínas en el RE, particularmente la formación de puentes disulfuro, requiere de un ambiente oxidante y contribuye a la generación de ROS (Ong & Logue, 2023). Por lo tanto, el correcto plegamiento de las proteínas en el RE depende de un equilibrio redox adecuado, cuya alteración podría favorecer la acumulación de proteínas mal plegadas y desencadenar estrés reticular. En ese contexto, la célula activa la respuesta a la proteína desplegada (UPR) regulada por los sensores de estrés PERK, IRE1 y ATF6. La acumulación de proteínas mal plegadas promueve su unión a la chaperona GRP78/BiP, permitiendo la activación de estos sensores y la vía de señalización. La activación de la UPR produce la inhibición de la transducción de proteínas, un agrandamiento del RE, la regulación positiva de proteínas chaperonas para ayudar a corregir el plegamiento incorrecto y la degradación de proteínas mal plegadas, con el fin de aliviar el estrés reticular (X. Chen et al., 2023; Jeon et al., 2023; Perri et al., 2015). El estrés del RE y la acumulación de proteínas mal plegadas se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, donde se ha descrito un aumento en la inmunotinción para la proteína GRP78 en motoneuronas de la médula espinal lumbar de pacientes con ELA, sugiriendo una activación de la respuesta al estrés del RE y una alteración de la homeostasis proteica (Sasaki, 2010).

1.4 Enfermedades de la neurona motora

El daño oxidativo neuronal se han descrito como mecanismo patológico implicado en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluidas las enfermedades de la neurona motora (MND) (Barnham et al., 2004). Las MND corresponden a un conjunto de patologías que se caracteriza por la degeneración de las motoneuronas superiores (MNS) e inferiores (MNI). Las MNS se localizan en la corteza cerebral motora y se proyectan hacia la médula espinal, mientras que las MNI se ubican en el tronco encefálico y en la médula espinal, proyectándose hacia el músculo diana (Figura 2A) (Hardiman et al., 2017).

La degeneración de estas neuronas compromete las vías corticoespinal y corticobulbar. Las motoneuronas espinales, asociadas a la vía corticoespinal, participan en el control del movimiento muscular voluntario, y su disfunción produce manifestaciones como rigidez, espasticidad, fasciculaciones y atrofia muscular, debido a la pérdida de conectividad sináptica. Por su parte, las motoneuronas bulbares, asociadas a la vía corticobulbar, participan en funciones relacionadas con la deglución, el habla y el control de la musculatura facial, y controlan funciones vitales involuntarias como la respiración (Brown & Al-Chalabi, 2017; Feldman et al., 2022; Statland et al., 2015). En este sentido, la degeneración de las neuronas motoras genera una debilidad progresiva de la musculatura esquelética voluntaria, comprometiendo funciones como la

deglución, el habla, el movimiento de las extremidades y la respiración (Hardiman et al., 2017).

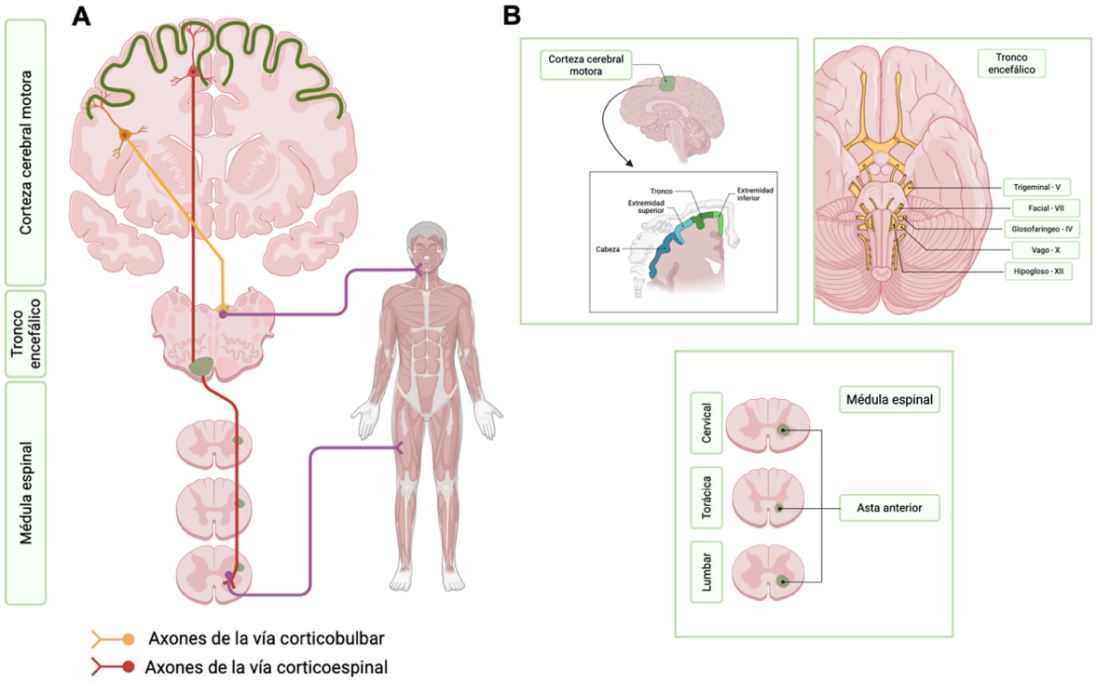


Figura 2. Degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores en las enfermedades de la neurona motora.

(A) El tracto corticoespinal comprende las MNS de Betz en la corteza cerebral motora (vía roja) que conectan con las MNI presentes en médula espinal, las cuales se proyectan hacia el músculo diana (vía morada). El tracto corticobulbar conecta las MNS corticales (vía amarilla) con neuronas motoras del tronco encefálico. **(B)** Las MND afectan preferentemente a las neuronas motoras presentes en la capa V de la corteza cerebral, los nervios craneales V, VII, IX, X y XII en el tronco encefálico, y las astas anteriores de la médula espinal. Imagen modificada de (Brown & Al-Chalabi, 2017) y (Feldman et al., 2022). Esquema creado en BioRender.com.

Desde un punto de vista patológico, se caracteriza por una pérdida de la conexión neuromuscular, retracción axonal y degeneración progresiva e irreversible de las motoneuronas. Entre las neuronas afectadas destacan las neuronas de Betz, localizadas en la capa V de la corteza cerebral motora; las motoneuronas alfa, presentes en los nervios motores del tronco encefálico, incluidos los nervios trigémino (V) y facial (VII) de la protuberancia; y los nervios glosofaríngeo (IX), vago (X) e hipogloso (XII) del bulbo raquídeo. Además de las motoneuronas ubicadas en las astas anteriores de la médula espinal (Figura 2B) (Grad et al., 2017; Hardiman et al., 2011; Reiner et al., 1995). Adicionalmente, este proceso neurodegenerativo suele ir acompañado de neuroinflamación y de la activación de células gliales, como los astrocitos.

Dentro de las MND, la forma más común y estudiada corresponde a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), patología caracterizada por la degeneración tanto de las motoneuronas superiores como de las inferiores. Sin embargo, dependiendo del patrón de aparición de los signos clínicos y del grado de afectación de las motoneuronas, es posible distinguir otros fenotipos asociados. Entre ellos se encuentra la esclerosis lateral primaria, que afecta predominantemente a las MNS y presenta una progresión de la enfermedad más lenta, con una sobrevida que puede alcanzar hasta 20 años. Por otra parte, se encuentra la atrofia muscular progresiva, que compromete principalmente a las MNI y presenta una sobrevida de aproximadamente 5 años. Por último, se encuentra la parálisis

bulbar progresiva, que se caracteriza por la degeneración predominante de las neuronas motoras asociadas a los nervios craneales glosofaríngeo, vago e hipogloso localizados en el bulbo raquídeo. Esta variante presenta una progresión rápida y una sobrevida estimada de solo 2 a 3 años, siendo uno de los fenotipos más agresivos de las MND (Hardiman et al., 2011).

En ELA se ha descrito un aumento del estrés y daño oxidativo en las neuronas motoras afectadas. Esta patología fue asociada por primera vez al daño oxidativo en 1993, cuando se describió que las mutaciones en la enzima antioxidante SOD1 eran una causa de la ELA familiar (Rosen et al., 1993). Desde entonces, diversos estudios han evidenciado daño oxidativo en pacientes y modelos experimentales de ELA. Ferrante y colaboradores (1997) analizaron tejido cerebral de pacientes con ELA, y observaron un aumento en los niveles de proteína carbonilada y 8-OHdG en la corteza cerebral, junto con un incremento de inmunotinción para MDA en la médula espinal. (Ferrante et al., 1997). Por otro lado, Miana-mena y colaboradores (2011), evaluaron el daño oxidativo en el modelo transgénico de ELA SOD1-G93A, y determinaron mediante análisis espectrofotométrico, un incremento de los niveles de productos finales de la peroxidación lipídica, MDA y HNE, en médula espinal (Miana-Mena et al., 2011).

Si bien la mayoría de las poblaciones neuronales se ven afectadas por el estrés oxidativo, se sugiere que las neuronas motoras son especialmente vulnerables

debido a sus características morfológicas y funcionales. Estas células poseen cuerpos celulares de gran tamaño y axones largos, lo que implica una elevada demanda metabólica para sostener procesos como el transporte axonal, la síntesis de componentes celulares, el mantenimiento del potencial de membrana y la generación y propagación de potenciales de acción. En consecuencia, requieren un mayor número de mitocondrias para satisfacer sus necesidades energéticas y, por lo tanto, presentan una mayor exposición a las ROS (Barber et al., 2006; Shaw & Eggett, 2000).

Considerando la relevancia del estrés oxidativo como uno de los principales mecanismos patológicos de esta enfermedad, se ha evaluado la participación de los mecanismos antioxidantes. Particularmente, un artículo publicado por Wang y colaboradores (2020), evaluó los niveles séricos de vitamina C en 202 pacientes con ELA. En este estudio, los pacientes presentaban niveles más bajos de vitamina C que los controles sanos (Wang et al., 2020). En este contexto, estos hallazgos refuerzan la importancia del desequilibrio redox en la enfermedad y sugieren que estos pacientes presentan una menor capacidad antioxidante, lo que favorecería un ambiente de estrés oxidativo.

1.5 Alteraciones motoras en un modelo de deficiencia de vitamina C

Dada la importancia de la vitamina C en la homeostasis redox del cerebro, un grupo de investigadores llevó a cabo un estudio que postulaba al cobayo

deficiente en vitamina C como un modelo experimental de ELA. Como se señaló anteriormente, el cobayo, al igual que los seres humanos, no sintetiza vitamina C de forma endógena. Por lo cual, es un modelo experimental ideal para el estudio de la deficiencia de vitamina C. Los resultados de esta investigación mostraron que el déficit en estos animales produjo hemorragias subcutáneas en la articulación de la rodilla y atrofia neurogénica de la musculatura. Además, mediante análisis histológico, determinaron una pérdida de neuronas motoras en el asta anterior de la médula espinal y una desmielinización del tracto piramidal, lo que sugiere una degeneración neuronal importante (den Hartog Jager, 1985).

Considerando estos antecedentes, nuestro laboratorio realizó un análisis preliminar, utilizando tinciones histológicas y ensayos inmunohistoquímicos, de muestras de médula espinal de cobayos en déficit de vitamina C. Sin embargo, bajo condiciones escorbúticas, no se observó una degeneración o pérdida de motoneuronas espinales, ni una activación astrocítica significativa en el asta anterior de la médula espinal, una característica clásica observada en la enfermedad de ELA (Guttenplan et al., 2020; Rossi et al., 2008; Yamanaka & Komine, 2018). Sin embargo, durante el desarrollo de estos análisis observamos que los animales sometidos a deficiencia de vitamina C presentaban diversos signos clínicos, como pérdida de peso corporal, reducción de la movilidad y dificultad para desplazarse. Además, los cobayos escorbúticos presentaban una respiración más lenta en comparación con los animales control, lo que sugiere

una posible alteración en las vías neuronales involucradas en el control motor y respiratorio. Dado que nuestros análisis preliminares no evidenciaron una degeneración importante de motoneuronas espinales, estos hallazgos sugirieron que el escorbuto podría estar afectando preferentemente a las neuronas motoras bulbares asociadas a funciones respiratorias y a la musculatura orofaríngea, más que un compromiso a nivel espinal.

Estos antecedentes adquieren aún más relevancia al considerar que el trasportador SVCT2, a través del cual las neuronas son capaces de captar la vitamina C, presenta una expresión heterogénea en las distintas regiones cerebrales. Mun y colaboradores (2006) realizaron un estudio de inmunotinción en cerebro de rata adulta, para evaluar la expresión de los transportadores SVCT. En este estudio se observó una intensa expresión de SVCT2 en regiones como la corteza cerebral y el hipocampo. Sin embargo, en estructuras más caudales, como el bulbo raquídeo, su expresión fue considerablemente menor y se restringió principalmente a los núcleos abducens y facial (Mun et al., 2006). Estos hallazgos sugieren que las distintas poblaciones neuronales tienen una capacidad diferencial para captar vitamina C y, por ende, una capacidad antioxidante distinta frente al estrés oxidativo. En este contexto, las neuronas motoras localizadas en el bulbo raquídeo, que presentan una menor expresión del transportador SVCT2, podrían ser particularmente vulnerables al daño oxidativo debido a una menor capacidad de incorporar este antioxidante.

1.6 Neurona motora bulbar y el modelo de estudio *in vitro*

Las neuronas motoras bulbares son motoneuronas localizadas en el tronco encefálico, particularmente en el bulbo raquídeo, correspondiente a la porción más caudal. El tronco encefálico es el origen de los nervios craneales que participan en las funciones sensitiva y motora de la cabeza y el cuello. Además, funciona como vía de conexión que permite la transmisión de información sensitiva y motora entre el encéfalo y la médula espinal (Purves, 2017).

La MND bulbar afecta preferentemente a las neuronas que inervan los nervios craneales glosofaríngeo (IX), vago (X) e hipogloso (XII) (Figura 3A) (Hardiman et al., 2011). El nervio glosofaríngeo corresponde al par craneal IX y es un nervio mixto, es decir, está compuesto por fibras motoras y sensitivas. Su origen viene de distintos núcleos localizados en el bulbo raquídeo que incluyen el núcleo ambiguo, el núcleo salival inferior, el núcleo del tracto solitario y el núcleo espinal del nervio trigémino. En el contexto motor, inerva principalmente al músculo estilofaríngeo, mientras que su componente sensitivo participa en la sensibilidad de la faringe y la lengua posterior. Por otra parte, el nervio vago corresponde al par craneal X y también se caracteriza por ser un nervio mixto. Sus fibras se originan en el núcleo dorsal del vago, núcleo ambiguo, núcleo del tracto solitario y núcleo espinal del nervio trigémino. Su función motora está asociada a la inervación de los músculos constrictores de la faringe y los músculos intrínsecos de la laringe. Además, presenta una importante función parasimpática,

distribuyendo fibras eferentes hacia la musculatura involuntaria de órganos como los bronquios, el corazón y el tracto gastrointestinal. Finalmente, el nervio hipogloso corresponde al par craneal XII y es exclusivamente motor. Se origina en el núcleo hipogloso y participa en la inervación de la musculatura intrínseca de la lengua y de los músculos estilogloso, hiogloso y genigloso (Figura 3B) (Purves, 2017; Snell, 2010).

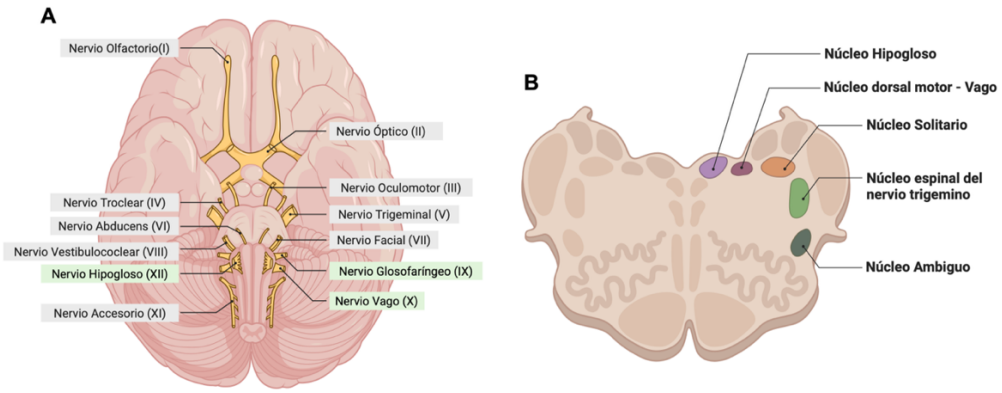


Figura 3. Nervios craneales involucrados en la enfermedad motora bulbar.

(A) La enfermedad motora bulbar afecta preferentemente a los núcleos craneales glosofaríngeo, vago e hipogloso. **(B)** El origen de estos nervios craneales se encuentran en los núcleos hipogloso, dorsal motor vago, solitario, ambiguo y espinal del nervio trigémino. Imagen modificada de (Siegel et al.). Esquema modificado en BioRender.com.

Adicionalmente, algunos núcleos neuronales del bulbo raquídeo participan en la regulación de la función respiratoria. En particular, con el grupo respiratorio dorsal, el cual contribuye al control de la inspiración y la frecuencia respiratoria.

Este grupo se localiza principalmente en el núcleo del tracto solitario, el cual constituye la principal terminación sensorial de los nervios vago y glosofaríngeo, encargados de transmitir información aferente hacia los centros respiratorios (Hall, 2015). Por otra parte, el núcleo ambiguo, a través del nervio vago, y el núcleo hipogloso, a través del nervio hipogloso, participan en el control motor de la musculatura de la faringe y laringe y la musculatura lingual, estructuras esenciales para la coordinación y el control de la respiración (Krohn et al., 2023).

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad motora bulbar corresponde a uno de los fenotipos más agresivos y, posiblemente, uno de los menos estudiados entre las MND. El estudio de estas poblaciones neuronales específicas presenta importantes limitaciones debido a la dificultad para obtener determinados subtipos neuronales a partir de modelos animales para establecer cultivos *in vitro* y a la limitada disponibilidad de líneas celulares especializadas de origen comercial. En este contexto, se han desarrollado modelos experimentales alternativos basados en las denominadas células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) (Bianchi et al., 2018).

Las iPSC son células humanas somáticas reprogramadas mediante la expresión de factores de transcripción como Oct4, Sox2, KLF4 y C-MYC, lo que les confiere un estado pluripotente. Estas células presentan capacidad de autorrenovación y pueden diferenciarse hacia distintos linajes celulares (Falk et al., 2012; Takahashi

& Yamanaka, 2006). Actualmente, las iPSC han adquirido gran relevancia en el campo de la neurobiología, ya que, a través de protocolos de diferenciación específicos, se pueden generar distintos subtipos neuronales, incluyendo motoneuronas, lo que posibilita el estudio de poblaciones de neuronas específicas *in vitro* (Bos et al., 2019).

Las neuronas motoras derivadas de iPSC suelen desarrollar una extensa red de procesos neuríticos y, en algunos casos, formar agrupaciones celulares compactas tipo neuroesferas, desde las cuales emergen prolongaciones que establecen conexiones entre ellas. Además, expresan marcadores neuronales como tubulina-βIII y MAP2, y específicos de identidad de motoneurona como HB9 (MNX1) y colina acetiltransferasa (CHAT), lo que permite confirmar su identidad (Figura 4) (Yang et al., 2023).

Este modelo han sido ampliamente utilizado en el estudio de patologías neurodegenerativas. En ELA, esta metodología también se ha utilizado para estudiar el estrés oxidativo. Onda-Ohto y colaboradores (2023), evaluaron la susceptibilidad de neuronas motoras diferenciadas a partir de iPSC que presentaban la mutación de ELA TARBDP (TDP-43) en condiciones oxidativas, tratando las células con peróxido de hidrógeno y analizando la presencia de granulaciones de estrés G3BP1 positivas (Onda-Ohto et al., 2023).

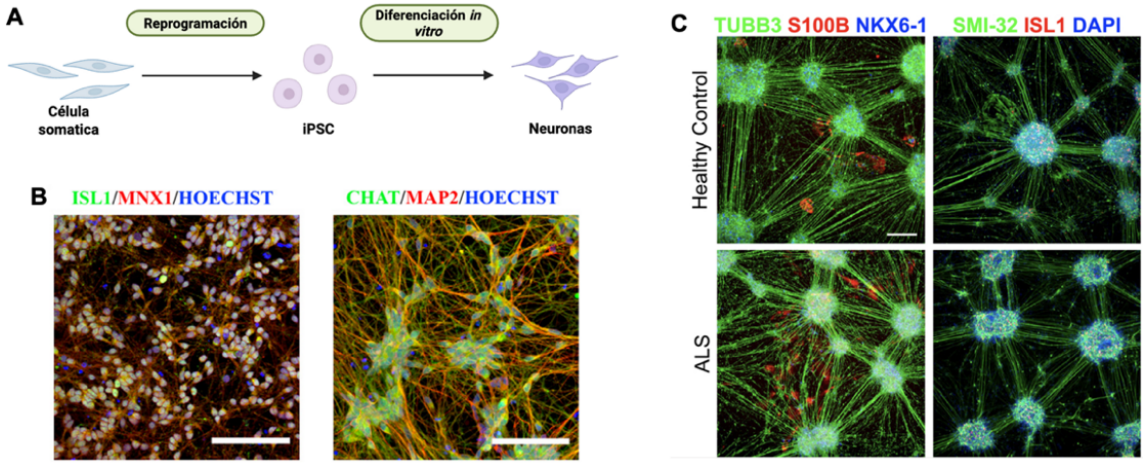


Figura 4. Caracteristicas morfologicas y marcadores específicos de neuronas motoras derivadas de iPSC.

(A) Esquema general de la diferenciación de iPSC. **(B)** Imágenes de fluorescencia por Yang y colaboradores (2023), donde se observan neuronas motoras positivas para HB9/MNX1 y CHAT, junto con el marcador neuronal MAP2. (C) Imagen de fluorescencia por Workman y colaboradores (2023), donde se observan neuronas motoras de ELA positivas a tubulina-βIII (TUBB3) que presentan agrupaciones neuronales tipo neuroesferas y múltiples procesos neuríticos que establecen conexiones entre ellos. Figuras extraídas de (Workman et al., 2023; Yang et al., 2023). Esquema modificado en BioRender.com.

En nuestro contexto, las neuronas motoras derivadas de iPSC representan una aproximación experimental complementaria al modelo animal, ya que permiten estudiar en un sistema controlado las alteraciones celulares inducidas por diversos estímulos, como, por ejemplo, el déficit de vitamina C.

2. HIPOTESIS

El déficit de vitamina C, o escorbuto, induce daño oxidativo celular en las neuronas motoras bulbares, lo que genera muerte neuronal.

3. OBJETIVO GENERAL

Definir los efectos celulares inducidos por la deficiencia de vitamina C en las neuronas motoras bulbares.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Objetivo específico 1

Determinar si la inducción del escorbuto altera las características celulares y subcelulares de las neuronas motoras bulbares en el cerebro de cobayo.

Objetivo específico 2

Definir las características subcelulares de neuronas motoras cervicales (diferenciadas a partir de iPSC) sometidas a un déficit de vitamina C y daño oxidativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron muestras de archivo de cerebro de cobayos Pirbright machos y hembras jóvenes (2 meses de edad). Los cobayos que corresponden a las muestras control fueron alimentados utilizando pellet para cobayo (5025 guinea pig diet Labdiet), el cual viene suplementado con AA, mientras que los cobayos en tratamiento deficiente en vitamina C fueron alimentados con pellet carente de AA (alimento para conejos, Cisternas). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura entre 20 a 25°C con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y recibieron acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del National Institute of Heath (NIH), Bethesda, MD y el Manual de Bioseguridad de CONICYT. Bioética Fondecyt de Iniciación N°11170959 y Fondecyt regular N° 1221147.

El tratamiento con una alimentación deficiente en vitamina C duró aproximadamente 4 semanas (28 a 30 días). Una vez observados los signos escorbúticos, como debilidad y pérdida de peso, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (40%), Xilacina (40%) y Pacifor (20%) y eutanasiados para la obtención del cerebro. Las muestras de cerebro de

cobayos, control y con déficit de vitamina C, fueron recolectadas y almacenadas para su posterior análisis.

5.1.2 Parámetros de comportamiento

Durante el tratamiento con una dieta deficiente en vitamina C, se evaluaron distintos parámetros generales asociados al estado fisiológico y conductual de los animales, incluyendo el peso corporal, el consumo de alimento y la frecuencia respiratoria, definida como el número de respiraciones por minuto. Para el análisis de estos parámetros, los datos se expresaron como la variación relativa respecto al valor registrado al inicio del tratamiento.

Adicionalmente, se realizaron pruebas neurológicas orientadas a evaluar reflejos sensoriales y respuestas motoras (Leon-Rodriguez et al., 2022). Las evaluaciones de reflejo incluyeron:

A) La prueba corneal, que consistió en acercar un cotonito hacia el canto medial del ojo del animal, registrando la presencia del reflejo de parpadeo como respuesta al estímulo.
B) La prueba de vibrisas, que consistió en estimular mecánicamente de manera suave los bigotes del animal utilizando un cotonito, registrando un movimiento de las vibrisas como respuesta al estímulo.

C) La prueba de soplo, que consistió en aplicar una suave pulso de aire en la región posterior de la oreja del animal, registrando el movimiento o sobresalto como respuesta al estímulo.

D) La prueba de pinchazo, que consistió en la aplicación de una presión suave con una pinza sobre una de las extremidades posteriores del animal, registrando el retiro de la extremidad o vocalización como respuesta al estímulo.

E) La prueba de sobresalto, que consistió en la generación de un estímulo sonoro intenso en las proximidades del animal, registrando un sobresalto o movimiento como respuesta al estímulo.

F) La prueba de olfativa, que consistió en la aproximación de un cotonito impregnando con amoniaco a la región nasal del animal, registrando el retiro de la cabeza o el acicalamiento de la nariz como respuesta al estímulo.

Por otra parte, las pruebas motoras incluyeron:

G) La prueba de agarre, consistió en colocar al animal en una reja metálica inclinada entre 90 y 45°, registrando la mantención del agarre del animal a la reja como respuesta.

H) La prueba de enderezamiento, consistió en colocar al animal sobre su espalda, registrando el giro de su cuerpo, apoyando nuevamente las extremidades sobre la superficie como respuesta.

En cada ensayo se registró la presencia o ausencia de la respuesta esperada dentro de un periodo máximo de 5 segundos. Los resultados fueron registrados de manera binaria, asignando un puntaje de 100 cuando la respuesta fue observada y un puntaje de 0 cuando no fue realizada.

5.2 Tinciones histológicas

5.2.1 Muestras y procesamiento histológico

Para análisis histológico, las muestras de cerebro fueron fijadas mediante perfusión vascular utilizando fijador Bouin (formalina 25% y ácido acético 5% en solución saturada de ácido pícrico). Posteriormente, las muestras se mantuvieron inmersas en el mismo fijador por aproximadamente 24 horas. Tras la fijación, los cerebros fueron disecados para obtener distintas secciones. Luego, las muestras fueron incluidas en parafina, generando bloques histológicos que se almacenaron para su posterior uso. Protocolo extraído de (Jara et al., 2016).

Para el presente estudio, se utilizaron bloques de secciones cerebrales en plano sagital para el análisis general de la corteza cerebral, el tronco encefálico y la médula espinal, y bloques de bulbo raquídeo en plano coronal para el análisis de los núcleos craneales. A partir de estos bloques, se obtuvieron cortes seriados de 7 μm de espesor mediante un micrótomo (Leica RM2125), los cuales fueron

analizados con tinciones histológicas clásicas como Hematoxilina-Cromotropo y la tinción de Nissl.

5.2.2 Tinción de Hematoxilina y Cromotropo

Para realizar esta tinción, los cortes fueron desparafinados en solvente HistoClear (I, II y III) (Merck) y rehidratados con una serie de alcoholes en concentración decreciente (100° I y II, 96° I y II, 70° y 50°), finalizando con un lavado en agua destilada, para eliminar el exceso de alcohol. La tinción nuclear se realizó incubando los tejidos en Hematoxilina de Harris, previamente filtrada, durante 3 minutos, seguido de un lavado en agua corriente por 10 minutos, para permitir el viraje de color. Para la tinción citoplasmática, los tejidos fueron sometidos a una serie de baños de alcoholes de concentración creciente (50°, 70° y 80°). Luego, las muestras se sumergieron en Cromotropo durante 15 segundos. El exceso de colorante fue removido tras lavados rápidos en alcoholes 96°C. Finalmente, se realizó la deshidratación de las muestras sumergiéndolas en alcoholes de concentración 100° (I y II) e HistoClear (I, II, III y IV). Los cortes fueron montados en medio de montaje Entellan. Las muestras se visualizaron a través de microscopía de campo claro.

5.2.3 Tinción de Nissl

Para esta tinción, los cortes fueron desparafinados y rehidratados según el procedimiento descrito anteriormente. A continuación, los tejidos fueron incubados en una solución de tinción de Acetato Violeta de Cresilo al 0,1%, previamente filtrada y calentada a 57°C, durante 10 minutos a la misma temperatura. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con agua destilada durante 3 minutos. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados y montados en medio de montaje Entellan. Las muestras se visualizaron mediante microscopía de campo claro.

5.3 Ensayos de inmunolocalización

5.3.1 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico, los cortes fueron desparafinados y rehidratados siguiendo el mismo procedimiento establecido para las tinciones histológicas. A continuación, se inhibió la peroxidasa endógena. Para esto, las muestras fueron incubadas con peróxido de hidrógeno al 3% y metanol por 10 minutos. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x (Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 3,5 mM, NaCl 120 mM, Tris 10 mM, pH 7,8). Posteriormente, los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario (Tabla 1), diluido en tampón Tris-PO_4 con BSA 1%, por aproximadamente 15 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Al finalizar la incubación, se

realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario (Tabla 2) diluido en tampón Tris-PO_4 con BSA 1%, por 2 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Una vez terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x. Finalmente, se realizó el revelado de las muestras utilizando una solución de diaminobencidina (DAB, 0,7 μg/mL) en tampón Tris-PO_4 1x y peróxido de hidrógeno (0,03% v/v) durante 15 minutos en oscuridad. Por último, los tejidos fueron deshidratados y montados en medio de montaje Entellan. Las muestras se visualizaron a través de microscopía de campo claro. Protocolo extraído de (Ramirez et al., 2022).

5.3.2 Inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia, los cortes fueron desparafinados y rehidratados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, seguido de 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x. A continuación, los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario (Tabla 1), diluido en tampón Tris-PO_4 con BSA 1%, por aproximadamente 15 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Al finalizar la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario (Tabla 2) diluido en tampón Tris-PO_4 con BSA 1%, por 2 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Una vez terminada la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con

tampón Tris-PO_4 1x. Finalmente, los cortes fueron montados en medio de montaje para fluorescencia (Dako). Las muestras se visualizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. Protocolo extraído de (Nualart et al., 2023).

5.4 Hibridación *in situ*

5.4.1 Muestras para hibridación *in situ*

Para este análisis, las muestras fueron fijadas por inmersión en formalina al 10% real durante 5 horas. Luego, los tejidos fueron incluidos en parafina y se obtuvieron bloques histológicos, que se almacenaron para su posterior análisis. Para el presente estudio, se realizaron cortes seriados de bulbo raquídeo y corteza cerebral motora de 7 μm de espesor mediante micrótomo (Leica RM2125). Posteriormente, los cortes fueron montados en un baño termorregulado con H_2O-DEPC al 0,1% v/v y en portaobjetos tratados con Vectabond (Vector Laboratories Inc).

5.4.2 Obtención de las sondas para el transportador SVCT2

Para la detección del transportador SVCT2 mediante hibridación *in situ*, se utilizó una ribosonda específica previamente desarrollada y utilizada en el laboratorio (Salazar et al., 2014). Esta ribosonda se obtuvo a partir de una secuencia de 620 pares de bases correspondiente a un fragmento de SVCT2, aislado del ARN total

de neuronas de rata. La secuencia fue clonada en el plásmido PCR 4Blut-TOPO mediante el kit Zero Blunt TOPO PCR Cloning (Invitrogen), generando el plásmido TOPO-SVCT2.

Para el presente estudio, se trasformaron bacterias competentes (TOP10F *E. coli* One Shot, Invitrogen) con el plásmido TOPO-SVCT2 (260 ng/uL). Posteriormente, las bacterias transformadas fueron sembradas en placas con medio LB-Agar e incubadas durante toda la noche para permitir el crecimiento de las colonias bacterianas. Al día siguiente, se seleccionaron colonias aisladas (clones) las cuales fueron transferidas a tubos Falcon con medio LB y antibiótico Ampicilina (50 ng/mL) e incubadas a 37°C para favorecer el crecimiento bacteriano. Luego, se purificó el plásmido a partir del cultivo de bacterias utilizando el kit E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I (Omega, Bio-tek) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el plásmido purificado fue linealizado mediante digestión con las enzimas de restricción SpeI y NotI (New England BioLabs Inc.). La linealización se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. A continuación, el plásmido linealizado fue purificado desde el gel de agarosa utilizando el kit E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega, Bio-tek). Finalmente, con el plásmido linealizado se realizó la síntesis de sondas sentido (SN) y antisentido (AS) utilizando el kit DIG RNA Labeling kit (Roche). Protocolo extraído de (Salazar et al., 2014).

5.4.3 *Dot blot* para ácidos nucleicos

Con el fin de verificar la correcta síntesis de la ribosonda marcada con digoxigenina (DIG) y confirmar la presencia de una señal detectable, se realizó un ensayo de *dot blot* para las sondas AS y SN.

Para esto, colocamos 2 μL de cada sonda sobre una membrana Nylon con carga positiva (Sigma-Aldrich), junto con los controles positivo y negativo incluidos en el DIG RNA Labeling kit (Roche). Posteriormente, la membrana fue incubada a 60°C durante 1 hora y 30 minutos para la fijación de las muestras. Pasado este tiempo, la membrana fue bloqueada durante 30 minutos con una solución de TBS 1x con Tween 20 al 0,05% y leche descremada al 5%. Finalizado el bloqueo, se realizaron lavados con solución de TBS 1x con Tween 20 al 0,05%. A continuación, la membrana fue incubada durante 1 hora en oscuridad con el anticuerpo anti-DIG-AP (Roche). Posteriormente, se realizaron nuevos lavados con solución de TBS 1x con Tween 20 al 0,05%. Finalmente, la señal se reveló utilizando el sustrato NBT-BCIP (Sigma-Aldrich) durante aproximadamente 15 minutos, controlando visualmente su desarrollo.

5.4.4 Hibridación *in situ*

Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas utilizando una serie de baños de Xilol, seguidas de una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes.

Posteriormente, los cortes fueron tratados con proteinasa K (1μg/mL) (Sigma) durante 5 minutos a 37°C. Finalizada la digestión enzimática, los tejidos fueron lavados dos veces con PBS-DEPC 1x por 3 minutos. Para detener la digestión, las muestras fueron fijadas con PFA al 4% preparado en PBS-DEPC 1x, durante 5 minutos a 4°C. Luego, se realizaron lavados adicionales con PBS-DEPC 1x para eliminar el exceso de fijador. A continuación, los cortes fueron incubados con trietanolamina acética (pH 8,0) (Merck) y anhidrido acético durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PBS-DEPC 1x por 3 minutos. Posteriormente, se realizó la prehibridación incubando las muestras en solución de prehibridación (Novagen) y DTT 1M durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Para la hibridación, se utilizaron las sondas correspondientes (AS y SN) en dilución 1:50 en solución de hibridación (Roche) y se incubaron durante toda la noche a 42°C en camada húmeda.

Al día siguiente, los cortes fueron lavados con solución salida de citrato (SSC, solución madre 20x, NaCl 3M, Citrato de sodio 0,3M, pH 7,0) en concentraciones decrecientes de 2x, 1x, 0,2x y 0,03x, con el fin de reducir la unión inespecífica de la sonda. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con tampón 1 (Tris-HCl pH 7,5 y NaCl 5M) a temperatura ambiente. Para el bloqueo, los cortes fueron incubados con suero de oveja normal (SON) al 2% preparado en tampón 1 por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-DIG-AP (1:500, Roche) en tampón 1 y SON al 0,1% durante 2

horas a temperatura ambiente y oscuridad. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con tampón 1 por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces con tampón 2 (Tris-HCl pH 9,5, NaCl 5M y $MgCl_2$ 2M) durante 10 minutos. El revelado de la señal se realizó utilizando los sustratos NBT-BCIP (Sigma-Aldrich) diluida en tampón 2, controlando visualmente el progreso de la señal. Finalmente, la reacción se detuvo al colocar las muestras en agua destilada y los cortes se montaron en medio de montaje acuoso (Dako). El análisis se llevó a cabo mediante microscopía de campo claro. Protocolo extraído de (Saldivia et al., 2024).

5.5 Proteómica

5.5.1 Muestras para proteómica

El análisis proteómico se utilizó para evaluar de forma global el perfil de proteínas presente en muestras de bulbo raquídeo escorbútico. Para ello, los tejidos fueron diseccionados, recolectados e inmediatamente colocados en hielo seco para evitar la degradación de proteínas. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -80°C. Las muestras fueron enviadas a MELISA Institute, donde se realizó el procesamiento de las muestras y cuantificación.

De acuerdo con el protocolo informado por MELISA Institute, las proteínas fueron extraídas utilizando un tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 8, Tritón X-100 al 1%,

NP-40 al 1%, Tween 20 al 1%, desoxicolato al 1%, EDTA 5mM, NaCl 50 mM, glicerol al 1%), inhibidor de proteasas 1x y DTT 5mM. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 60°C por 30 minutos, homogenizadas por ultrasonido y sometidas a alquilación con yodoacetamida 20 mM y bicarbonato de amonio 25 mM. Finalmente, las proteínas fueron purificadas mediante precipitación con cloroformo/metanol al 100% y secadas en un concentrador rotatorio durante toda la noche a 40°C.

Posteriormente, se prepararon las muestras para la espectrometría de masas. Para ello, las muestras purificadas fueron resuspendidas en urea 8 M y bicarbonato de amonio 25 mM, reducidas con DTT 20 mM, alquiladas utilizando yodoacetamida 20 mM en bicarbonato de amonio 25 mM y luego digeridas con Tripsina grado secuenciación en proporción 1:50 de proteasa/proteína durante 16 horas a 37°C. La digestión se detuvo mediante la adición de ácido fórmico al 10%. Finalmente, los péptidos generados fueron purificados utilizando columnas C18 descartables Evotips.

A continuación, los péptidos purificados fueron analizados mediante cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Para ello, las muestras fueron inyectadas en el cromatógrafo EVOSEP One (EVOSEP Biosystems) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Bruker Daltonics). Los datos se recopilaron con el software TimsControl 2.0 (Bruker

Daltonics). Para la identificación de proteínas, los datos obtenidos fueron procesados mediante el software MSFragger v4.1, a través de la plataforma Fragpipe v22.0 y utilizando el flujo de trabajo por defecto. Se utilizo la base de datos del proteoma de *Cavia porcellus* disponible en Uniprot, complementada con la base de datos de contaminantes comunes en espectrometría de masas. La cuantificación de proteínas se realizó mediante cuantificación sin etiquetas (Label Free Quantification, LFQ). Para ello, los valores de intensidad obtenidos fueron exportados y procesados en la plataforma R. Para identificación de proteínas diferencialmente expresadas (DEPs), los datos normalizados fueron comparados estadísticamente entre las condiciones experimentales. Se considerando DEPs aquellas que presentaron un p-value < 0,05 y un presentaron un Log2FC > 05 o Log2FC < -0,5.

5.5.2 Análisis de datos

A partir del análisis realizado por MELISA Institute, se generó una tabla de resultados que incluía el código del gen-proteína, el valor de LogFC y el valor de p (p-value) de cada proteína identificada. Con esta información se realizó un análisis de recopilación de datos principalmente orientado al estudio de las DEPs reguladas negativamente (*downregulated)* y positivamente (*upregulated*). Para ello, se recopiló información funcional asociada a cada gen o proteína de interés, incluyendo el nombre de la proteína y los procesos biológicos (BP) o funciones moleculares (MF) correspondientes. Esta información fue obtenida a partir de

bases de datos públicas y literatura científica incluyendo Uniprot, GenomeNet, NIH DAVID Bioinformatics y g:Profiler. Posteriormente, los resultados se representaron gráficamente mediante la plataforma SRplot. A partir de esta herramienta se generaron gráficos tipo Volcano plot y análisis de enriquecimiento, con el objetivo de facilitar la visualización e interpretación de las DEPs.

5.6 Western blot

5.6.1 Obtención de extractos de proteínas totales

Las muestras de corteza cerebral motora y bulbo raquídeo fueron diseccionadas y transferidas a tubos Eppendorf que contenían tampón de lisis NP-40 (Invitrogen) e inhibidor de proteasas y fosfatasas (Cell Signaling). Posteriormente, los tejidos fueron homogenizados en el tampón de lisis hasta obtener una suspensión uniforme. Las muestras homogenizadas fueron incubadas a 4 °C durante 30 minutos y luego centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante, el cual fue almacenado a -80°C hasta su posterior cuantificación. La concentración de proteínas totales fue determinada mediante el método de Bradford, midiendo absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

5.6.2 Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia

Para la separación de proteínas, se preparó un gel de acrilamida en gradiente. El gel separador fue preparado utilizando soluciones de acrilamida/bis-acrilamida al 5% y 15%. Ambas soluciones contenían Acril/Bis 45%-1,2%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 20%, persulfato de amonio (PSA) 10% y TEMED. Además, a la solución correspondiente a 15% se le agregó sacarosa al 60%. Las soluciones de 5 y 15% fueron incorporadas a un sistema de vasos comunicantes, lo que permitió su mezcla y la formación de un gradiente de concentración en el gel separador. Posteriormente, se preparó el gel apilador utilizando Acril/Bis 45%-1,2%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 20%, PSA 10% y TEMED. Para cada muestra, se cargaron 40 μg de proteína, que se mezclaron con tampón de carga 5x (National Diagnostics). La electroforesis se realizó utilizando tampón de corrida Tris-glicina 1x (Tris Base 25 mM, glicina 192 mM y 0,1% p/v SDS 20%, pH 6,8), aplicando un voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 3 horas. Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Immobilon-P, Merck) previamente activada en metanol. La transferencia se realizó a 100 V constantes durante 1 hora, utilizando tampón de transferencia (Tris-glicina 1x, metanol 20%, pH 8,8).

5.6.3 Inmunodetección de proteínas

Finalizada la transferencia, la membrana fue teñida con solución de rojo Ponceau al 0,2% p/b durante 3 minutos, con el objetivo de verificar la transferencia de proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue lavada durante 10 minutos con tampón de lavado TBS-Tween (TBS 1x y Tween 20 0,05%). Luego, la membrana se bloqueó durante 45 minutos con leche al 5% p/v, preparada en tampón de lavado TBS-Tween (TBS-Tween-Leche). Finalizado el bloqueo, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (Tabla 3), diluido en tampón TBS-Tween-Leche, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana fue lavada con tampón de lavado TBS-Tween y, posteriormente, incubada con el anticuerpo secundario (Tabla 3), diluido en tampón TBS-Tween-Leche. Esta incubación se realizó durante 2 horas en oscuridad y agitación constante. Para el revelado, se utilizó la solución ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (Cytiva), y la señal fue detectada utilizando el transdocumentador ImageQuat LAS500. Protocolo extraído de (Oviedo et al., 2026).

5.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras de corteza cerebral motora y bulbo raquídeo fueron fijadas mediante perfusión vascular utilizando una solución fijadora compuesta por glutaraldehído 2,5% v/v (Sigma) y PFA 2% p/v en tampón fosfato 0,1 M (8,34 g

KH_2PO_4, 6,74g K_2HPO_4, pH 7,0). Las muestras fueron mantenidas en la misma solución fijadora y almacenadas a 4°C hasta su posterior procesamiento.

En el presente estudio, las muestras fueron enviadas al Centro de Espectroscopía y Microscopía, CESMI, en la Universidad de Concepción, para su procesamiento y posterior análisis que se realizó en el microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200.

5.8 Cultivo celular

5.8.1 Cultivo de células AF22

Las células AF22 (Isenet Biobanking, Cat #IPS00008) corresponden a una línea celular comercial de células madre neuroepiteliales derivadas de iPSC (Calvo-Garrido et al., 2021; Falk et al., 2012).

Para el cultivo de estas células, estas deben ser sembradas en placas de cultivo previamente tratadas con Poli-L-Ornitina (Sigma-Aldrich) diluida con PBS 1x (8 g/L NaCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4, 0,2 g/L KCl y 0,24 g/L Na_2HPO_4, pH 7,4) por 30 minutos a 37°C. Las placas fueron lavadas con abundante PBS y recubiertas con Laminina (Invitrogen) diluida en PBS 1x. Las placas preparadas se mantuvieron a 4°C para su posterior utilización. Las células AF22 se sembraron en una placa de 100 mm (Falcon) considerando 40.000 células/cm^2 y con 8 mL de medio

DMEM-F12 con 1% Glutamax (Gibco), 1% N2 100x (Gibco), 0,1% B27 50x (Gibco), 10 ng/mL EGF y 10 ng/mL bFGF (STEMCELL Technologies). Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C y 5% CO_2. Se realizó cambio de medio día por medio.

5.8.2 Obtención de neuronas motoras espinales a partir de células AF22

La diferenciación de células AF22 a neuronas motoras espinales (sMN) se realizó siguiendo el protocolo estandarizado previamente en nuestro laboratorio y basado en el protocolo descrito por Bos et al., (2019). Las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C y 5% CO_2. Para ello, las células AF22 fueron subcultivadas y sembradas a una densidad de 1,76 x 10^6 células en una placa de 100 mm (Falcon), previamente tratada con Poli-L-Ornitina y Laminina, y utilizando medio de diferenciación. Este medio consistió en una mezcla de Neurobasal (Gibco) y DMEM-F12 con Glutamax (Gibco), 0,1% β-mercaptoetanol 50 mM (Gibco), 1% N2 (Gibco), 2% B27 (Gibco) y ácido ascórbico (AA) 50 μM. Durante 16 días, correspondiente a la etapa de diferenciación, el medio fue suplementado con CHIR-99021 3 μM (Tocris Bioscience) (día 1 a 6), Ácido retinoico 100 nM (Sigma-Aldrich) (día 2 a 15), Diclorhidrato de SAG 500 nM (día 2 a 15) (MedChem), DAPT 10 μM (Tocris Bioscience) (día 9 a 15), BDNF 10 ng/mL (Peprotech) (día 7 a 15) y GDNF 10 ng/mL (Peprotech).

Al día 16 las células fueron subcultivadas y sembradas en placas previamente tratadas para su maduración. Durante los siguientes 16 días, las placas se mantuvieron con medio de maduración, el cual consistió en medio Neurobasal suplementado con 1% N2, 2% B27, cocktail 1:1 de Uridina (Sigma-Aldrich) y Floxuridina (Cayman Chemical) 1 μM. El medio fue renovado día por medio agregando los factores neurotróficos BNDF, GDNF, CNTF (Peprotech) y IGF-1 (Peprotech) en concentración 10 ng/mL. Protocolo estandarizado de (Bos et al., 2019).

5.8.3 Obtención de neuronas motoras cervicales a partir de células AF22

La diferenciación de células AF22 en neuronas motoras cervicales (cMN) se realizó según el protocolo descrito por Yang et al. (2023). Las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C y 5% CO_2.

Para iniciar la diferenciación las células AF22 fueron subcultivadas y sembradas a una densidad de 30.000 células/cm^2 en placas recubiertas con Geltrex (Gibco), utilizando medio de inducción neuronal (NIM). Este medio consistió en una mezcla 1:1 de DMEM-F12 (Gibco) y Neurobasal (Gibco), 1% Pen/Strep (Gibco), 0,5x N2 (Gibco), 0,5x B27, 1% Glutamax (Gibco) y ácido ascórbico (AA) 0,1 mM (Sigma-Aldrich). Durante los 6 días siguientes, el medio fue renovado día por medio y suplementado con CHIR-99021 1 μM (Tocris Bioscience), SB-431542 2

μM (Sigma-Aldrich), DMH1 2 μM (MCE), Ácido retinoico 0,1 μM (AR) (Sigma-Aldrich) y Purmorfamina (PMN) 0,5 μM (Sigma-Aldrich).

El día 12, las células fueron nuevamente subcultivadas y sembradas en una densidad de 50.000 células/cm^2 en placas recubiertas con Polietilenimina 0,1% (PEI 0,1%) y en medio de maduración neuronal (NMM). Este medio consistió en Neurobasal Plus (Gibco), 1% Pen/Strep, 0,5x N2, 0,5x B27 Plus (Gibco), 1% Glutamax y AA a 0,1 mM. Durante los 6 días siguientes, el medio se renovó día por medio y se suplementó con AR 0,5 μM, PMN 0,1 μM y Compound E (CPE) 0,1 μM (MCE). Adicionalmente, durante esta etapa se incorporaron los factores neurotróficos BNDF (Peprotech), IGF-1 (Peprotech) y CTNF (Peprotech) a una concentración final de 10 ng/mL. A partir del día 18 y hasta el día 22, las células fueron mantenidas en medio NMM suplementando exclusivamente con factores neurotróficos. Protocolo extraído de (Yang et al., 2023).

5.9 Tratamiento cultivo celular

Durante el proceso de diferenciación, las sMN fueron suplementadas con AA 50 μM, mientras que las cMN fueron suplementadas con AA 0,1 mM (Sigma-Aldrich), de acuerdo con lo descrito en el protocolo de Bos et al (2014) y Yang et al. (2023), respectivamente. Una vez finalizada la etapa de maduración, las células utilizadas para el análisis de la deficiencia de vitamina C fueron mantenidas

durante 6 días en medio de maduración suplementado con factores neurotróficos, pero sin la adición de AA.

Para el tratamiento de inducción del daño oxidativo, las células fueron tratadas con H_2O_2 (Supelco) a una concentración final de 15 μM durante 8 horas. El tratamiento se realizó en medio de maduración suplementado o no con AA, según la condición experimental. Protocolo extraído de (Onda-Ohto et al., 2023).

5.10 Extracción de ARN y RT-PCR

5.10.1 Extracción de ARN total

Las cMN para fueron sembradas en una placa de 6-well (Falcon) donde se llevó a cabo su maduración, una vez finalizada esta etapa se realizó la extracción de ARN total utilizando el kit RNAqueous Micro Total RNA Isolation (Invitrogen). Para ello, las cMN fueron disociadas y centrifugadas a 100 g por 3 minutos formando un pellet con las células, descartándose posteriormente el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido en 100 μL de solución de lisis y homogenizando con vortex. Posteriormente, se añadieron 50 μL de etanol 100% y se homogenizó nuevamente. La preparación obtenida se llevó a filtros del kit y fue centrifugada a 16.500 g por 10 segundos. A continuación se realizaron lavados sucesivos con 180 μL de solución de lavado 1 y solución de lavado 2/3, respectivamente, centrifugando a 16.500 g por 10 segundos en cada ocasión. Tras descartar el

líquido de lavado, los filtros se centrifugaron nuevamente a 16.500 g por 1 minuto. Finalmente, los filtros fueron transferidos a tubos de recolección y el ARN fue eluido con 10 10 μL de solución de elusión previamente calentada a 75°C. La elución se incubo y centrifugó a 16.500 g por 30 segundos. El ARN obtenido se almaceno a -80°C hasta su posterior utilización.

5.10.2 RT-PCR convencional

En primero lugar, se realizó la transcripción reversa (RT) del ARN total. Para ello, se incubaron 2 μg de ARN total con 1 μL de tampón DNAsa I 10x (Thermo Scientific), 1 μL de DNAsa (1 U/μL) (Thermo Scientific) y agua libre de ARNasa (Cytiva), logrando un volumen total de 10 μL. Esta mezcla se homogenizó e incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 1 μL de EDTA 25 mM (Thermo Scientific) y se incubó por 60°C por 10 minutos. A continuación, se utilizaron los reactivos del kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Para el RT positivo se añadió 1 μL del cebador olido(dT) (0,5 1 μg/μL) y se incubo a 70°C por 5 minutos. Luego, se agregaron 7 μL de una mezcla previamente preparada de tampón RT 5x, 1 μL lRNAsa RiboLock (20 U/μL) y 1 μL de dNTPs 10 mM, seguido de una incubación a 37°C por 5 minutos. Finalmente, se agregó 1 μL de la transcriptasa inversa M-MuLV (ARNasa H RevertAid, 200 U/μL) al RT positivo, mientras que al control negativo (RT negativo) se añadió agua. Las reacciones se incubaron a 42°C por 60 minutos,

posteriormente a 70°C durante 10 minutos y finalmente los ADNc se mantuvieron a 4°C.

Para la amplificación mediante RT-PCR convencional, se preparó una mezcla de reacción que contenía 1,25 μL de tampón PCR 10x-$MgCl_2$/+KCl (Thermo Scientific), 0,75 μL de $MgCl_2$ 25 mM (Thermo Scientific), 0,25 μL de dNTPs 10 mM (Thermo Scientific), 0,25 μL de cada partidor (10 μM, *Forward* y *Reverse*) (Tabla 3), 0,0625 μL de ADN polimerasa Taq (5 U/μL) (Invitrogen) y agua libre de ARNasa. A esta mezcla se añadió 1 μL de ADNc correspondiente a los controles RT+, RT- y agua como control negativo de PCR. Las reacciones se realizaron en un termociclador ProFlex (Applied Biosystems) utilizando un ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% p/v en tampón TAE 1x, teñido con GelRed 1000x (Biotum). Se agregó a las muestras tampón de carga 6x (Thermo Scientific) y se sometieron a electroforesis a 100 V por 40 minutos. Finalmente, los fragmentos de ADN se visualizaron en el transdocumentador ImageQuat (LAS500). Protocolo extraído de (Magdalena et al., 2025).

5.11 Inmunocitoquímica

Las células fueron previamente fijadas en PFA 4% (Sigma-Aldrich) y posteriormente lavadas 3 veces por 10 minutos con tampón Tris-PO_4 1x. Luego, fueron incubadas durante toda la noche a temperatura ambiente y en cámara húmeda con el anticuerpo primario (Tabla 1), diluido en tampón Tris-PO_4 con BSA 1%. Al finalizar la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario (Tabla 2) diluido en tampón Tris-PO_4 con BSA 1% y Hoechst para tinción nuclear (1:1000, Sigma-Aldrich), por 2 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Una vez terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón Tris-PO_4 1x. Finalmente, las células fueron montadas en medio de montaje para fluorescencia (Dako) y colocadas en el portaobjetos. El análisis se llevó a cabo mediante microscopía confocal de fluorescencia. Protocolo extraído de (Ferrada et al., 2023).

5.12 Determinación del AA intracelular

Para determinar la concentración intracelular de AA, se utilizaron cMN maduras, tratadas con o sin vitamina C, y se sembraron en placas de 6-well (Falcon). Para el análisis se utilizó el kit EnzyChrom Ascorbic Acid Assay kit (BioAssay Systems), siguiendo las indicaciones del fabricante. La absorbancia de las muestras se midió con el espectrofotómetro Epoch (Biotek).

5.13 Análisis de ROS intracelular

Para determinar los niveles de ROS intracelular se utilizaron cMN sembradas en placas de 24-well (Falcon), las cuales fueron tratadas con y sin vitamina C por 6 días. Para el análisis se utilizó la sonda CellROX Deep Red Reagent (Invitrogen), que presenta una señal de fluorescencia a 665 nm. Las células fueron incubadas con la sonda CellROX a una concentración final de 5 μM durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para la adquisición de las imágenes se estableció un intervalo de 10 minutos entre cada cristal. Una vez finalizada la incubación, los cristales con las células fueron montados sobre un cubreobjetos y analizados mediante microscopía confocal de alta resolución.

5.14 Microscopía y análisis de datos

El análisis de las muestras y la adquisición de las imágenes de campo claro se realizaron con el microscopio Eclipse Ni (Nikon), mientras que las imágenes de fluorescencia se adquirieron con el microscopio confocal espectral LSM 780 (Zeiss). Para el análisis de la señal de CellROX se utilizó el microscopio confocal de alta resolución SP8 (Leica). Para análisis de seguimiento temporal de las células, se utilizó el microscopio de holotomografía Tomocube HT-X1 plus. Todos estos equipos se encuentran ubicados en las dependencias del Centro de Microscopía Avanzada (CMA-Biobío) de la Universidad de Concepción.

El análisis de datos de intensidad de tinción y fluorescencia media se realizó con el software ImageJ, mientras que el análisis de colocalización se realizó con IMARIS 9.2 (Bitplane). Finalmente, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU).

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en análisis inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-Calnexina	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Colina Acetil Transferasa	Cabra	1:200	Sigma-Aldrich
Anti-DRP1	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFAP	Conejo	1:200	Dako
Anti-GLUT1	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich
Anti-HB9	Ratón	1:200	D.S Hybridoma Bank
Anti-KDEL	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MAP1B	Cabra	1:200	-
Anti-MAP2	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p47phox	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PDI	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology

Anti-SOD1	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SV2	Ratón	1:100	D.S Hybridoma Bank
Anti-SVCT2	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SVCT2	Conejo	1:100	Novus
Anti-Tubulina βIII	Ratón	1:1000	Promega
Anti-VDAC	Conejo	1:100	Cell Signaling
Anti-Vimentina	Pollo	1:400	Millipore
Anti-Ratón + HRP	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Conejo + HRP	Cabra	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Gallina + HRP	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Cabra + HRP	Conejo	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Ratón AF488	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Ratón Cy3	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Ratón Cy5	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Conejo Cy3	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Conejo Cy5	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Gallina Cy5	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch
Anti-Cabra AF488	Burro	1:200	Jackson Inmunoresearch

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en análisis de Western blot.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Empresa
Anti-βActina (+HRP)	Ratón	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFAP	Conejo	1:1000	Dako
Anti-GLUT1	Conejo	1:5000	Sigma-Aldrich
Anti-KDEL	Ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SVCT2	Conejo	1:2000	Novus Biologics
Anti-Tubulina βIII	Ratón	1:5000	Promega
Anti-Ratón + HRP	Burro	1:5000	Jackson Inmunoresearch
Anti-Conejo + HRP	Cabra	1:5000	Jackson Inmunoresearch

Tabla 3. Partidores utilizados para RT-PCR.

Nombre	Partidor *Forward* (5´-3´)	Partidor *Reverse* (5´-3´)	Producto
OTX2	GAAGCTCCATATCCCTG GGTGGAAAG	CCATGACCTATACTCA GGCTTCAGG	211 pb
HOXB4	ACACCCGCTAACAAATG AGG	GCACGAAAGATGAGG GAGAG	187 pb
HOXC5	GAGGAGCGAGCTAAGA GCAG	GTGGCTCATGTGCAG TTTGG	129 pb
HOXC6	ACAGACCTCAATCGCTC AGG	GTACCGCGAGTAGATC TGGC	166 pb
HOXC8	CCTCCGCCAACACTAAC AGT	AAACATGAGGCTGGG AGACG	71 pb
HOXC9	CGTGGACTCGCTCATCT CTC	AAAATCGCTACAGTCC GGCA	118 pb
HOXC10	AGTGACTTCAATTGCGG GGT	GATAGGTGTTGAGGG CGAGG	100 pb
Ciclofilina	ATAATGGCACTGGTGG CAAGTC	ATTCCTGGACCCAAAA CGCTCC	239 pb

6. RESULTADOS

6.1 Parte I. Caracterización celular y subcelular de neuronas motoras bulbares en el modelo de cobayo escorbútico.

6.1.1 Evaluación neurológica y motora del cobayo escorbútico.

En esta primera parte se trabajó con el modelo animal de cobayo, el cual fue sometido a una dieta deficiente en vitamina C por 28 a 30 días, generando un estado escorbútico (Figura 5A). Durante este periodo se evaluaron distintos parámetros generales asociados al estado fisiológico de los animales, incluyendo el peso corporal, el consumo diario de alimento y la frecuencia respiratoria. Estos parámetros permitieron monitorear la evolución general de los animales durante el tratamiento deficiente en vitamina C.

Respecto al peso corporal, se determinó la variación de peso de cada animal (n=3, por condición) en relación con el peso registrado al inicio del tratamiento, correspondiente al día 1. Las mediciones mostraron que, entre los días 14 y 21, se observó una disminución progresiva del peso corporal en los cobayos con déficit de vitamina C. Por el contrario, los cobayos control mostraron un aumento de peso sostenido en el tiempo (Figura 5B). La disminución del peso corporal estuvo acompañada de una menor ingesta de alimento. En particular, a partir del día 21 de tratamiento, los animales en déficit de vitamina C mostraron una

disminución progresiva del consumo, mientras que los animales control mantuvieron una ingesta relativamente estable (Figura 5C). Al final del tratamiento, los animales control presentaron un consumo promedio de 46 $\pm$ 9,3 g de alimento, mientras que los animales escorbúticos consumieron en promedio 14,7 $\pm$ 13,8 g de alimento diario.

Por último, al evaluar la frecuencia respiratoria, observamos una disminución de la frecuencia respiratoria por minuto (rpm) en los cobayos con déficit de vitamina C a partir del día 21 (Figura 5D). En este punto, los animales control presentaron una frecuencia respiratoria de 143 $\pm$ 5,8 rpm, mientras que los cobayos escorbúticos presentaron en promedio 92,3 $\pm$ 18,5 rpm.

Además, se realizaron pruebas neurológicas para evaluar los reflejos sensoriales y motores. El día 14, tanto los cobayos control como en déficit de vitamina C fueron capaces de realizar satisfactoriamente todas las pruebas sensoriales de reflejo (corneal, vibrisas, soplo, pinchazo, sobresalto y olfativa) y motoras (agarre y enderezamiento), alcanzando un puntaje de 100 (Figura 6A). A finales del tratamiento, el día 28, los cobayos en déficit de vitamina C no presentaron diferencias con respecto a los controles en las pruebas sensoriales. Sin embargo, en las pruebas motoras de agarre y enderezamiento, los animales escorbúticos no lograron completarlas, por lo que se les asignó un puntaje de 0 (Figura 6B).

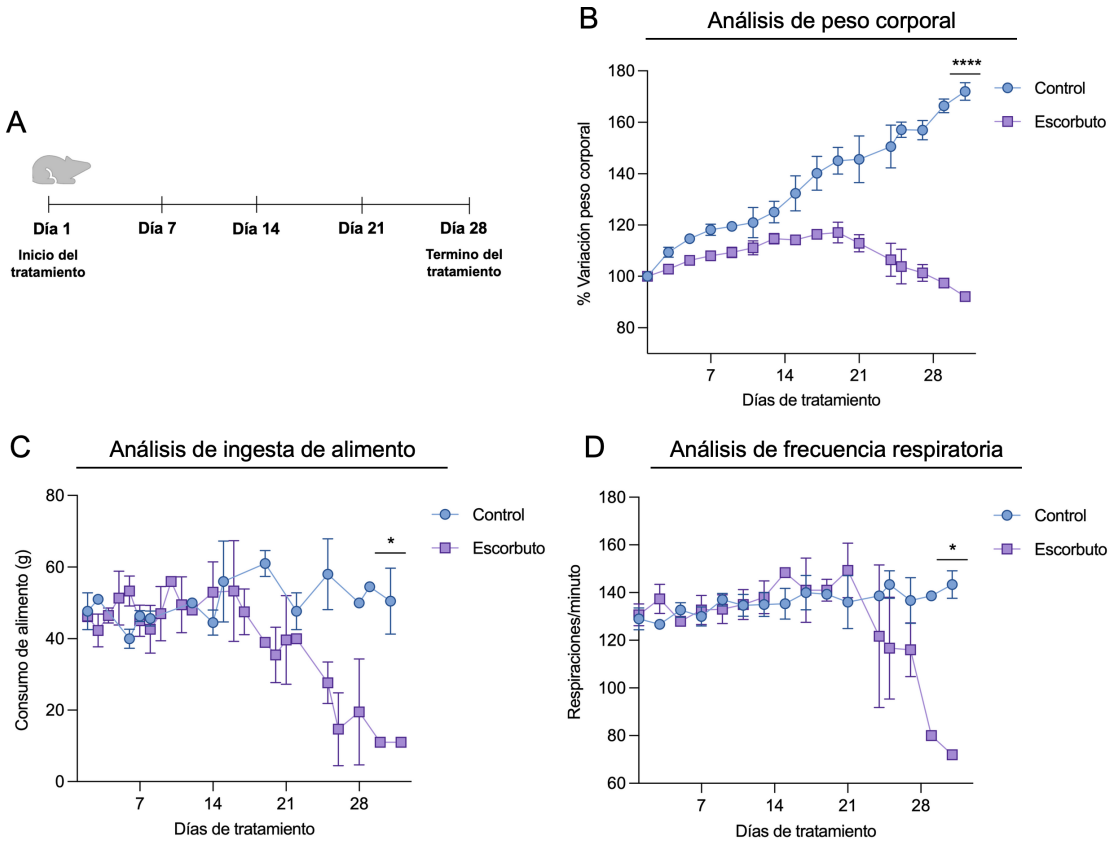


Figura 5. El déficit de vitamina C disminuye el peso corporal, la ingesta de alimentos y la frecuencia respiratoria en cobayos.

(A) Esquema general del trabajo experimental. **(B)** Análisis de la variación porcentual del peso corporal de los animales control y escorbúticos durante el tratamiento deficiente de vitamina C, respecto al peso basal de cada animal (día 1). **(C)** Análisis de la ingesta de alimento expresada en gramos (g), durante el tratamiento. **(D)** Análisis de la frecuencia respiratoria, expresada en respiraciones por minuto, durante el tratamiento. Para todos los análisis se consideró un n=3. Cada punto representa la media de los animales analizados en el tiempo experimental, mientras que la barra de error representa la desviación estándar (± SD) entre individuos. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; p****<0,0001.

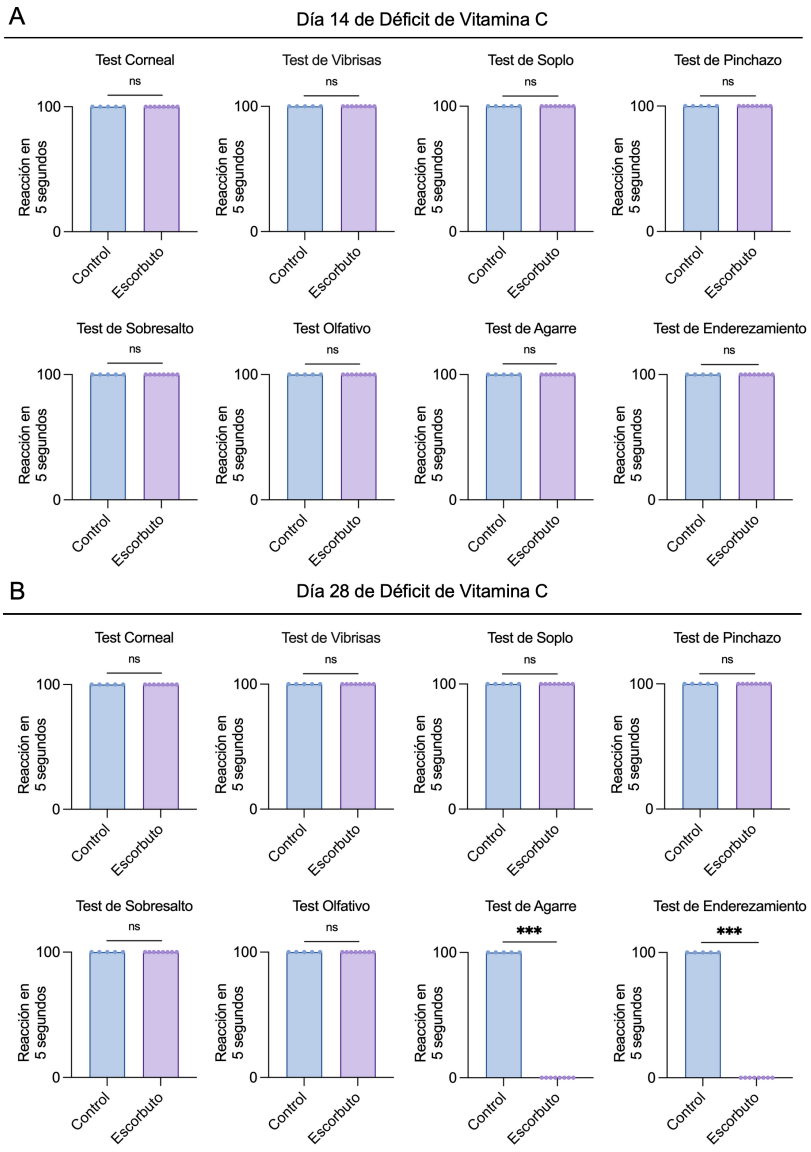


Figura 6. Evaluación de reflejos sensoriales y motores en cobayos control y escorbúticos.

Evaluación de pruebas neurológicas sensoriales y motoras a los 14 **(A)** y 28 **(B)** días, en animales control y con déficit de vitamina C. Para cada prueba se asignó un puntaje de desempeño, considerando un valor de 100 para los animales capaces de completar las pruebas dentro de un tiempo máximo de 5 segundos, y un puntaje de 0 para los animales

que no realizaron la prueba en el tiempo asignado. Para esta evaluación se consideró un n=5 y un n=8 para los cobayos control y escorbúticos, respectivamente. El análisis cuantitativo se realizó utilizando la prueba exacta de Fisher. Con ***p<0,001; ns = no significativo.

En conjunto, estas observaciones demostraron que el déficit de vitamina C en el cobayo induce una disminución del peso corporal, del consumo de alimento y de la frecuencia respiratoria a partir del 21 día de tratamiento. Asimismo, las evaluaciones neurológicas mostraron que las funciones sensoriales se conservan en el escorbuto. Sin embargo, en estos animales, se observa una pérdida de reflejos motores en las pruebas de agarre y enderezamiento. Estos resultados evidencian un deterioro de la función motora, que podría estar relacionado, en particular, con alteraciones en las regiones bulbares del sistema nervioso, asociadas a la deglución y a la función respiratoria.

6.1.2 Caracterización histológica de neuronas motoras en los núcleos craneales bulbares.

Los cobayos sometidos a déficit de vitamina C fueron eutanasiados una vez observado un deterioro significativo de su estado general, lo cual ocurrió aproximadamente a los días 28 o 30 de tratamiento. Se estima que, tras aproximadamente tres semanas de una dieta deficiente en vitamina C, los cobayos desarrollan un déficit prolongado de esta vitamina y presentan signos de

escorbuto. Con el objetivo de validar esta condición, se evaluó el contenido de glicógeno hepático, cuya disminución ha sido previamente reportada en condiciones de déficit prolongado de vitamina C (Shu et al., 2022). Para ello, se realizaron las tinciones histológicas de Ácido peryódico – Schiff (Tinción PAS) y Carmín de Best en muestras de hígado de cobayos control y escorbúticos.

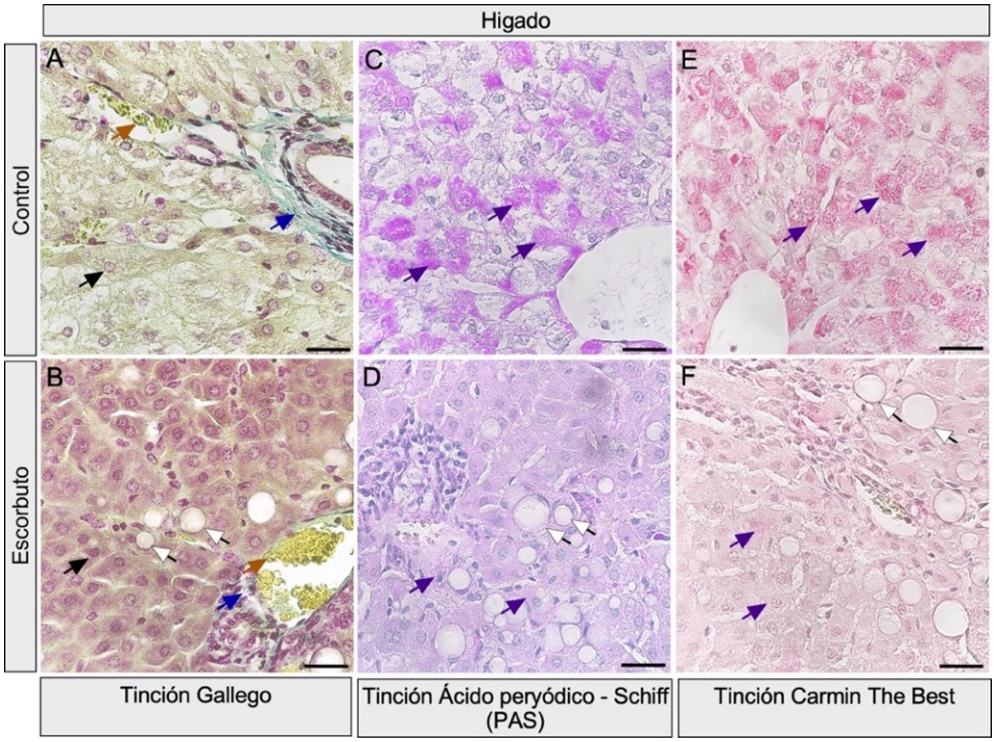


Figura 7. El escorbuto induce la depleción de glicógeno en el hígado.

En el tejido hepático de animales control y escorbúticos, la tinción de Gallego **(A,B)** permitió identificar la estructura general del tejido, incluyendo los hepatocitos (flecha negra), fibras de colágeno (flecha azul) y glóbulos rojos (flecha naranja). Mientras que las tinciones de Ácido peryódico – Schiff (PAS) **(C,D)** y Carmín de Best **(E,F)** permitieron evaluar la presencia de depósitos de glicógeno hepático (flecha morada). Además, en

las muestras escorbúticas se observaron vesículas lipídicas (flecha blanca). Para todos los análisis se consideró un n=3. Barra de tamaño: 50 μm.

Con este análisis se observó, en primer lugar, y utilizando la tinción tricrómica de Gallego, la morfología de los hepatocitos (flecha negra) y otras estructuras presentes en el tejido hepático, como los vasos sanguíneos donde se observó tinción para el colágeno (flecha azul) y glóbulos rojos (flecha naranja) (Figura 7A, B). Por otra parte, con las tinciones histológicas PAS y Carmín de Best, se observaron abundantes depósitos de glicógeno en los animales control, identificados por una intensa coloración morado-rosada (Figuras 7C, E), mientras que en los animales escorbúticos se observó una marcada disminución del contenido de glicógeno hepático (flecha morada) (Figuras 7D, F). Adicionalmente, en el tejido hepático de los animales escorbúticos se observaron múltiples acumulaciones o vesículas lipídicas (flechas blancas). En conjunto, estos resultados confirmaron el efecto de la dieta deficiente de vitamina C y el establecimiento del estado escorbútico en los animales experimentales.

Una vez establecida la condición escorbútica, se procedió a evaluar el tejido nervioso utilizando la tinción histológica de Hematoxilina y Cromotropo (H&C). En una primera aproximación, se analizaron cortes sagitales que permitieron evaluar las distintas zonas de la corteza cerebral (externa y motora), el tronco encefálico y la médula espinal.

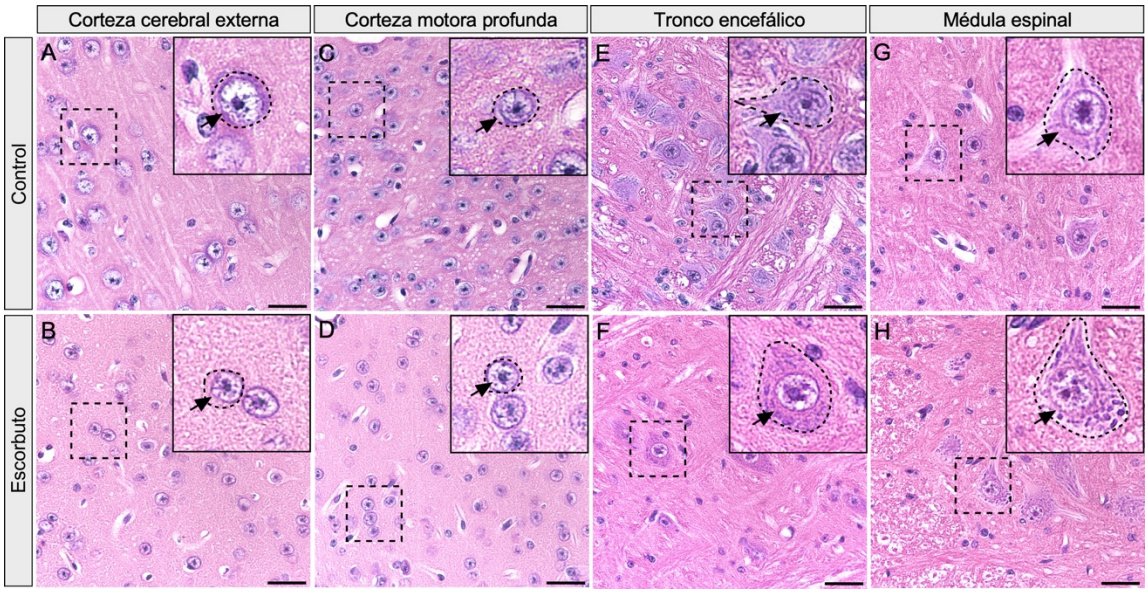


Figura 8. Las neuronas motoras presentaron una morfología neuronal clásica con cuerpos de Nissl evidentes, preferentemente en neuronas del tronco encefálico y la médula espinal.

Tinción de hematoxilina y cromotropo para analizar la morfología de las neuronas (flechas negras) presentes en la corteza cerebral externa **(A,B)**, corteza motora profunda **(C,D)**, tronco encefálico **(E,F)** y médula espinal **(G,H)** en muestras de cobayos control y escorbúticos. Los cuerpos neuronales se delimitaron con una línea punteada. Para todos los análisis se consideró un n=3. Barra de tamaño: 50 μm.

Las neuronas presentaron una morfología convencional, mostrando somas con núcleos esféricos, eucromáticos y con un nucléolo muy positivo a hematoxilina (Figura 8). En las neuronas con somas de mayor tamaño se observaron cuerpos de Nissl, correspondientes a acúmulos de RE y ribosomas. Se observó que algunas de estas neuronas, provenientes de animales escorbúticos, presentaron

una mayor granulación o agregación de estas estructuras (Figuras 8F, H, flechas negras), lo cual fue particularmente evidente en las neuronas del tronco encefálico y de la médula espinal.

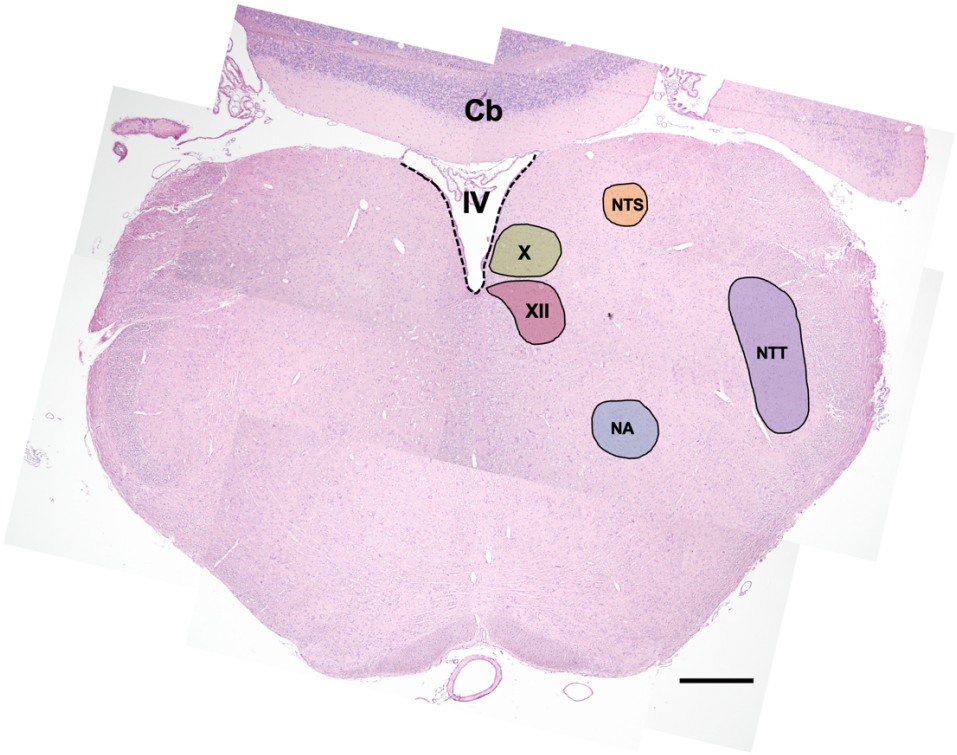


Figura 9. Localización de los núcleos neuronales craneales en el bulbo raquídeo del cerebro de cobayo.

Corte frontal de cerebro de cobayo teñido con hematoxilina y cromotropo. Se observa la región del bulbo raquídeo, totalmente reconstruida a partir de imágenes obtenidas con un microscopio óptico. Se destaca la localización de los núcleos hipogloso (XII), dorsal del vago (X), del tracto solitario (NTS), espinal del nervio trigémino (NTT) y ambiguo (NA). Además, podemos observar el IV ventrículo (IV), las células ependimarias (línea punteada) y el cerebelo (Cb). Barra de tamaño: 500 μm.

A continuación, la tinción de H&C nos permitió definir la localización de diferentes núcleos neuronales en cortes coronales de bulbo raquídeo, lo cual fue corroborado con el mapa estereotáxico de bulbo raquídeo de cobayo descrito por Voitenko y Marlinsky (1993). De esta forma, se definió la ubicación de los núcleos hipogloso (XII), dorsal del vago (X), del tracto solitario (NTS), espinal del trigémino (NTT) y ambiguo (NA), asociados a la formación de los nervios craneales glosofaríngeo, vago e hipogloso, los cuales se ven afectados en la enfermedad motora bulbar (Figura 9) (Voitenko & Marlinsky, 1993). No obstante, el NA fue analizado parcialmente debido a la pérdida de tejido durante la disección del cerebro.

Las neuronas presentes en los núcleos analizados mostraron una morfología conservada (Figura 10, flechas negra), con cuerpos celulares bien definidos y sin diferencias morfológicas evidentes entre ambas condiciones. Sin embargo, en las muestras escorbúticas se observó una disminución del número de neuronas. En las muestras control, el número promedio de neuronas fue de 32,7 $\pm$ 2,1 en el núcleo hipogloso, 41,3 $\pm$ 2,9 en el núcleo dorsal del vago, 38 $\pm$ 3,5 en el núcleo del tracto solitario y 22 $\pm$ 3 en el núcleo espinal del trigémino. Mientras que, en las muestras escorbúticas, los valores promedio obtenidos fueron de 30 $\pm$ 3,6 neuronas en el núcleo hipogloso, 31,7 $\pm$ 3,2 neuronas en el núcleo dorsal del vago, 28,3 $\pm$ 4 neuronas en el núcleo del tracto solitario y 20,7 $\pm$ 2,1 neuronas en el núcleo espinal del trigémino.

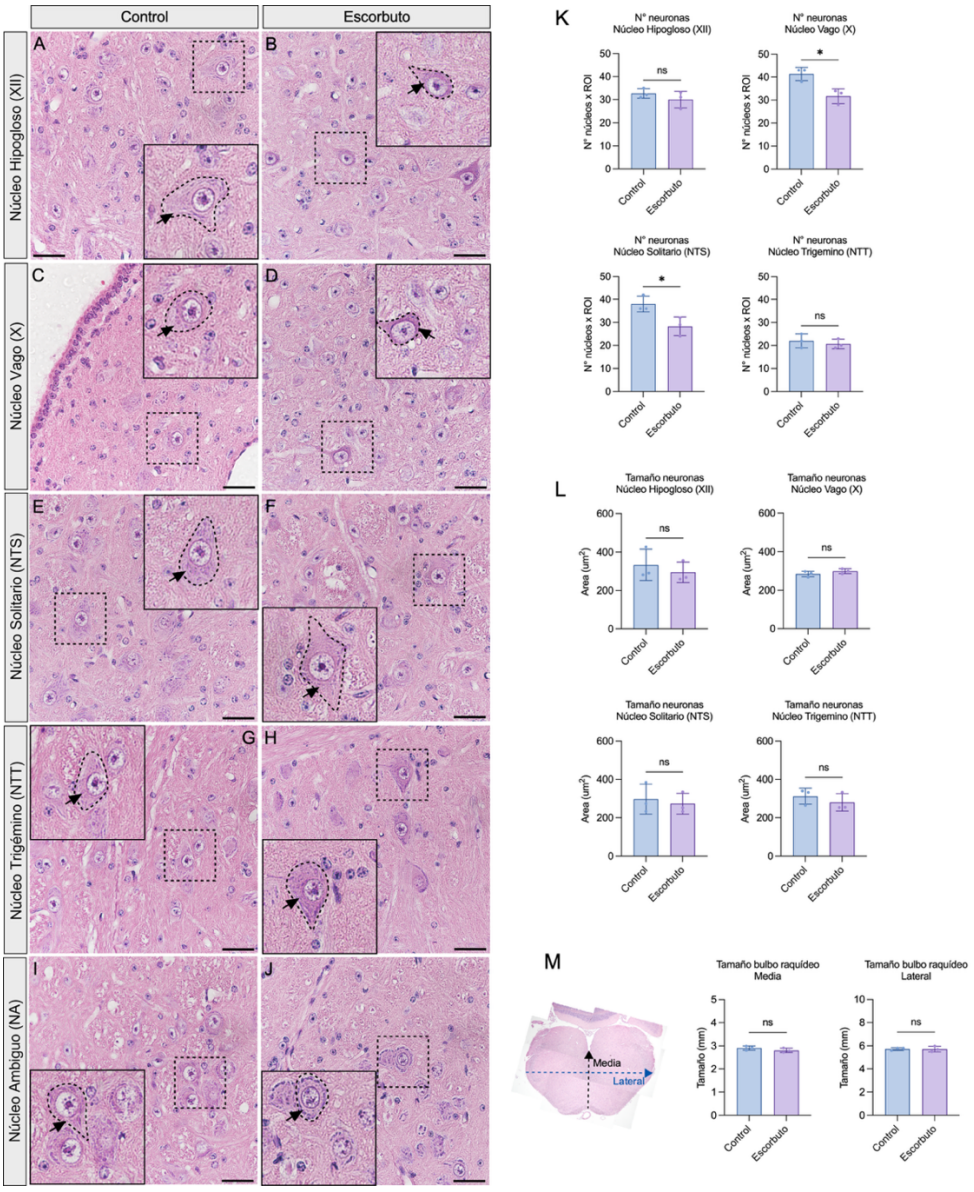


Figura 10. El análisis histológico en el bulbo raquídeo evidenció una disminución neuronal en los núcleos dorsal del vago y del tracto solitario, de los animales escorbúticos.

Mediante la tinción de Hematoxilina y Cromotropo se evaluó la morfología de las neuronas (flecha negra) en los núcleos craneales hipogloso **(A,B)**, vago **(C,D)**, solitario **(E,F)**, espinal del trigémino **(G,H)** y ambiguo **(I,J)** del bulbo raquídeo. Barra de tamaño:

50 μm. **(K)** Análisis cuantitativo del número de neuronas, en una región de interés (ROI) de 360 x 240 μm. **(L)** Análisis cuantitativo del tamaño del soma neuronal medido en área (μm^2). **(M)** Cuantificación de las dimensiones medial y lateral de los bulbos raquídeo. Los datos se presentaron como media $\pm$ SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; ns = no significativo.

Comparando ambos grupos experimentales, el análisis cuantitativo mostró una disminución significativa en el número de neuronas presentes en los núcleos dorsal del vago y del tracto solitario (Figura 10K). Asimismo, se evaluó el tamaño de las neuronas mediante la medición del área del soma celular, mas no se determinaron diferencias entre las neuronas de las muestras control y escorbúticas (Figura 10L). De manera adicional, se evaluó el tamaño del bulbo raquídeo en los ejes lateral y medial con el objetivo de determinar posibles diferencias, considerando las variaciones en el peso corporal entre los animales control y escorbúticos. Sin embargo, no se observaron diferencias en el tamaño del bulbo raquídeo entre ambos grupos experimentales (Figura 10M).

Por otra parte, se realizó un análisis inmunohistoquímico para caspasa-3 clivada y MLKL, ambos marcadores asociados a muerte celular. No obstante, no se detectó inmunotinción para ninguno de los marcadores tanto en las muestras control como escorbúticas (Anexo Figura suplementaria 1).

Finalmente, en esta primera etapa, se realizó un análisis inmunohistoquímico para tubulina-βIII, una proteína estructural que forma parte de los microtúbulos neuronales, con el objetivo de identificar posibles alteraciones en la organización y estructura del citoesqueleto generadas por el déficit de vitamina C. El análisis mostró una disminución en la intensidad de tinción para tubulina-βIII en los somas de las neuronas escorbúticas en todos los núcleos analizados (Figura 11B, D, F, H). Sin embargo, solo se obtuvo significancia estadística en las neuronas del núcleo hipogloso y dorsal del vago (Figura 11I).

En conjunto, estos resultados mostraron que la deficiencia de vitamina C genera una disminución en el número de neuronas en los núcleos dorsal del vago y del tracto solitario. Subcelularmente, se observaron cambios en la estructura de los cuerpos de Nissl y en el contenido de tubulina-βIII, lo que podría comprometer la estructura del citoesqueleto neuronal. De esta forma, los análisis realizados sugieren que el déficit de vitamina C podría afectar de manera diferencial los núcleos neuronales bulbares. En particular, las alteraciones observadas en el núcleo vago y del tracto solitario podrían comprometer funciones asociadas a sus actividades motoras y parasimpáticas, incluyendo la inervación de estructuras involucradas en la deglución y respiración (laringe y faringe), así como funciones cardiorrespiratorias. De esta manera, se puede generar un desbalance sensitivo y motor bajo las condiciones de escorbuto.

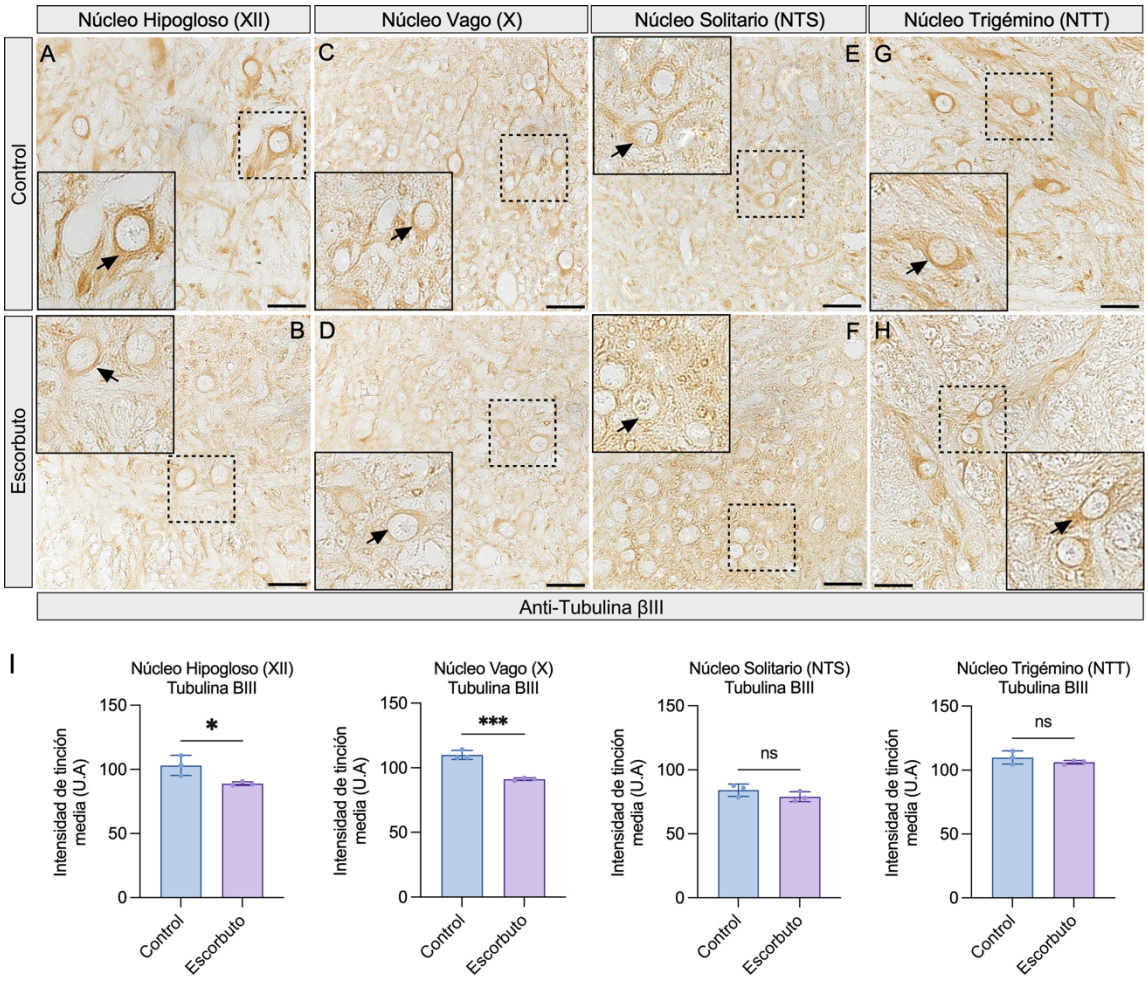


Figura 11. El escorbuto induce una disminución en la inmunoreactividad para tubulina-*β*III, fundamentalmente en neuronas del núcleo hipogloso y dorsal vago.

Análisis inmunohistoquímico con tubulina-βIII en los núcleos craneales hipogloso **(A,B)**, vago **(C,D)**, solitario **(E,F)** y espinal del trigémino **(G,H)**, donde se observó una disminución en la inmunoreactividad de las neuronas escorbúticas (flecha negra). Barra de tamaño: 50 µm. **(I)** Análisis cuantitativo de la intensidad de tinción media para tubulina-βIII. Los datos se presentaron como la media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. *p<0,05, ***p<0,001; ns, no significativo.

6.1.3 Evaluación de la distribución de los cuerpos de Nissl (acúmulos de retículo endoplasmático y ribosomas) y estructuras subcelulares en neuronas motoras escorbúticas.

El desequilibrio en la homeostasis del RE es una afectación recurrente ante el daño oxidativo en las neuronas. Como una primera aproximación para evaluar el RE, se analizó la sustancia de Nissl en las neuronas de la corteza cerebral externa (Figura 12A, B), corteza motora interna (Figura 12C, D), tronco encefálico (Figura 12E, F) y de la médula espinal (Figura 12G, H), utilizando la tinción histológica de Nissl.

En las muestras control, la sustancia de Nissl presentó una amplia distribución en el citoplasma neuronal, mostrando un aspecto granular característico en todas las neuronas de los tejidos control, siendo este patrón menos evidente en las neuronas de la corteza motora interna (Figura 12A, C, E, G). Al analizar las neuronas de los animales escorbúticos, no se observaron mayores cambios en la corteza externa (Figura 12B), mientras que en la corteza motora se detectó una marcada disminución de la tinción (Figura 12D). Además, se observó una respuesta heterogénea en las neuronas del tronco encefálico, donde algunas de estas neuronas presentaron acúmulos de cuerpos de Nissl en la región periférica del soma (Figura 12F, flechas blancas). Finalmente, detectamos un aumento de la agregación de cuerpos de Nissl en neuronas motoras del asta ventral de la médula espinal (Figura 12H).

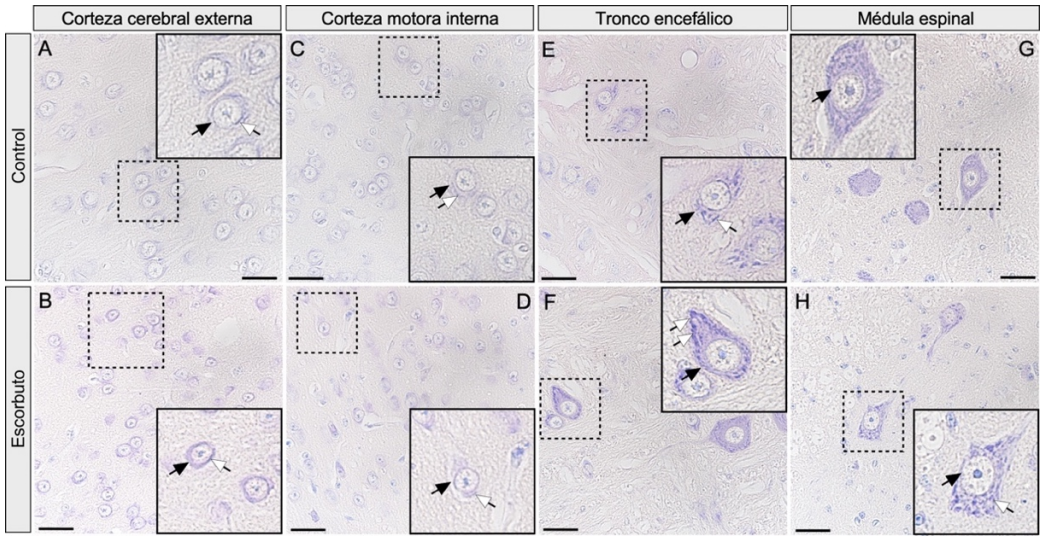


Figura 12. El análisis de Nissl evidenció una distribución periférica heterogénea y una mayor agregación en las neuronas del tronco encefálico y la médula espinal.

Mediante la tinción de Nissl se evaluó y comparó la morfología de las neuronas (flecha negra) y la distribución de la sustancia de Nissl (flecha blanca) en la corteza cerebral externa **(A,B)**, corteza motora interna **(C,D)**, tronco encefálico **(E,F)** y la médula espinal **(G,H)**, entre muestras de cobayo control y escorbúticas. Para todos los análisis se consideró un n=3. Barra de tamaño: 50 μm.

Dada la heterogeneidad observada en la distribución de la tinción de Nissl en las neuronas del tronco encefálico, a continuación se evaluaron las neuronas de los diferentes núcleos bulbares. El análisis mostró en el núcleo hipogloso (Figura 13A, B), dorsal del vago (Figura 13C, D) y del tracto solitario (Figura 13E, F), una menor cantidad de neuronas con cuerpos de Nissl positivos en los tejidos escorbúticos, mientras que en el núcleo espinal del trigémino no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Figura 13G, H).

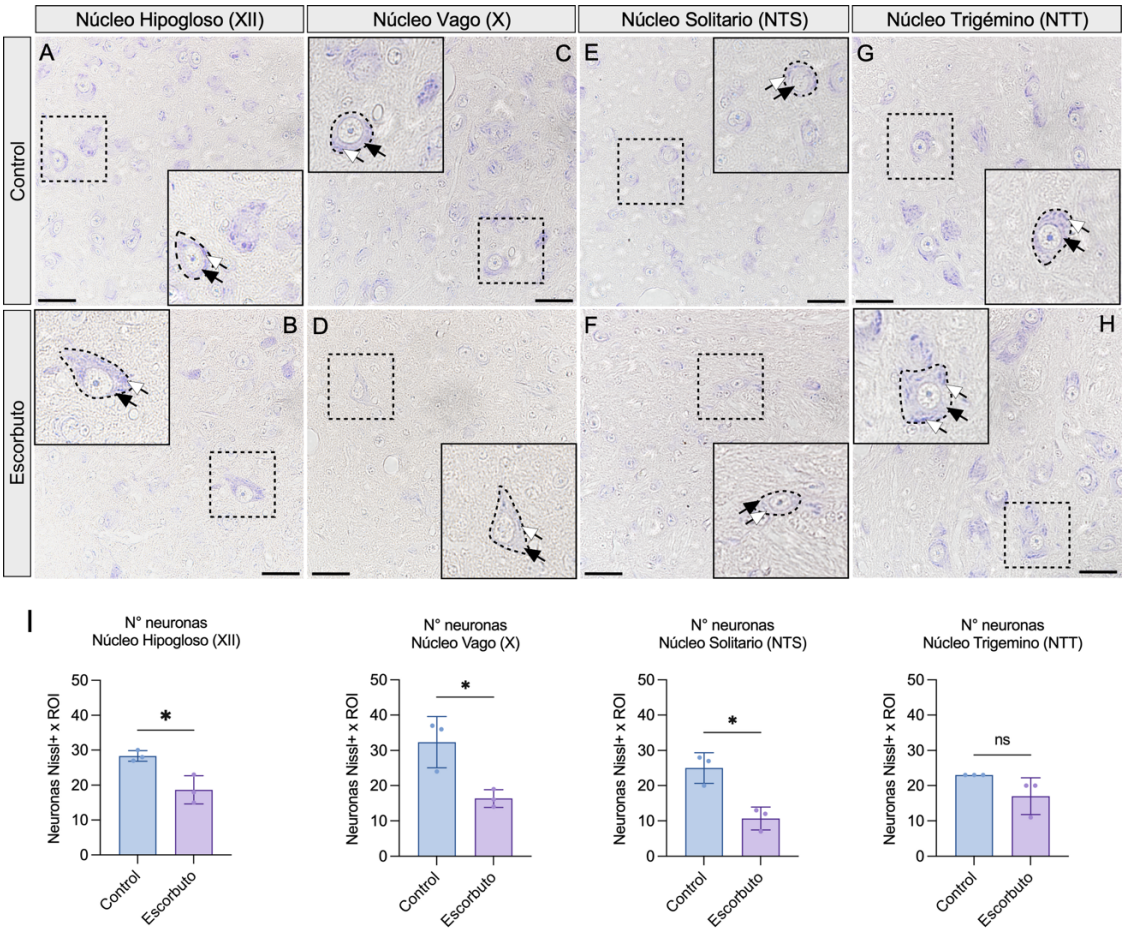


Figura 13. Los cuerpos de Nissl presentaron escasa tinción en neuronas especificas del bulbo raquídeo de cobayos escorbúticos.

Mediante la tinción de Nissl se observó la morfología de neuronas (flecha negra) y la sustancia de Nissl (flecha blanca) en los núcleos craneales hipoglosos **(A,B)**, vago **(C,D)**, solitario **(E,F)** y espinal del trigémino **(G,H)**. Barra de tamaño: 50 μm. **(I)** Análisis cuantitativo del número de neuronas Nissl positivas, en una región de interés (ROI) de 360 x 240 μm. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; ns = no significativo.

Los resultados obtenidos mediante la tinción de Nissl sugieren que la deficiencia de vitamina C induce alteraciones en la organización del RE, lo que podría favorecer la acumulación de proteínas sintetizadas en esta organela. Para evaluar esto de manera más directa, los tejidos fueron analizados mediante el anticuerpo KDEL, un péptido señal presente en las proteínas residentes del RE, las cuales pueden ser transportadas desde el RE hacia el aparato de Golgi y, posteriormente, recuperadas hacia el RE mediante el reconocimiento de la secuencia KDEL. Por lo tanto, una alteración de este mecanismo podría provocar la acumulación de proteínas en el RE.

En primer lugar, se realizó un análisis inmunohistoquímico en muestras de corteza motora (Figura 14A, B), tronco encefálico (Figura 14C, D) y la médula espinal (Figura 14E, F). En las neuronas de control, la tinción para KDEL se observó distribuida de manera relativamente homogénea en los somas neuronales. Por otro lado, en las muestras escorbúticas, particularmente en las neuronas del tronco encefálico y de la médula espinal, se observaron granulaciones compactas e intensamente positivas para KDEL distribuidas en el soma (flechas blancas), las cuales fueron escasas o estuvieron ausentes en las muestras control. De acuerdo con estas observaciones, se realizó un análisis cuantitativo de intensidad de tinción, con el que se determinó un incremento para KDEL en las tres regiones analizadas (Figura 14G).

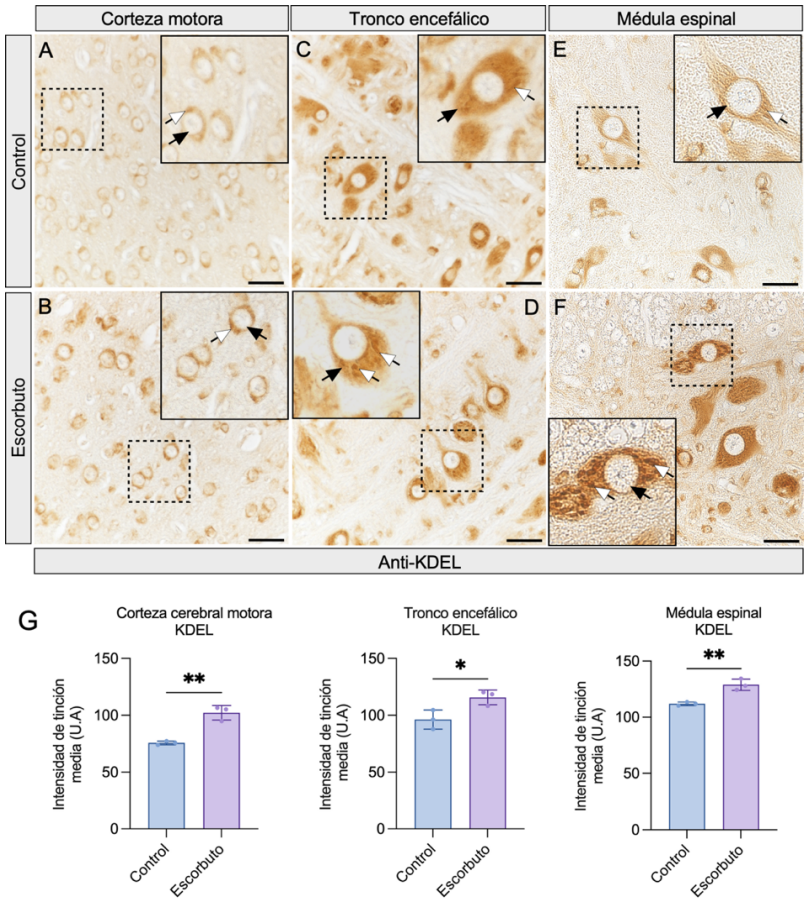


Figura 14. El análisis inmunohistoquímico con KDEL mostró un incremento de tinción en neuronas de la corteza motora, el tronco encefálico y la médula espinal de cobayos escorbúticos.

Análisis inmunohistoquímico con el marcador KDEL en corteza cerebral motora **(A,B)**, tronco encefálico **(C,D)** y médula espinal **(E,F)**. Se observó un incremento de marcaje en neuronas escorbúticas (flecha negra) y la presencia de granulaciones KDEL positivas (flecha blanca). Barra de tamaño: 50 μm **(G)** Análisis cuantitativo de intensidad de tinción media para KDEL. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; **p<0,01.

Paralelamente, se realizó un análisis complementario de inmunofluorescencia utilizando los marcadores reticulares, Calnexina y PDI, ambas proteínas chaperonas residentes del RE (Anexo Figura suplementaria 2). Sin embargo, la tinción para estos marcadores se observó únicamente en la médula espinal. Este análisis mostró un incremento de tinción para Calnexina en las neuronas escorbúticas, observándose un marcaje homogéneo en el soma neuronal. Por otro lado, PDI presentó tinción principalmente en la sustancia blanca, posiblemente asociada a estructuras axonales o gliales. Si bien este análisis no permitió evaluar las demás regiones de interés, evidenció diferencias en la tinción con marcadores de RE en las neuronas espinales escorbúticas.

A continuación, se evaluó la inmunotinción para KDEL en las neuronas de los núcleos craneales hipogloso (Figura 15A, B), dorsal del vago (Figura 15C, D), del tracto solitario (Figura 15E, F) y espinal del trigémino (Figura 15G, H). En las neuronas control, se observó nuevamente un patrón de tinción homogéneo para KDEL en el soma neuronal. Por otra parte, en las neuronas escorbúticas se detectó un leve incremento de la intensidad de la tinción y, de manera similar a lo observado previamente en el análisis del tronco encefálico, algunas neuronas presentaron granulaciones citoplasmáticas intensamente positivas para el marcador, lo cual fue particularmente evidente en las neuronas del núcleo espinal del trigémino (Figura 15H, flechas blancas). De manera consistente, la

cuantificación de la intensidad de tinción de KDEL mostró un aumento significativo del marcador en todos los núcleos analizados (Figura 15I).

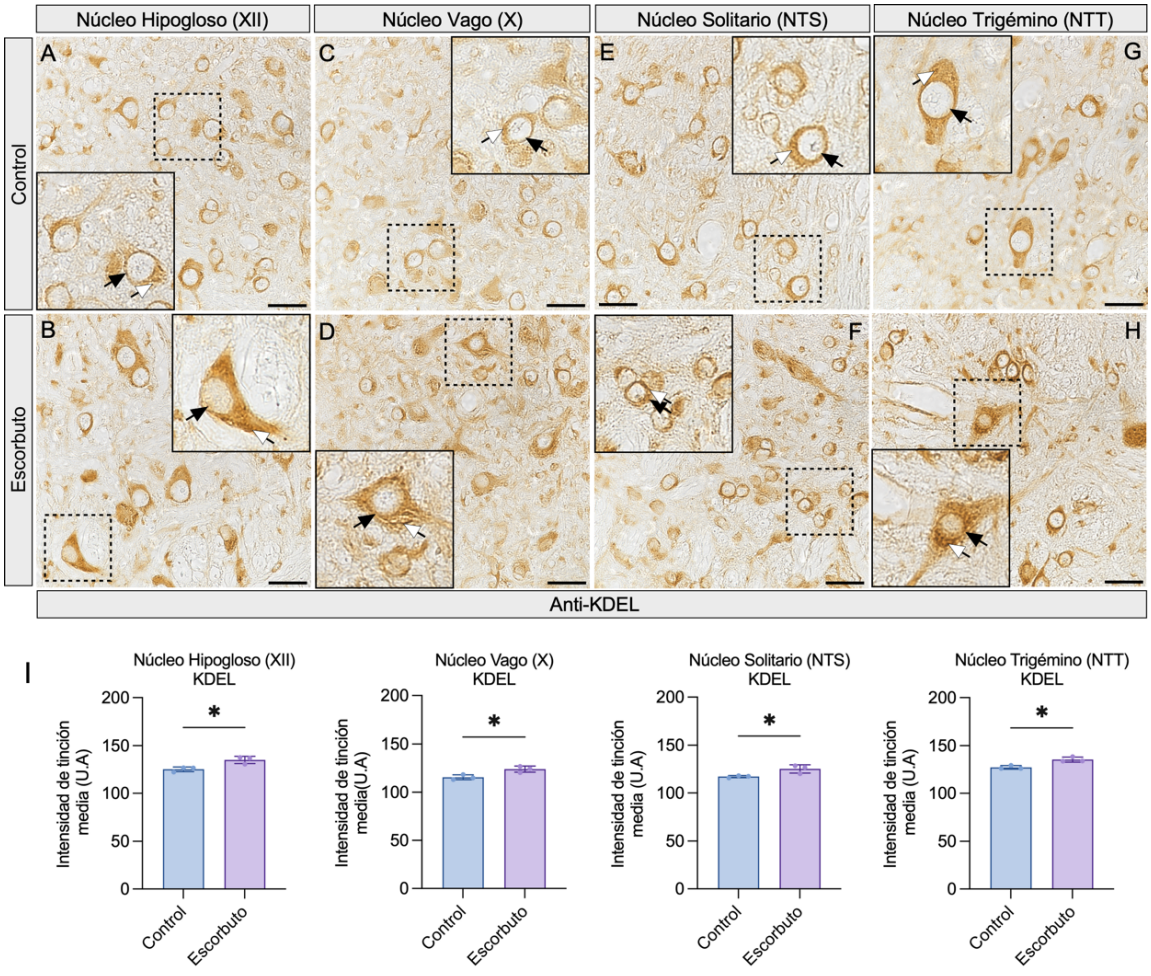


Figura 15. El análisis inmunohistoquímico con KDEL en bulbo raquídeo evidenció un aumento de tinción en neuronas en los núcleos craneales de los cobayos escorbúticos.

Análisis inmunohistoquímico con el marcador KDEL en los núcleos craneales hipogloso **(A,B)**, dorsal del vago **(C,D)**, del tracto solitario **(E,F)** y espinal del trigémino **(G,H)**, se

observaron neuronas (flecha negra) y granulaciones KDEL positivas (flecha blanca). Barra de tamaño: 50 μm. **(I)** Análisis cuantitativo de intensidad de tinción media para KDEL. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05.

Con el fin de caracterizar la presencia de acumulaciones de RE en planos focales únicos, realizamos un análisis de inmunofluorescencia para KDEL mediante microscopía confocal en los núcleos bulbares. En las muestras control, se observaron numerosas neuronas positivas para el marcador, donde la mayoría de ellas presentó una tinción distribuida de manera uniforme en el citoplasma del soma neuronal. Por otro lado, en las muestras escorbúticas, las neuronas mostraron un incremento en la intensidad de tinción de KDEL (16B, D, F, H, flechas blancas). Además, en el núcleo trigémino se observaron algunas neuronas que presentaron acúmulos de Nissl intensamente positivos para KDEL y una localización citosólica periférica (Figura 16H). El análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia determinó un incremento de la señal de KDEL en los núcleos hipogloso, dorsal del vago y solitario. Sin embargo, el núcleo espinal del trigémino no presentó diferencias significativas respecto a las muestras control (Figura 16I).

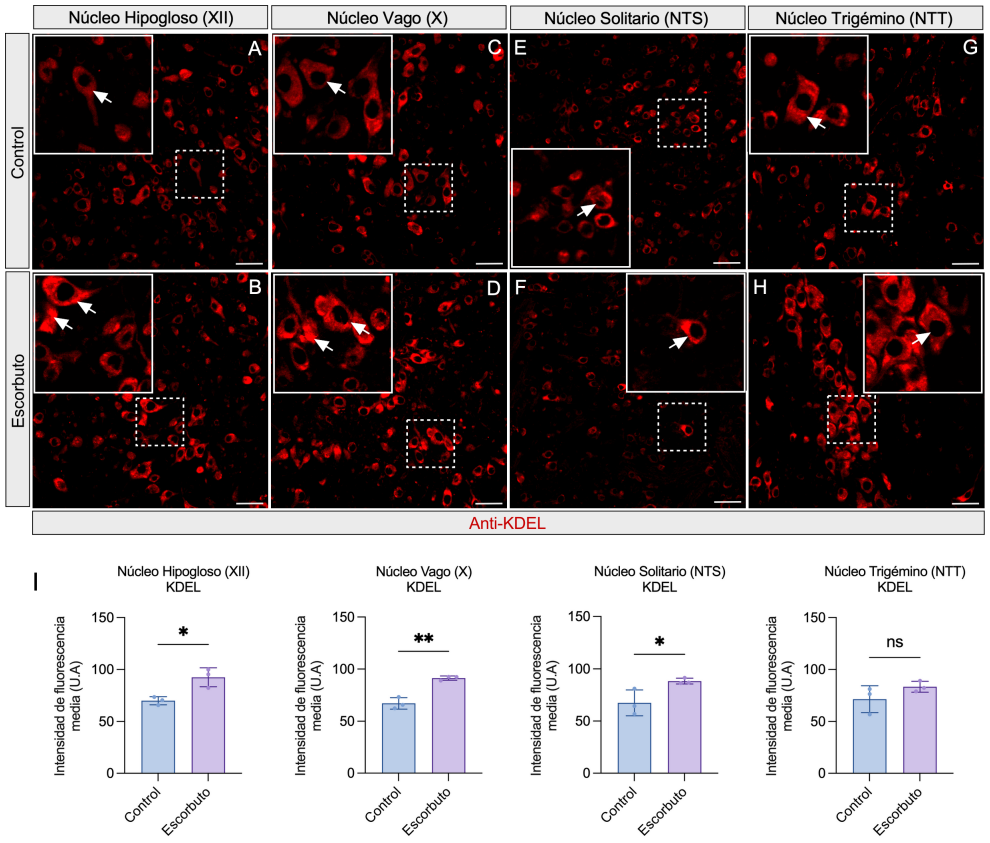


Figura 16. El análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal determinó un incremento de intensidad para KDEL en diferentes núcleos del bulbo raquídeo de cobayos escorbúticos.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador KDEL (rojo) en los núcleos craneales hipogloso **(A,B)**, dorsal del vago **(C,D)**, del tracto solitario **(E,F)** y espinal del trigémino **(G,H)**. Se observaron múltiples neuronas KDEL positivas (flecha blanca) y un incremento de intensidad de tinción para las muestras escorbúticas. Barra de tamaño: 20 μm. **(I)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para KDEL. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; **p<0,01; ns = no significativo.

El incremento de la tinción para KD222EL podría ser indicativo de una acumulación de proteínas residentes del RE, lo que sugiere una alteración en la homeostasis de este organelo. En este contexto, con el objetivo de caracterizar a nanoescala los cambios estructurales observados en el RE, se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Este análisis permitió evaluar la organización del soma neuronal, con énfasis en la distribución y morfología del RE, los ribosomas, las vesículas, las mitocondrias y otras estructuras subcelulares.

En primer lugar, se evaluó la ultraestructura de las neuronas de la corteza cerebral. En las muestras control, las neuronas presentaron una organización intracelular conservada (Figura 17A), caracterizada por un RE organizado en cisternas apiladas, con ribosomas asociados a su superficie, una morfología clásica de los cuerpos de Nissl (Figura 17B). También se observaron mitocondrias alargadas, sin deformaciones ni daño de sus crestas, distribuidas en el citoplasma neuronal (Figura 17C). Por otra parte, en las muestras escorbúticas (Figura 17D), se observó un RE desagrupado y algunas estructuras reticulares en regiones periféricas del soma neuronal, próximas a la membrana plasmática (Figura 17E, flechas blancas). Adicionalmente, no se observaron mitocondrias alargadas, lo que podría sugerir un proceso de fisión mitocondrial. Sin embargo, no es posible descartar que esta observación esté condicionada a los planos de corte analizados (Figura 17F).

Posteriormente, analizamos el bulbo raquídeo mediante TEM. En las muestras de control, las neuronas bulbares presentaron núcleos voluminosos con nucléolos electrodensos y un citoplasma con un RE organizado en cisternas paralelas, característico de los cuerpos de Nissl (Figura 18B). El contenido mitocondrial fue menor que el observado en la corteza cerebral y, en general, detectamos mitocondrias de características esféricas. En asociación a estas neuronas observamos núcleos de células gliales. Además, se observaron numerosos axones que presentaban una vaina de mielina de aspecto compacto y uniforme (Figuras 18C y 18D).

Por el contrario, al observar las muestras provenientes de cobayos escorbúticos, detectamos neuronas con una organización intracelular alterada (Figura 18E). El RE presentó una distribución menos organizada y un evidente agrandamiento de las cisternas reticulares, con una apariencia dilatada (Figura 18F, asteriscos). Además, se observaron múltiples mitocondrias de pequeño tamaño distribuidas en el citoplasma neuronal (marcadas en rojo). Algunas de ellas se encontraban rodeadas por estructuras de doble membrana, sugerentes de un proceso de mitofagia (Figura 18G, flechas blancas). Finalmente, se observaron los axones neuronales, cuya mielina presentó discontinuidades y zonas de separación en su estructura, perdiendo el patrón compacto y uniforme observado en las muestras de control (Figura 18H, flechas blancas).

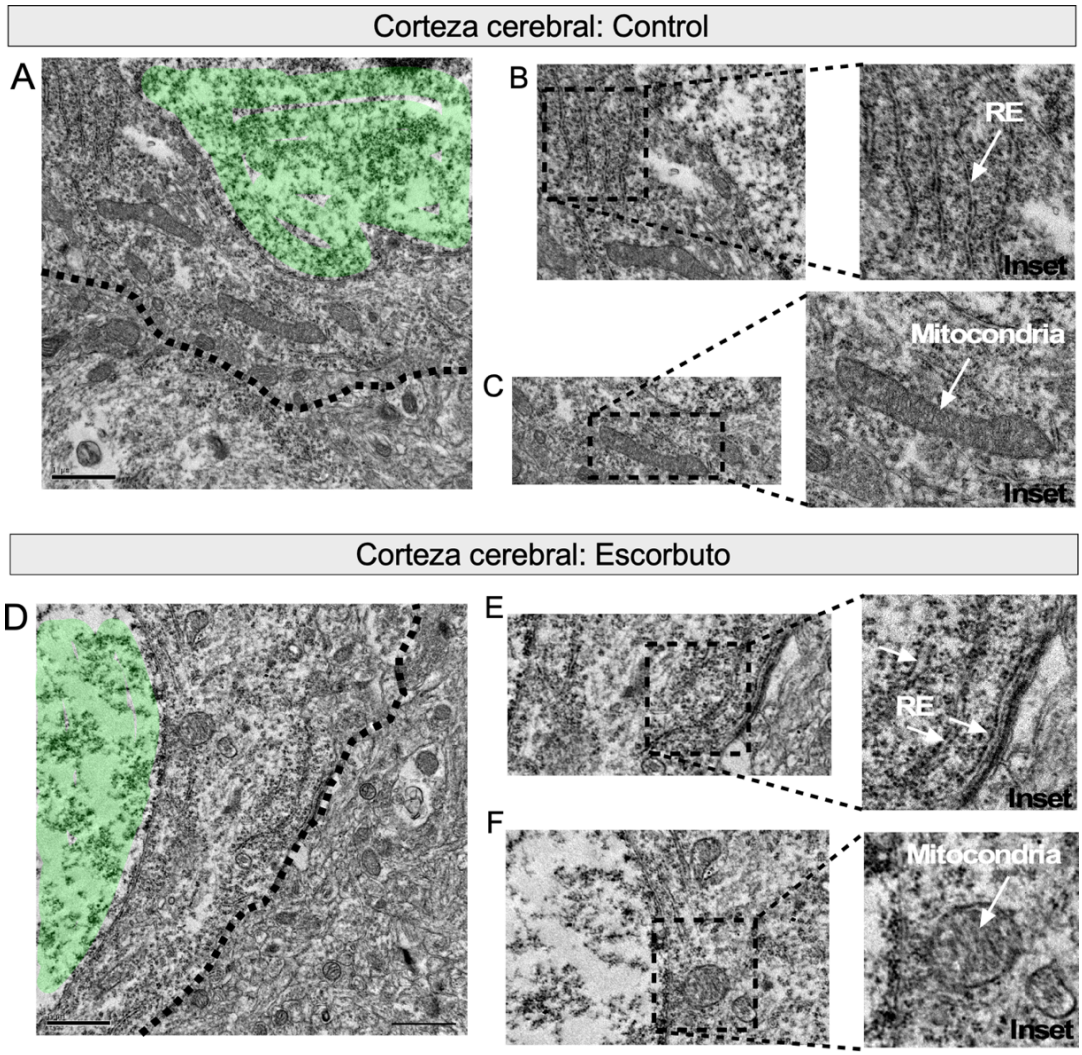


Figura 17. El análisis ultraestructural evidenció alteraciones en el RE de neuronas de la corteza cerebral de cobayos escorbúticos.

Análisis por microscopía electrónica de transmisión de cortes de corteza cerebral de cobayos control **(A)** y escorbúticos **(D)**. Análisis de cortes de 60 nm tratados con tetróxido de osmio y contrastados con acetato de uranilo. Los núcleos neuronales se marcaron digitalmente en verde y el límite celular se delimito con una línea punteada. Se observaron estructuras subcelulares como el RE **(B,E)**, mitocondrias **(C,F)** y cuerpos lisosomales **(E)**. Barra de tamaño: 1 μm.

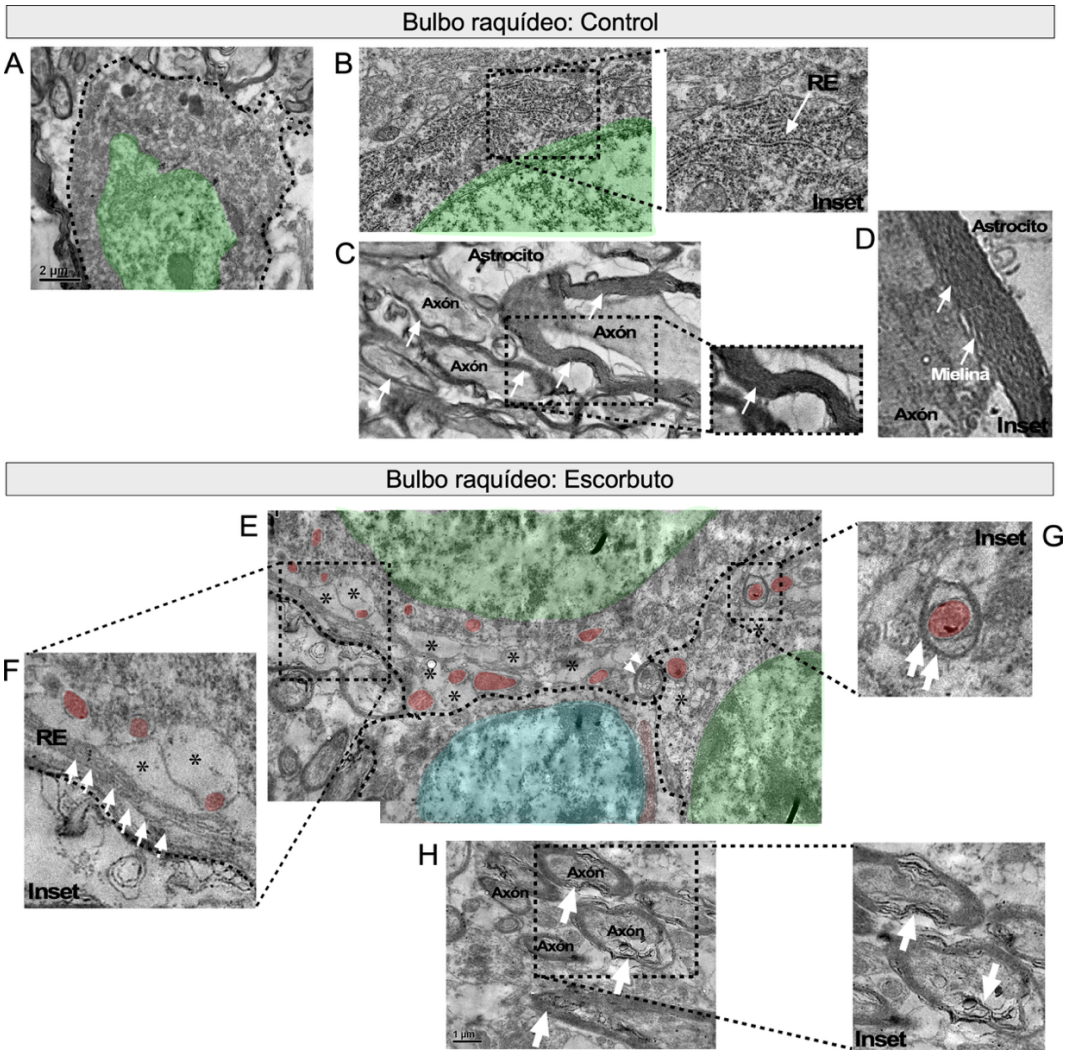


Figura 18. El escorbuto induce alteraciones en el RE, mitocondrias y la vaina de mielina en neuronas del bulbo raquídeo.

Análisis por microscopía electrónica de transmisión en bulbo raquídeo de cobayos control **(A)** y escorbúticos **(D)**. Los núcleos neuronales se marcaron en verde, mientras que los astrociticos en celeste. El límite celular se delineó con una línea punteada. Se observaron estructuras como el RE, el cual se observó dilatado en escorbuto (*) **(B, F)**, mitocondrias de pequeño tamaño (marcadas en rojo), algunas con doble membrana **(G),** y axones mielinizados **(C, D, H)**. Barra de tamaño: 1 μm.

La microscopía electrónica evidenció que las alteraciones observadas en las neuronas bulbares escorbúticas no se restringieron al RE, sino que también se observaron en las mitocondrias, organelos particularmente susceptibles a alteraciones del equilibrio redox celular. Con el objetivo de evaluar posibles alteraciones asociadas a la mitocondria, se realizó un análisis de inmunotinción para DRP1, una proteína dinamina involucrada en la regulación de la fisión mitocondrial, en conjunto con el anticuerpo VDAC (Canal Aniónico Dependiente de Voltaje), marcador de la membrana externa de la mitocondria, y CHAT (colina acetiltransferasa), utilizado como marcador neuronal.

En las muestras de control, se identificaron neuronas positivas para CHAT, con tinción localizada tanto en los somas como en los procesos neuronales, mientras que DRP1 y VDAC se localizaron predominantemente en los somas de las neuronas, observándose una colocalización parcial entre ambos marcadores (Figuras 19A, C y Figura 20A, C) (datos no mostrados para CHAT). Por otra parte, en las muestras escorbúticas, se observó, en los núcleos hipogloso (Figura 19B), dorsal vago (Figura 19D) y del tracto solitario (Figura 20B), un incremento y redistribución de la señal para DRP1 y VDAC hacia los procesos neuronales, donde ambos marcadores presentaron una tinción intensamente positiva y colocalizada, mientras que la señal en los somas fue escasa y prácticamente ausente (flechas blancas). Adicionalmente, se observaron acumulaciones focales e intensamente positivas a VDAC en algunos de estos procesos. En el núcleo

espinal del trigémino, se observó un incremento en la tinción para DRP1, sin cambios evidentes para el marcador VDAC, entre ambas condiciones experimentales (Figura 20C, D). El análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media determinó un incremento de la señal de DRP1 en todos los núcleos analizados, mientras que el marcador VDAC mostró un aumento de intensidad solo en los núcleos hipogloso, dorsal del vago y solitario (Figura 19E y Figura 20E). Por otro lado, el análisis de colocalización de Manders mostró un incremento de colocalización de DRP1 sobre VDAC en los procesos neuronales escorbúticos en todas las muestras analizadas (Figura 19F y Figura 20F).

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian alteraciones en la organización y homeostasis del RE neuronal asociadas al déficit de vitamina C. La redistribución y disminución de la sustancia de Nissl y el incremento de la inmunotinción para KDEL, junto con la desorganización y dilatación de las cisternas reticulares observadas mediante TEM, sugieren una alteración en el procesamiento y una posible acumulación de proteínas residentes del RE. Asimismo, la presencia de mitocondrias de menor tamaño y estructuras de doble membrana compatibles con procesos de mitofagia, junto con el incremento y redistribución de DRP1 y VDAC a los procesos neuronales, sugiere un proceso de fraccionamiento mitocondrial. Finalmente, en los axones neuronales, se observó que la vaina de mielina presentaba discontinuidades y pérdida de compactación en su estructura.

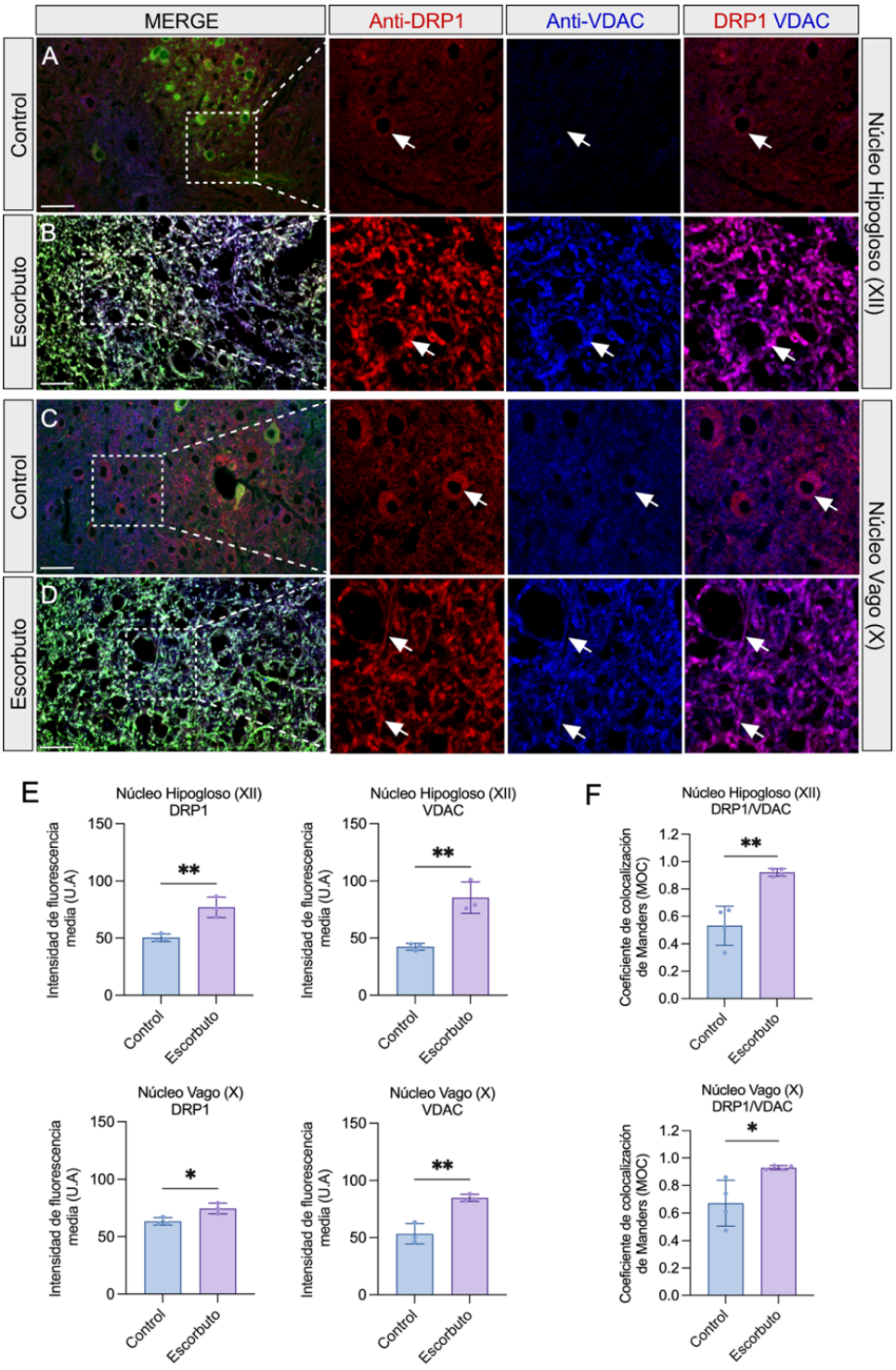


Figura 19. El escorbuto induce un incremento de DRP1 y VDAC en los procesos neuronales, en los núcleos hipogloso y dorsal del vago.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador CHAT (verde), DRP1 (rojo) y VDAC (azul) en los núcleos hipogloso **(A,B)** y dorsal del vago **(C,D)**. En las muestras escorbúticas, se observó un incremento de procesos intensamente positivos a DRP1 y VDAC (flecha blanca). Barra de tamaño: 20 μm. **(E)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para DRP1 y VDAC. **(F)** Análisis de colocalización de DRP1 sobre VDAC con el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Los datos se presentaron como media $\pm$ SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; **p<0,001.

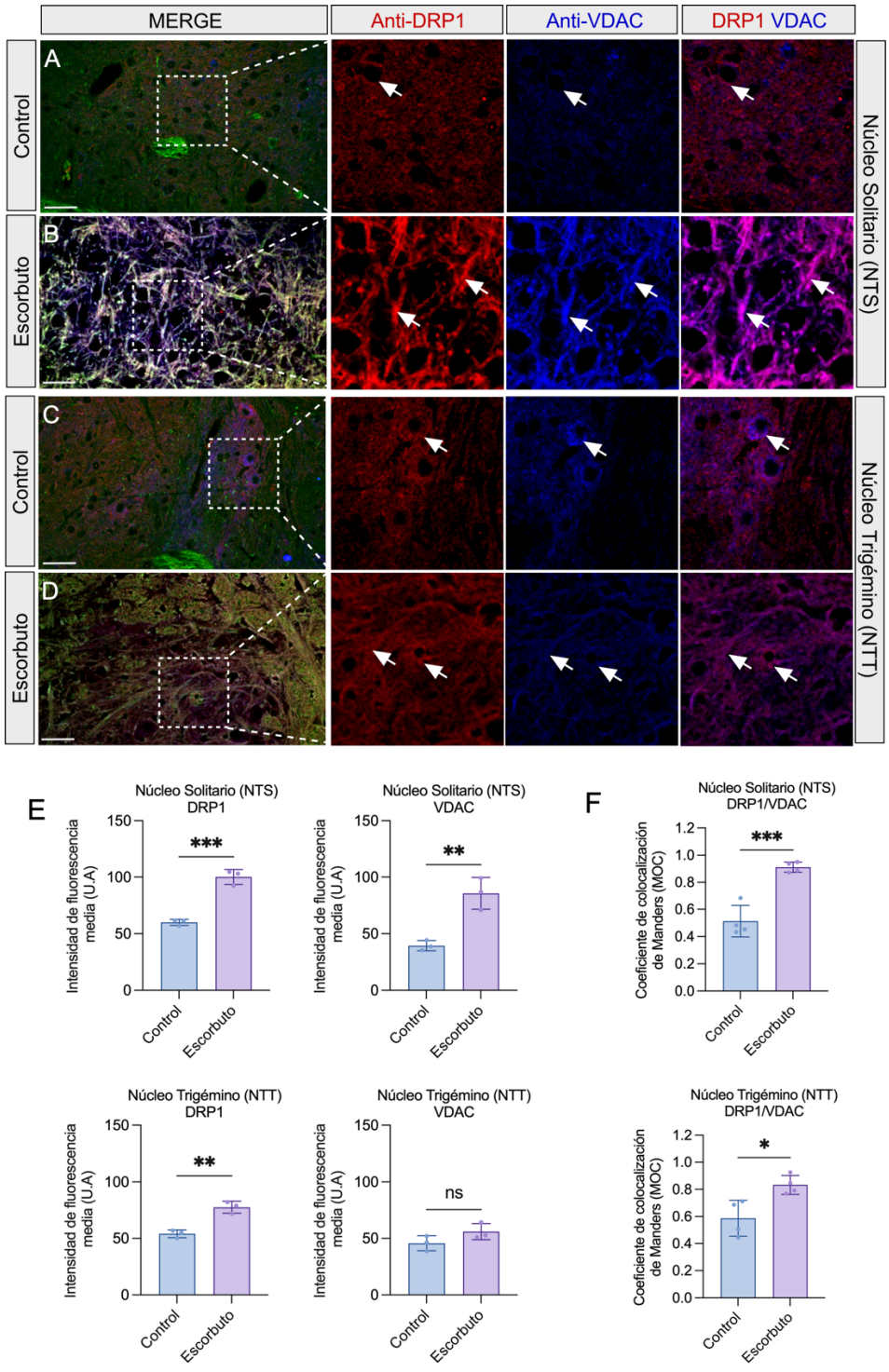


Figura 20. El escorbuto induce un incremento de DRP1 y VDAC en los procesos neuronales en el núcleo solitario.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador CHAT (verde), DRP1 (rojo) y VDAC (azul) en los núcleos solitario **(A,B)** y espinal del trigémino **(C,D)**. En las muestras escorbúticas, se observó un incremento de procesos intensamente positivos a DRP1 y VDAC (flecha blanca). Barra de tamaño: 20 μm. **(E)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para DRP1 y VDAC. **(F)** Análisis de colocalización de DRP1 sobre VDAC con el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; **p<0,001, ***p<0,0001; ns = no significativo.

6.1.4 Evaluación de la respuesta astrocítica en cobayos escorbúticos.

Los astrocitos desempeñan funciones esenciales, como el soporte estructural y metabólico de las neuronas, y participan activamente en las respuestas frente a un daño en el tejido nervioso.

Se ha descrito ampliamente que, en ciertas patologías neurodegenerativas, los astrocitos se activan y agravan aún más el daño neuronal. En este contexto, se analizó la expresión y distribución de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador ampliamente utilizado para la identificación de astrocitos y cuyo incremento es indicativo de una activación astrocítica (Philips & Robberecht, 2011).

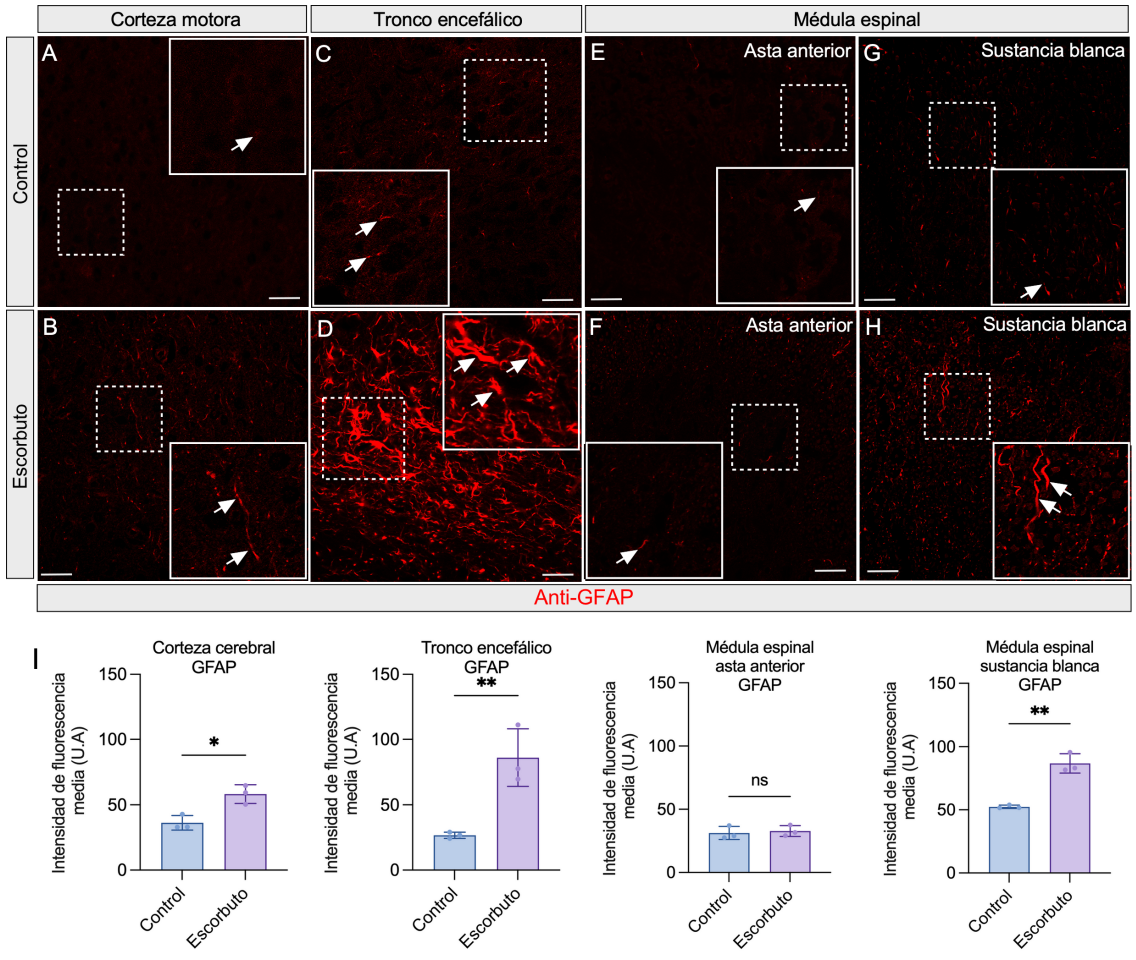


Figura 21. El escorbuto aumenta la activación astrocítica en regiones específicas del cerebro de cobayos.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador GFAP (rojo) en corteza cerebral **(A,B)**, tronco encefálico **(C,D)** y médula espinal **(E,H)**. En las muestras escorbúticas, se observó un incremento de astrocitos GFAP positivos (flecha blanca). Barra de tamaño: 20 μm. **(I)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para GFAP. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; **p<0,001; ns = no significativo.

En primer lugar, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en muestras de la corteza motora, el tronco encefálico y la médula espinal. Se observó un leve incremento de la tinción para GFAP en los astrocitos de la corteza motora (Figura 21B) y en la sustancia blanca de la médula espinal (Figura 21H), región compuesta predominantemente por procesos axonales, mas no en el asta anterior, donde se localizan las neuronas motoras (Figuras 21E y 21F). Sin embargo, la respuesta más marcada se observó en el tronco encefálico, donde se determinamos una gran cantidad de astrocitos intensamente positivos para GFAP (Figura 21D). El análisis cuantitativo determinó un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia media del marcador en la corteza, el tronco encefálico y la sustancia blanca de la médula espinal de los animales escorbúticos (Figura 21I), lo que sugiere una respuesta astrocítica asociada al déficit de vitamina C en estas regiones.

Posteriormente, se evalúo el marcador GFAP en bulbo raquídeo, en conjunto con los marcadores vimentina y tubulina-βIII. El análisis de inmunofluorescencia permitió observar una tinción positiva para vimentina en las células ependimarias que delimitan la superficie ventricular y los vasos sanguíneos, mientras que tubulina-βIII permitió identificar las células neuronales. Una primera área del bulbo raquídeo en evaluación correspondió a núcleos subependimarios: hipogloso y dorsal del vago. En ambas regiones, los astrocitos GFAP positivos se localizaron principalmente adyacentes a las células ependimarias que delimitan

el cuarto ventrículo (Figura 22A, C). Además, se observaron múltiples astrocitos distribuidos en la región medial del bulbo raquídeo, asociada al trayecto de haces de fibras nerviosas. En las muestras escorbúticas, particularmente en el núcleo vago, se observó un leve incremento en el número de procesos astrocitarios positivos para GFAP, que se extendían desde la región ependimaria hacia la neuropila, distribuyéndose entre las neuronas positivas para tubulina-βIII (Figura 22D, flechas blancas).

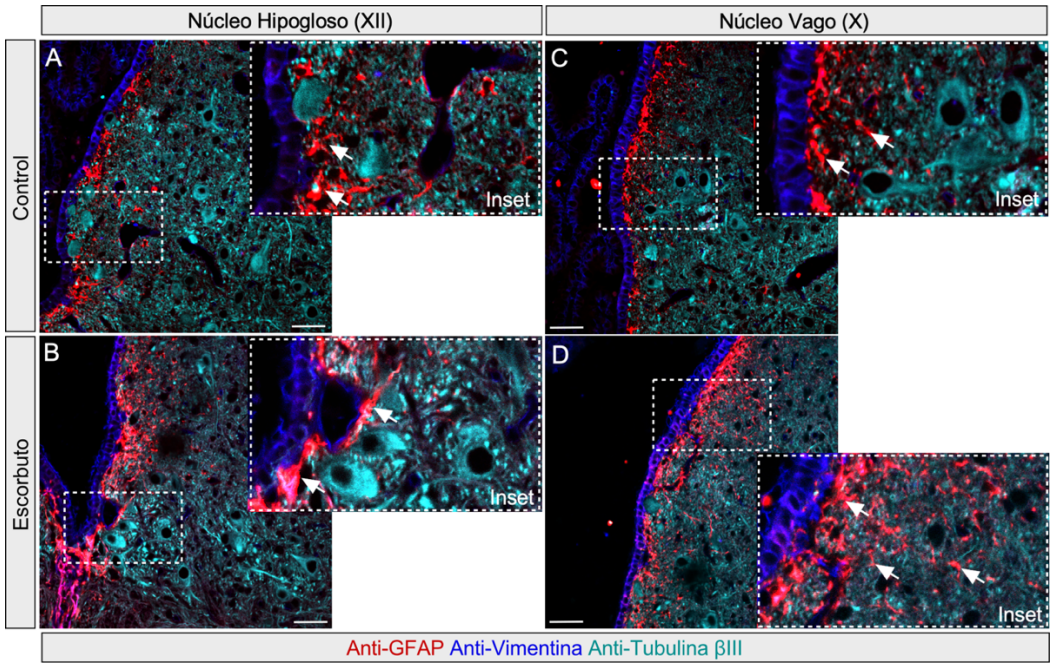


Figura 22. El análisis para GFAP evidenció múltiples procesos astrociticos positivos entre las neuronas de los núcleos subependimarios escorbúticos.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador GFAP (rojo), vimentina (azul) y tubulina-βIII (cian) en bulbo raquídeo de cobayos control y escorbúticos, en los núcleos hipogloso **(A,B)** y dorsal del vago **(C,D)**. Se observaron astrocitos GFAP positivos (flecha

blanca) distribuyéndose entre las neuronas, particularmente en la región del núcleo dorsal vago. Para todos los análisis se consideró un n=3. Barra de tamaño: 20 μm.

Por último, se evaluó la distribución y morfología astrocítica en las regiones del núcleo solitario y el borde lateral del bulbo raquídeo correspondiente al tracto espinal del nervio trigémino. En el núcleo del tracto solitario, el tejido control presentó abundantes procesos astrocíticos positivos para GFAP distribuidos entre los procesos neuronales positivos para tubulina-βIII (Figura 23A), mientras que en el tejido escorbútico la tinción para GFAP fue escasa y con un menor marcaje para tubulina-βIII (Figura 23B). Por otra parte, en el tracto espinal del trigémino, región caracterizada por la presencia de haces de fibras nerviosas, el tejido control presentó procesos astrocitarios GFAP positivos de pequeña longitud, distribuidos entre múltiples neuronas y procesos de tubulina-βIII positivos (Figura 23C), mientras que en el tejido escorbútico, se observó una menor cantidad de neuronas y procesos, pero se detectaron procesos astrocíticos más largos y extendidos (Figura 23D).

En conjunto, estos resultados evidencian que la deficiencia de vitamina C induce una respuesta astrocítica caracterizada por un incremento de la expresión de GFAP en distintas regiones del sistema nervioso central, particularmente en el tronco encefálico. A nivel bulbar, no se observó una respuesta uniforme entre los distintos núcleos craneales, observándose particularmente en el núcleo dorsal

del vago un leve incremento de astrocitos positivos para GFAP que se distribuyen entre los procesos neuronales. Estos hallazgos sugieren que el déficit de vitamina C no solo afecta directamente a las neuronas, sino que también desencadena una respuesta en células gliales localizadas en regiones específicas del cerebro.

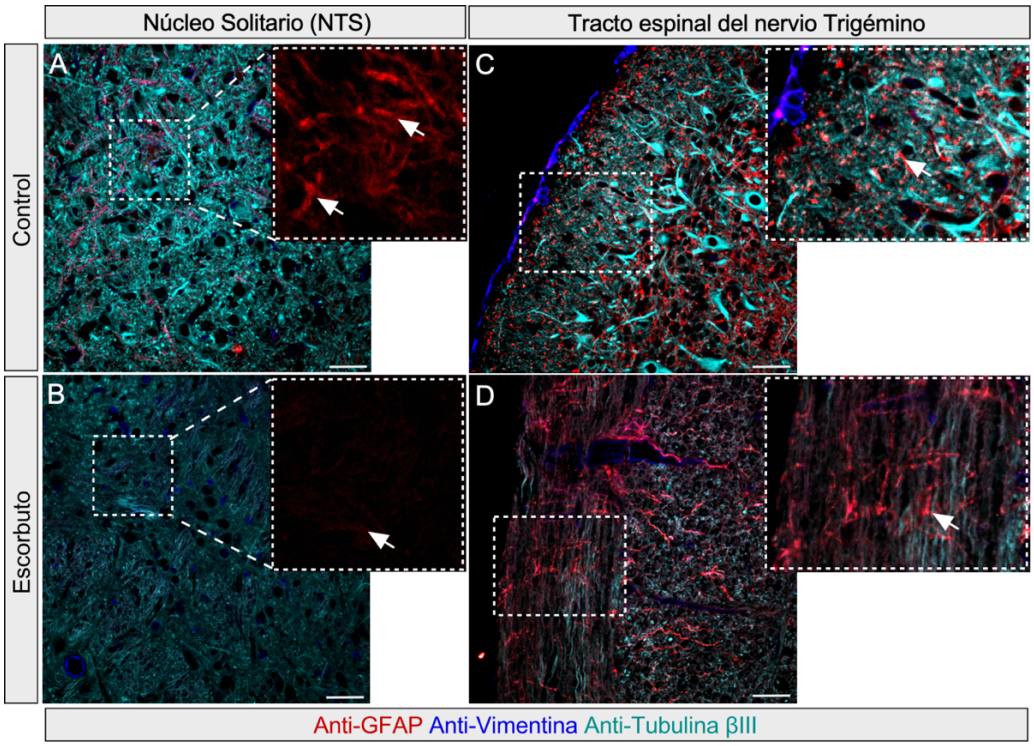


Figura 23. El análisis para GFAP mostró largos procesos astrociticos positivos, particularmente asociados a la región del tracto espinal del nervio trigémino.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador GFAP (rojo), vimentina (azul) y tubulina-βIII (cian) en bulbo raquídeo de cobayos control y escorbúticos, en el núcleo solitario **(A,B)** y el tracto espinal del nervio trigémino **(C,D)**. Se observaron múltiples astrocitos GFAP positivo (flecha blanca) distribuyéndose entre las neuronas. Para todos los análisis se consideró un n=3. Barra de tamaño: 20 μm.

6.1.5 Evaluación del transportador de vitamina C SVCT2 en neuronas motoras escorbúticas.

El transportador SVCT2 constituye el principal mecanismo de captación de AA de las células neuronales. Por lo tanto, se evaluó si el déficit de vitamina C induce alteraciones en la expresión o distribución de este transportador.

Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en la corteza motora y la médula espinal, utilizando un anticuerpo para SVCT2 en conjunto con el marcador Vesícula Sináptica 2 (SV2), lo que permitió identificar las neuronas y delimitar sus somas y procesos. En la corteza cerebral, la tinción para SVCT2 se observó principalmente distribuida en el soma de las neuronas corticales (Figura 24A, B), mientras que en la médula espinal la tinción se observó mayoritariamente en los procesos neuronales (Figura 24C, D). En las muestras escorbúticas observamos una disminución en la tinción para SVCT2 tanto en corteza cerebral como médula espinal, sin cambios aparentes en la tinción para SV2. El análisis cuantitativo mostró una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia para SVCT2 en los tejidos escorbúticos (Figura 24E). Adicionalmente, se observó que la tinción para SVCT2 se superponía parcialmente a SV2, particularmente en los procesos neuronales. Para evaluar esta observación se utilizó el análisis de colocalización de Manders y se determinó que existía una colocalización de SVCT2 con SV2 en las muestras

control, mientras que los tejidos escorbúticos presentaron una marcada disminución de esta colocalización (Figura 24F).

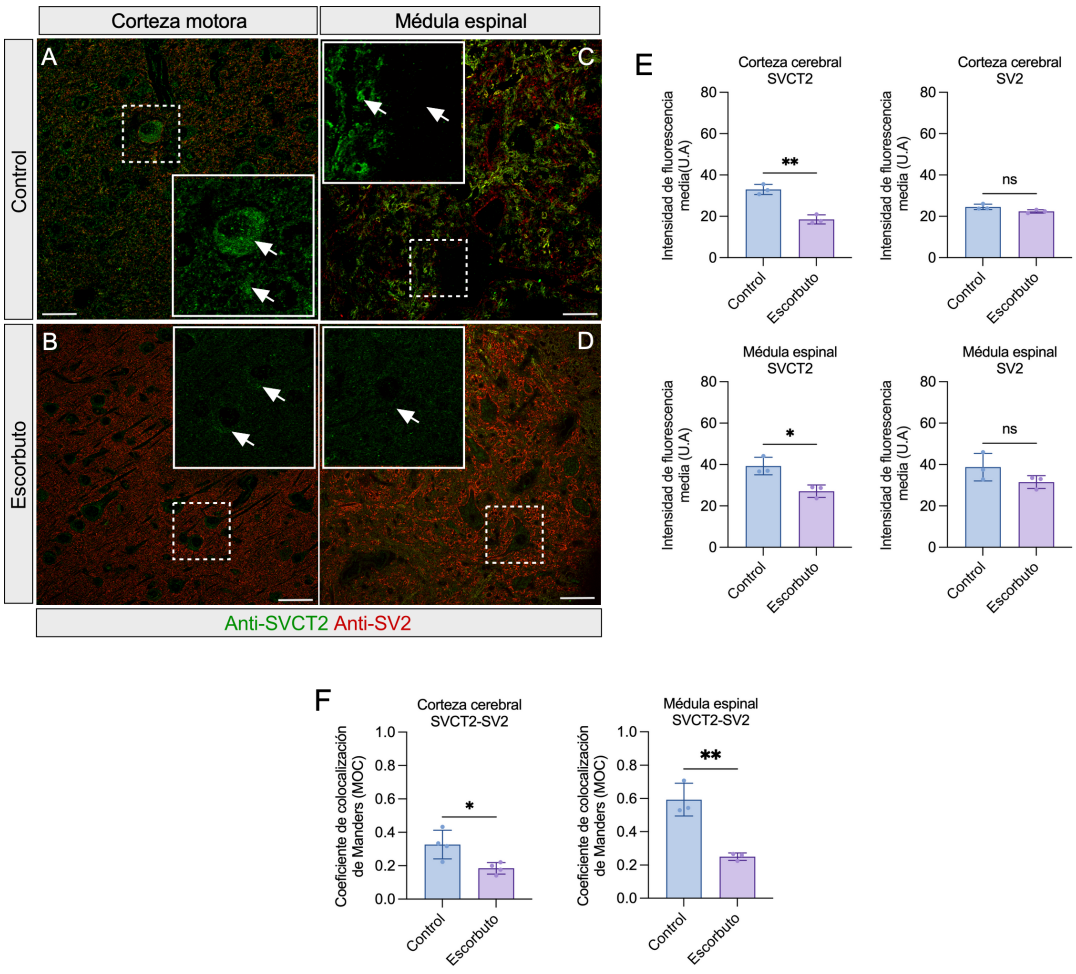


Figura 24. El escorbuto genera una disminución del transportador SVCT2 tanto en corteza cerebral como en la médula espinal.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador SVCT2 (verde) y SV2 (rojo) en corteza cerebral **(A,B)** y médula espinal **(C,D)**. Barra de tamaño: 20 μm. **(E)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para SVCT2 y SV2. **(F)** Análisis de colocalización de SVCT2 sobre SV2 con el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Los datos

se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *p<0,05; **p<0,001; ns = no significativo.

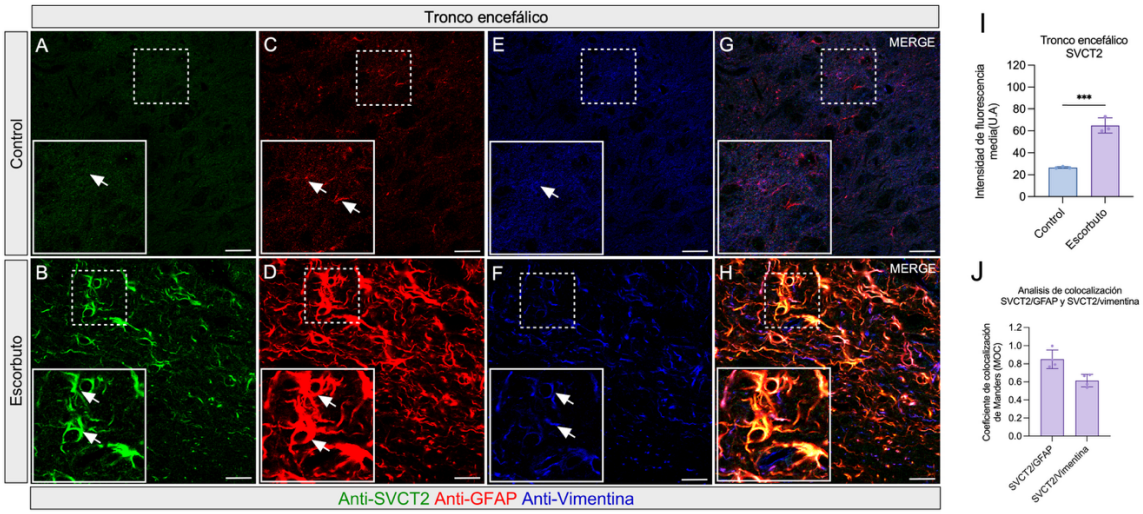


Figura 25. Astrocitos activados del tronco encefálico GFAP y vimentina positivos, inducen la expresión de SVCT2 en cobayos escorbúticos.

Análisis de inmunofluorescencia con SVCT2 (verde) **(A,B)**, GFAP (rojo) **(C,D)** y vimentina (azul) **(E,F)** en muestras de tronco encefálico de cobayos. Se observó la presencia de múltiples astrocitos activados GFAP y vimentina positivos (flecha blanca), los cuales también expresan SVCT2 en condición escorbútica. Barra de tamaño: 20 µm. **(I)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para SVCT2. **(J)** Análisis de colocalización de SVCT2 sobre GFAP y SVCT2 sobre vimentina con el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con *¨*p<0,0001.

En relación al tronco encefálico, se realizó un análisis de inmunofluorescencia utilizando marcadores para SVCT2, GFAP y vimentina, considerando la marcada presencia de astrocitos GFAP positivos observada previamente en esta región. En las muestras control se observó una baja intensidad de tinción para SVCT2 y la presencia de escasos astrocitos positivos para GFAP (Figura 25A, C). De manera similar, las muestras escorbúticas presentaron un bajo marcaje para SVCT2 en los cuerpos y procesos neuronales. Sin embargo, en estas muestras se observaron numerosos astrocitos positivos para GFAP y vimentina, potencialmente asociados a un fenotipo astrociticos reactivo, que además presentaron un incremento de señal positiva para el transportador SVCT2 (Figura 25B,I). Asimismo, la evaluación de colocalización de Manders, determinó una colocalización para la tinción de SVCT2 sobre los astrocitos GFAP y vimentina positivos (Figura 25J).

Posteriormente, se evaluó la expresión de SVCT2 en las neuronas bulbares de los núcleos craneales hipogloso (Figura 26A, B) , dorsal del vago (Figura 26C, D), del tracto solitario (Figura 26E, F) y el núcleo espinal del trigémino (Figura 26G, H). La inmunotinción para el SVCT2 mostró una baja intensidad de señal localizada preferentemente en los procesos neuronales (flechas blancas) y con un patrón de distribución heterogéneo entre los distintos núcleos bulbares. Cuantitativamente, se observó una tendencia a una menor intensidad de tinción en los procesos neuronales de los núcleos solitario y espinal del trigémino de las

muestras escorbúticas. Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística en ninguna de las regiones analizadas (Figura 26I).

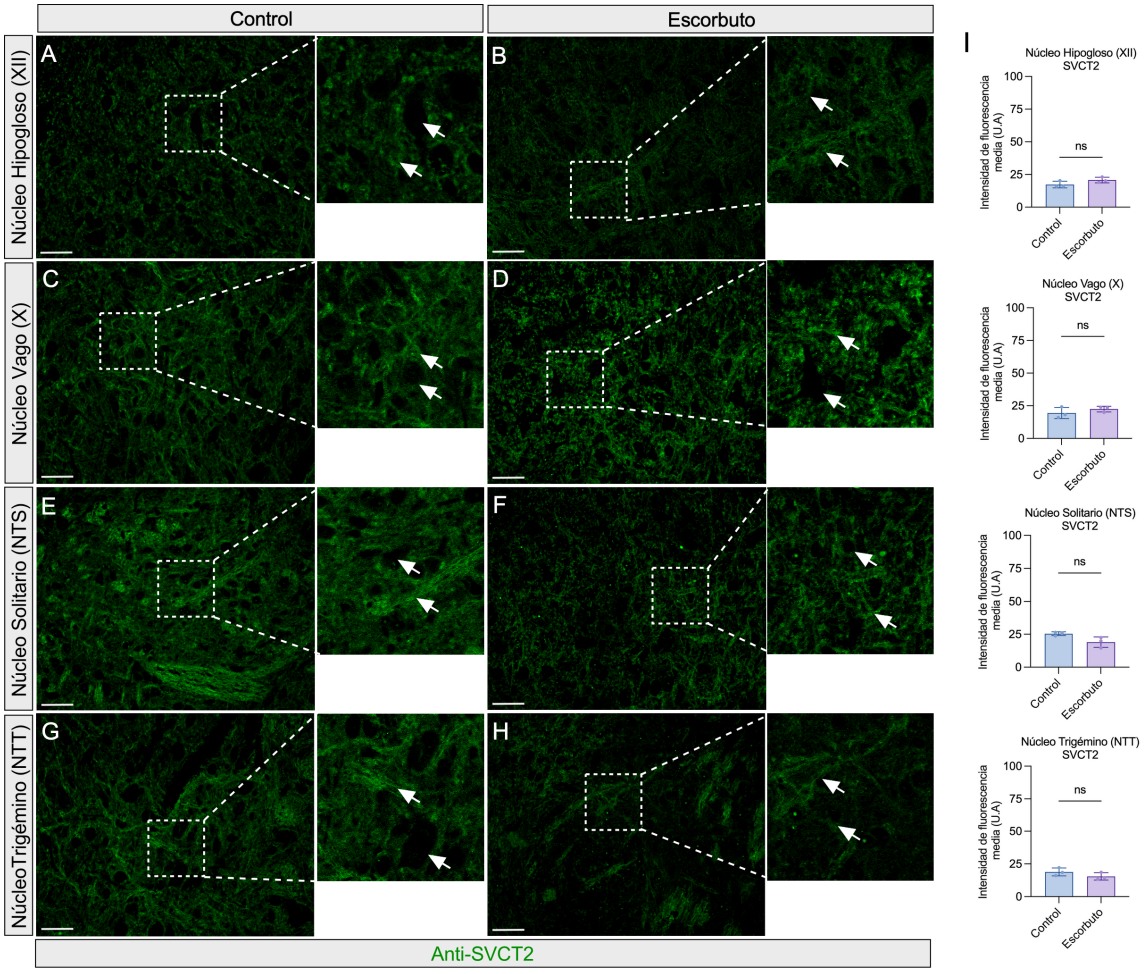


Figura 26. La inmunotinción para SVCT2 mostró una baja señal para el marcador en los núcleos del bulbo raquídeo.

Análisis de inmunofluorescencia con el marcador SVCT2 (verde) en los núcleos hipogloso **(A,B)**, dorsal del vago **(C,D)**, del tracto solitario **(E,H)** y espinal del trigémino **(G, H)**. Se observó una baja señal de inmunotinción localizada en los procesos neuronales (flecha blanca), sin cambios evidentes entre ambas condiciones

experimentales. Barra de tamaño: 20 μm. **(I)** Análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia media para SVCT2. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con ns = no significativo.

Dada la baja intensidad de señal de inmunofluorescencia observada para este transportador, a continuación se decidió evaluar la expresión y distribución del ARN mensajero (ARNm) de SVCT2, a través de la técnica de hibridación *in situ,* en tejidos de corteza cerebral y bulbo raquídeo de cobayos control y escorbúticos. Para ello, se utilizó una ribosonda específica para SVCT2 a partir de un plásmido previamente transformado en bacterias competentes y posteriormente linealizado mediante digestión con las enzimas de restricción SpeI y NotI. La correcta síntesis e incorporación del marcador a la ribosonda fue verificada a través de un ensayo de *Dot blot*, el cual confirmó la obtención de la sonda para los análisis posteriores (Anexo Figura suplementaria 3).

Una vez verificada la obtención de la sonda, se realizó el ensayo de hibridación *in situ* en muestras de corteza cerebral. En ambos grupos experimentales, la señal obtenida con la sonda antisentido (AS) presentó un patrón de distribución heterogéneo, observándose una señal de mayor intensidad en las capas más externas de la corteza y una menor señal en la capa interna o motora (Figura 27A, B, flechas negras). Además, las muestras incubadas con la sonda sentido

(SN) no presentaron una señal detectable, confirmando la correcta unión de la sonda al ARNm de los tejidos y su especificidad (Figura 27G, H). Al comparar ambos grupos experimentales, las neuronas escorbúticas mostraron una menor intensidad de la señal de hibridación en los somas neuronales, tanto de la corteza externa como motora (Figura 27C-F, flechas negras). Sin embargo, el análisis cuantitativo mostró una disminución significativa de la intensidad de la señal únicamente en las neuronas de la corteza motora (Figura 27I).

Posteriormente, se evaluó la expresión del ARNm de SVCT2 en cortes de bulbo raquídeo. En las muestras control, la sonda AS presentó una señal positiva de hibridación localizada principalmente en los somas neuronales (Figura 28A, flechas negras), mientras que las muestras escorbúticas mostraron una menor señal de hibridación (Figura 28B). A diferencia de lo observado en corteza cerebral, donde la señal de SVCT2 se detectó tanto en los somas como en la neuropila, en el bulbo raquídeo esta se restringió principalmente a determinados somas neuronales. El análisis cuantitativo mostró una disminución en la intensidad de la señal de hibridación para el ARNm de SVCT2 en las neuronas bulbares de las muestras escorbúticas (Figura 28E). Las muestras incubadas con la sonda SN no presentaron señal detectable, confirmando nuevamente la especificidad del ensayo (Figura 28C, D).

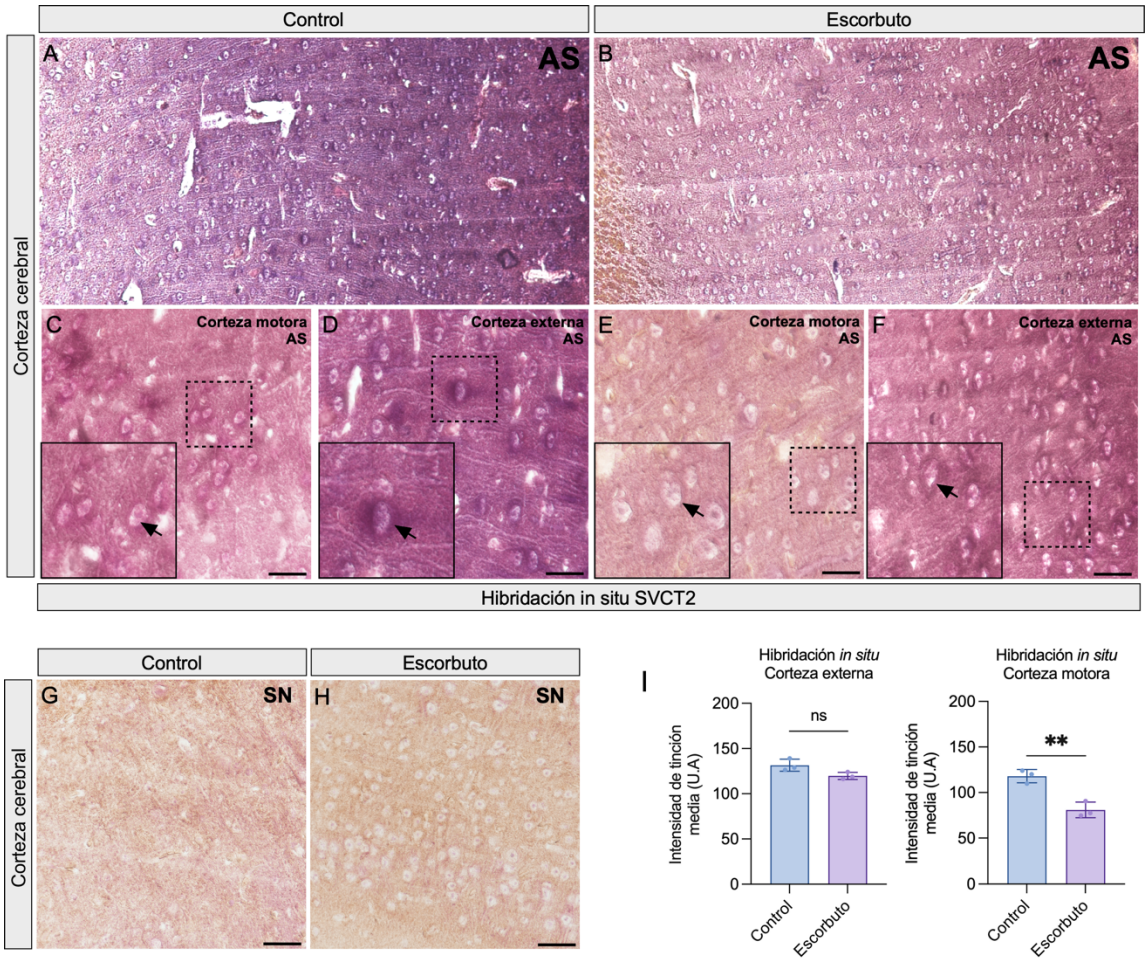


Figura 27. Las neuronas corticales de cobayos escorbúticos presentaron una tendencia a una menor señal de hibridación para el transportador SVCT2.

(A,F) Hibridación de corteza externa y motora en muestras control y escorbúticas con la sonda AS. **(G,H)** Hibridación de corteza cerebral control y escorbútica con la sonda SN. Barra de tamaño: 50 μm. **(I)** Análisis cuantitativo de a intensidad de señal de hibridación para SVCT2. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas, considerando un animal por condición, evaluando tres campos independientes por animal. Con **p<0,01, ns = no significativo.

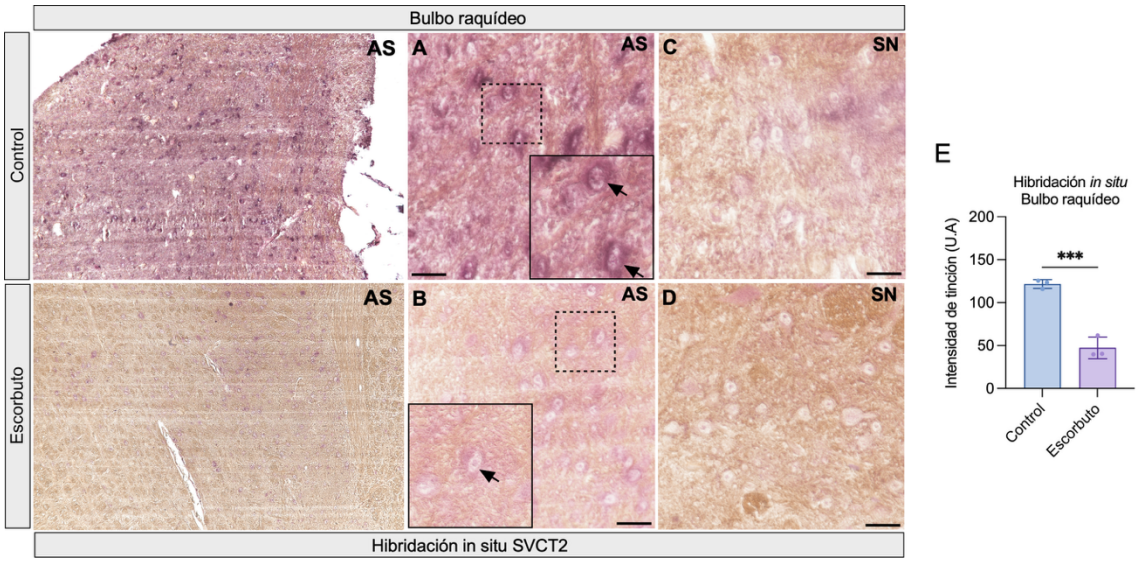


Figura 28. El análisis de hibridación in situ evidenció una disminución de la señal de SVCT2 en neuronas bulbares de cobayos escorbúticos.

(A,B) Hibridación de bulbo raquídeo control y escorbútico con la sonda antisentido (AS). **(C,D)** Hibridación de bulbo raquídeo control y escorbútico con la sonda sentido (SN). Barra de tamaño: 50 μm. **(E)** Análisis cuantitativo de a intensidad de señal de hibridación para SVCT2. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas, considerando un animal por condición, evaluando tres campos independientes por animal. Con ***p<0,001.

En conjunto, estos resultados evidencian que el déficit de vitamina C altera la expresión y distribución del transportador SVCT2 en el sistema nervioso. En la corteza cerebral y médula espinal se observó una disminución en el marcaje para SVCT2. Además, la reducción de colocalización con el marcador sináptico SV2 indica una pérdida del transportador particularmente en los procesos neuronales.

Por otra parte, el análisis mediante hibridación *in situ* mostró una menor expresión de ARNm de SVCT2 en las neuronas escorbúticas bulbares, complementando el análisis de inmunotinción analizado. Finalmente, la expresión de SVCT2 en astrocitos GFAP positivos en el tronco encefálico sugiere una posible participación de estas células en la captación de vitamina C frente al déficit, lo cual podría comprometer la disponibilidad de la vitamina C remanente para las neuronas.

6.1.6 Análisis proteómico de bulbo raquídeo en condiciones escorbúticas.

Los resultados obtenidos hasta este punto han evidenciado alteraciones en distintos componentes subcelulares de las neuronas escorbúticas, incluyendo el citoesqueleto, retículo endoplasmático y la expresión del transportador de vitamina C SVCT2. Con el objetivo de obtener una visión global los cambios moleculares asociados al déficit de vitamina C y así identificar posibles vías biológicas alteradas, se realizó un análisis proteómico para evaluar particularmente el bulbo raquídeo de los animales escorbúticos.

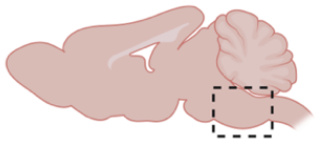
El análisis proteómico se llevó a cabo a partir de tres réplicas biológicas correspondientes a muestras de bulbo raquídeo de cobayos control y escorbúticos. En total, se identificaron 5.927 proteínas en las muestras control y 6.663 proteínas en las muestras escorbúticas. Del conjunto total de proteínas

identificadas, 5.243 fueron cuantificadas en ambos grupos experimentales y utilizadas en el análisis comparativo.

A partir de este conjunto, se identificaron 230 proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) entre las condiciones control y escorbúticas, considerando como criterio de selección un valor de $p<0,05$ y un cambio de expresión de $Log_2FC>0,5$ para proteínas sobreexpresadas o *upregulated* o Log2FC<-0,5 para proteínas subexpresadas o *downregulated* (Figura 29A).

A continuación, se realizó un análisis de Heatmap utilizando las intensidades de expresión de las 230 DEPs identificadas entre los grupos experimentales (Figura 29B). En este análisis, la escala de color representa la expresión relativa de cada proteína respecto a su media de expresión, donde el color rojo representó una mayor expresión relativa de las proteínas, mientras que el color azul indicó una menor expresión. El Heatmap nos permitió observar un patrón diferencial de expresión entre ambos grupos experimentales, observándose que las proteínas con mayor expresión en las muestras escorbúticas tendían a presentar menor expresión en las muestras control, y viceversa. Las réplicas biológicas tendieron a agruparse según su condición experimental, aunque se observaron algunas proteínas que presentaron variaciones entre individuos del mismo grupo.

A



	Control vs Escorbuto
Cuantificables	5.243
DEPs (p value < 0,05)	230

B

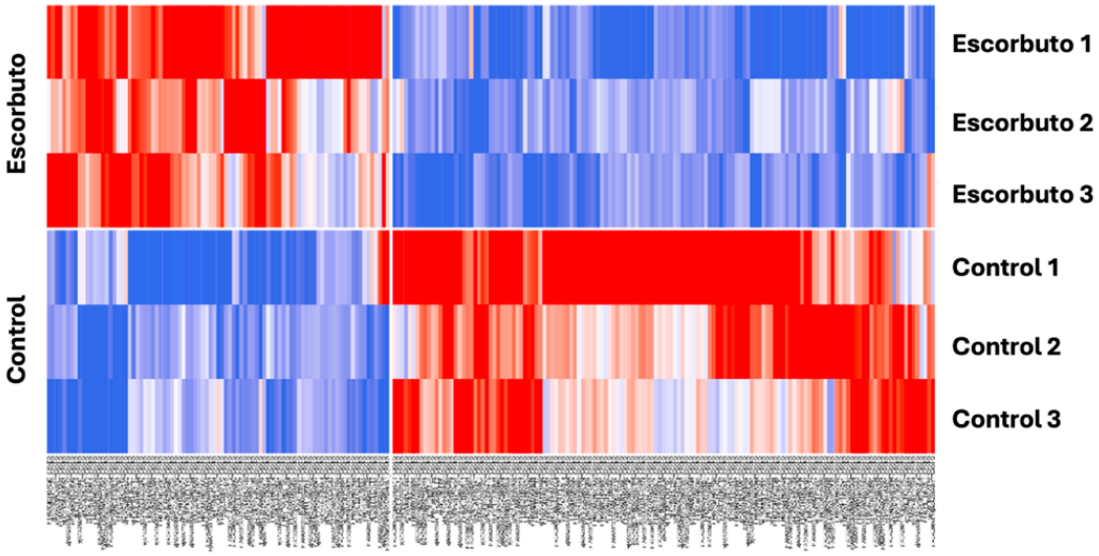


Figura 29. El análisis de Heatmap mostró un patrón diferencial de expresión de proteínas entre las muestras control y escorbúticas de bulbo raquídeo de cobayo.

(A) Región analizada con el número de proteínas total cuantificadas y el número de proteínas diferencialmente expresadas (DEPs). **(B)** Análisis de Heatmap de las DEPs en muestras de bulbo raquídeo de cobayos control y escorbúticos. Cada fila representa una réplica biológica de cada grupo experimental y las columnas corresponden a las DEPs. Los colores representan la abundancia relativa de cada proteína, donde con el color rojo se observan las proteínas con mayor expresión relativa, mientras que en azul las proteínas que presentan una menor expresión relativa.

Luego, se realizó un análisis de Volcano plot utilizando los datos de las proteínas cuantificadas y la información disponible en la plataforma *Uniprot*, con el objetivo de identificar las proteínas que presentaban los mayores cambios de expresión entre ambos grupos experimentales (Figura 30). Este análisis permitió visualizar de manera simultánea la magnitud del cambio de expresión (Log_2FC) y su significancia estadística ($p<0,05$), identificando en un mismo gráfico proteínas diferencialmente sobreexpresadas (*upregulated*, rojo) y subexpresadas (*downregulated*, azul).

Entre las proteínas que presentaron una mayor sobreexpresión se identificaron Centrina 3 (CENT3), proteína asociada a la organización de microtúbulos de la célula; Ceruloplasmina (CP), glicoproteína involucrada en la homeostasis del hierro y cobre; y S100A9, proteína de unión a calcio involucrada en procesos inflamatorios y respuesta inmune. Por otro lado, entre las proteínas con mayor subexpresión, se identificaron el Factor activador de proteasas apoptóticas 1 (APAF1), proteína citoplasmática asociada a la activación de la vía apoptótica; Actina Beta-Like 2 (ACTBL2), componente esencial en la organización y movimiento del citoesqueleto celular; y Delta(24)-esterol reductasa (DHCR24), enzima involucrada en la biosíntesis del colesterol.

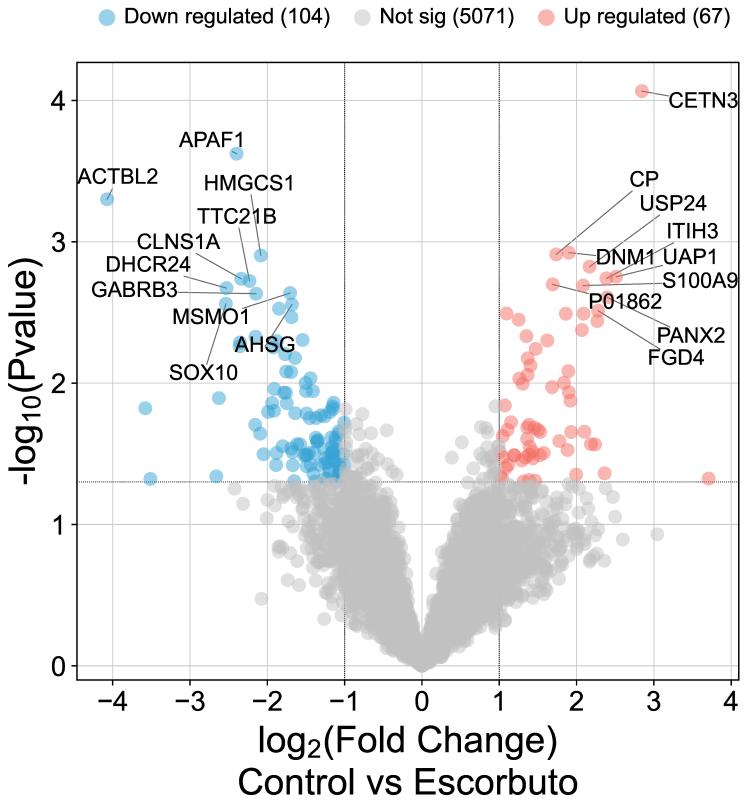


Figura 30. El análisis de Volcano plot identificó proteínas sobreexpresadas y subexpresadas en las muestras escorbúticas.

El grafico muestra la distribución de las proteínas DEPs según su cambio de expresión (Log_2FC) y su significancia estadística ($-log_{10}$(*p-value)*). Las proteínas sobreexpresadas (*upregulated*) se muestran en rojo, mientras que las subexpresadas (*downregulated*) en azul. Las proteínas etiquetadas corresponden a aquellas que presentan los mayores cambios de expresión entre ambos grupos experimentales. Gráfico generado por *SRplot* (Tang et al., 2023).

Posteriormente, con el objetivo de identificar los principales procesos biológicos asociados a las proteínas DEPs, se realizó un análisis exploratorio de

enriquecimiento de vías mediante plataformas bioinformáticas de libre acceso (*user-friendly*) y la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). El análisis permitió agrupar las proteínas según las vías biológicas en las que participan, identificando procesos potencialmente alterados por el déficit de vitamina C.

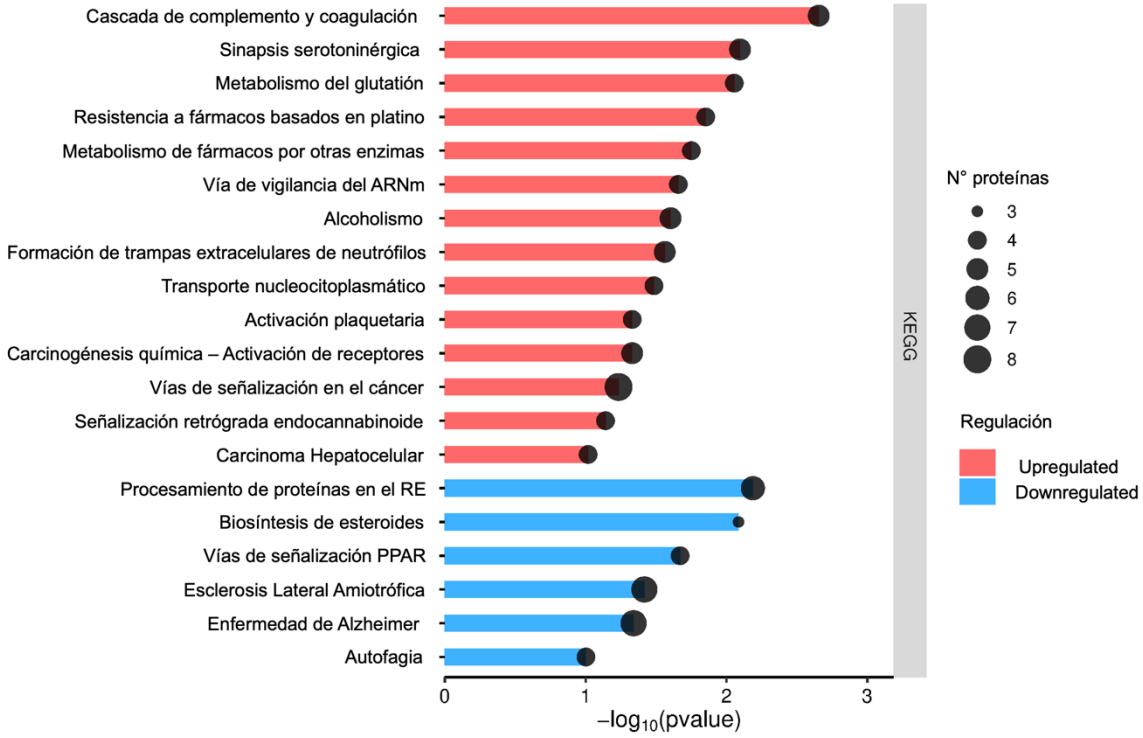


Figura 31. El análisis de enriquecimiento de vías evidenció alteraciones en procesos asociados al procesamiento de proteínas en el RE, entre otros procesos biológicos.

El gráfico muestra las principales vías biológicas enriquecidas identificadas para las proteínas sobreexpresadas (*upregulated*) y subexpresadas (*downregulated*). El eje x indica el nivel de significancia estadística del enriquecimiento (-$\log_{10}$(*p-value)*), mientras

que en el eje y representa las vías biológicas enriquecidas, donde el tamaño de cada punto es proporcional al número de proteínas asociadas a esa vía. En análisis de enriquecimiento se realizó utilizando la plataforma *DAVID Bioinformatics* (Sherman et al., 2022) y el gráfico fue generado en *SRplot* (Tang et al., 2023).

Entre las proteínas sobreexpresadas se observó un enriquecimiento de vías relacionadas con la cascada del complemento y coagulación, el metabolismo del glutatión, la vigilancia del ARNm, la activación plaquetaria y el alcoholismo, entre otras. En conjunto, estas vías se asocian principalmente a una respuesta frente a un proceso inflamatorio y regulación del estado redox. Por otro lado, las proteínas subexpresadas enriquecieron vías asociadas al procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, la biosíntesis de esteroides, la autofagia y la Esclerosis Lateral Amiotrófica, procesos relacionados principalmente al mantenimiento de la homeostasis proteica (Figura 31).

Finalmente, con el objetivo de confirmar los cambios en la expresión de proteínas identificadas, se realizó un análisis de Western blot utilizando extractos de proteína de bulbo raquídeo y, adicionalmente, de corteza cerebral. Para este análisis, se seleccionaron proteínas asociadas a los procesos alterados previamente identificados incluyendo GFAP, proteínas residentes del RE evaluadas mediante el marcador KDEL, y proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto neuronal y el transporte de vitamina C, como

tubulina-βIII, SVCT2 y GLUT1, con el fin de complementar la caracterización de las alteraciones observadas en los animales escorbúticos. En ambos tejidos se detectó una banda para GFAP por encima de los 50 kDa, una banda principal reconocida por el anticuerpo anti-KDEL cercana a los 50 kDa, una banda para tubulina-βIII por encima de los 50 kDa, una banda para SVCT2 sobre los 100 kDa y una banda para GLUT1 en los 50 kDa (Figura 32A, B).

Posteriormente, se realizó el análisis densitométrico de las bandas normalizadas respecto a β-Actina. La expresión de GFAP presentó una disminución significativa en la corteza cerebral de los animales escorbúticos, mientras que en el bulbo raquídeo se observó una tendencia a la disminución, que no alcanzó la significancia estadística (Figura 32C). Sin embargo, para la evaluación de tubulina-βII, KDEL y los transportadores SVCT2 y GLUT1, no se observaron diferencias en la intensidad de las bandas entre los grupos experimentales en ninguna de las regiones analizadas (Figura 32D-G).

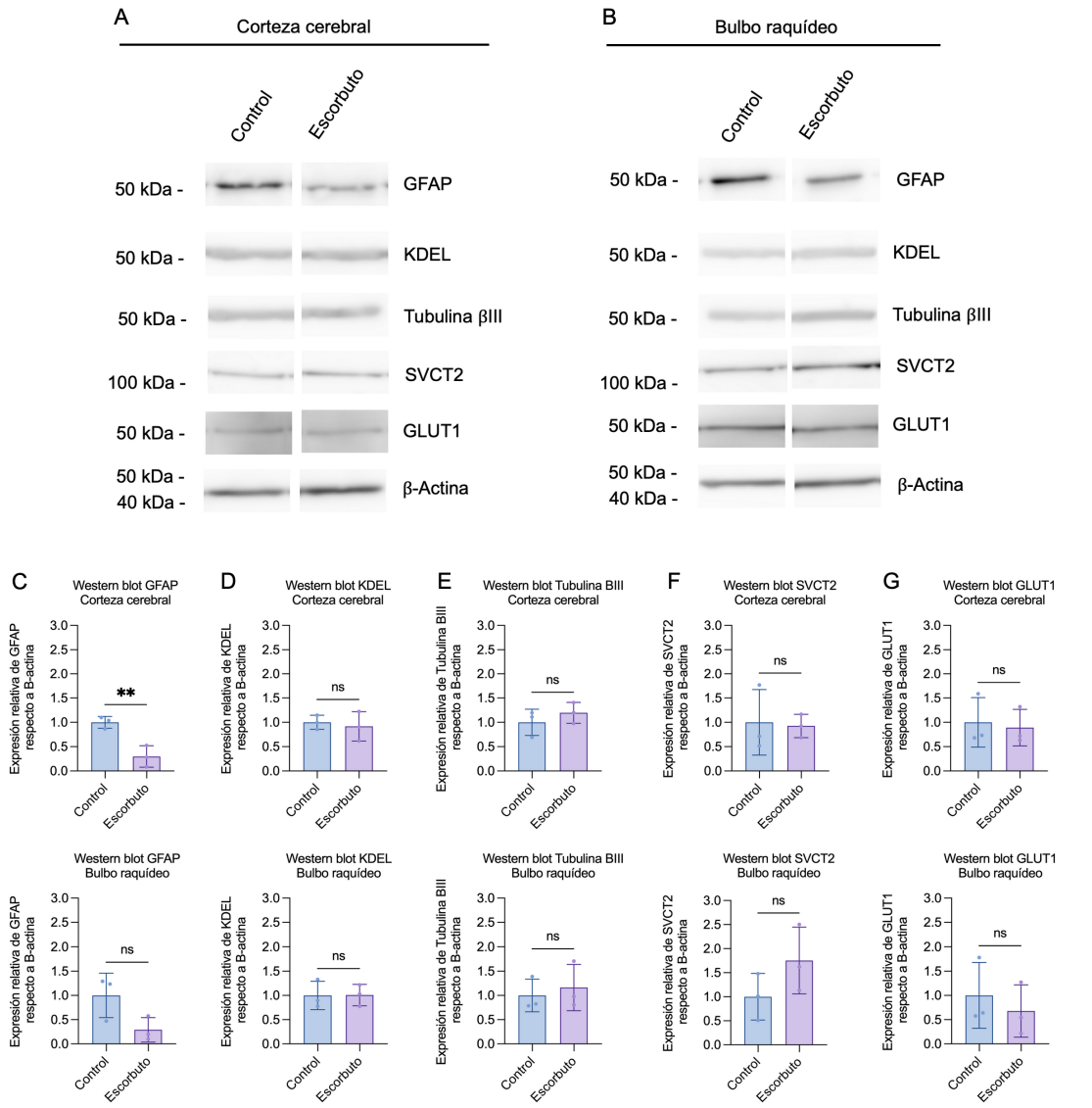


Figura 32. Análisis mediante Western blot de proteínas asociadas a los procesos alterados por el déficit de vitamina C.

(A) Membranas representativas de Western blot correspondientes a extractos proteicos de corteza cerebral. **(B)** Membranas representativas de Western blot correspondientes a extractos proteicos de bulbo raquídeo. Se evaluó la expresión de GFAP (~50 kDa), proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-KDEL (banda principal ~50 kDa), tubulina-

βIII (~50 kDa), SVCT2 (~100 kDa) y GLUT1 (~50 kDa), utilizando β-Actina como control. Se realizó una cuantificación de densitometría normalizada respecto a β-Actina para GFAP **(C)**, KDEL **(D)**, tubulina-βIII **(E)**, SVCT2 **(F)** y GLUT1 **(G)**. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con **p<0,001; ns = no significativo.

En conjunto, el análisis proteómico evidenció que el déficit de vitamina C produce modificaciones en el perfil de expresión proteica del bulbo raquídeo, principalmente relacionadas a procesos como la respuesta inflamatoria, el equilibrio redox y la homeostasis proteica. El enriquecimiento de vías asociadas a una menor expresión de proteínas involucradas en el procesamiento de proteico en el RE resulta particularmente relevante, considerando las alteraciones previamente observadas mediante Nissl, inmunolocalización con KDEL y TEM. Entre las proteínas subexpresadas encontramos la GRP78, una chaperona del RE involucrada en la respuesta UPR, y SEC13, una proteína asociada al transporte vesicular desde el RE hacia el aparato de Golgi. Además, se determinó una disminución de GFAP mediante Western blot, mientras que los otros marcadores evaluados no presentaron cambios significativos. Sin embargo, nos permitieron confirmar la detección de proteínas y procesos asociados a las estructuras y mecanismos celulares de interés.

6.2 Parte II. Caracterización celular y subcelular de neuronas motoras diferenciadas *in vitro* de iPSC humanas en déficit de vitamina C.

6.2.1 Análisis en neuronas motoras espinales.

Los resultados obtenidos en el modelo animal de cobayo escorbútico evidenciaron alteraciones subcelulares asociadas al citoesqueleto neuronal, el RE y, eventualmente, las mitocondrias en las neuronas bulbares. Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad *in vitro* de estos hallazgos en células humanas, se utilizaron como primera aproximación neuronas motoras espinales (sMN) diferenciadas a partir de la línea celular de células madre neurales humanas AF22, a través un protocolo de diferenciación previamente estandarizado (Figura 33A). Estas células presentan un fenotipo de neuronas motoras ventrales de la médula espinal, lo que nos permitió obtener una caracterización inicial sobre la respuesta de las neuronas motoras frente a condiciones de déficit de vitamina C.

Posterior a la diferenciación, las sMN fueron mantenidas durante 6 días en cultivo bajo condiciones de déficit de vitamina C. Posteriormente, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos para evaluar la morfología neuronal. En primer lugar, se analizaron las neuronas utilizando los marcadores colina acetiltransferasa (CHAT), tubulina-βIII y el transportador GLUT1, donde observamos tinción positiva para los tres marcadores tanto en los somas como en los procesos neuronales (Figura 33B-I).

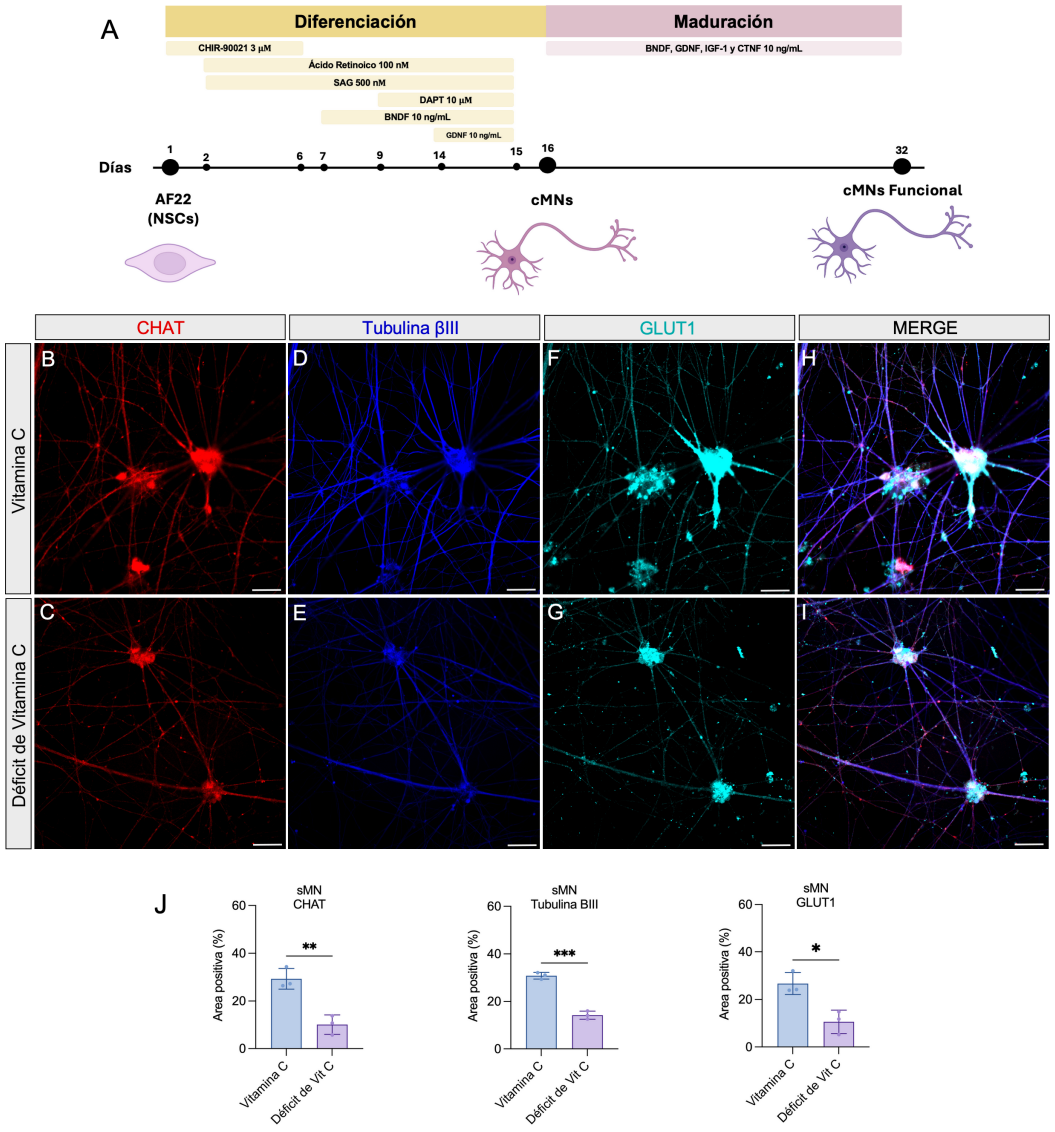


Figura 33. El déficit de vitamina C reduce la densidad de procesos neuronales in vitro en sMN diferenciadas.

(A) Esquema del protocolo de diferenciación para la generación de neuronas motoras espinales a partir de las células AF22. **(B-I)** Análisis de inmunocitoquímica de sMN diferenciadas utilizando los marcadores neuronales CHAT (rojo), tubulina-βIII (azul) y GLUT1 (cian), evaluando los somas y procesos neuronales. Barra de tamaño: 20 µm. **(I)**

Análisis cuantitativo del área positiva a la tinción. Las mediciones obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media $\pm$ SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p*<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.

Al comparar ambas condiciones experimentales, se observó que las neuronas suplementadas con vitamina C presentaron una mayor densidad de procesos neuronales, en comparación con aquellas que se mantuvieron en tratamiento de déficit de vitamina C. Estas diferencias se observaron con los tres marcadores utilizados, pero particularmente con la tinción para tubulina-βIII (Figura 34D,E), cuya tinción permitió identificar con mayor claridad procesos neuronales de menor tamaño. El análisis cuantitativo mostró un mayor porcentaje de área positiva para los tres marcadores en las neuronas suplementadas con vitamina C, posiblemente dada la mayor extensión de procesos observados en estas neuronas.

A continuación, se realizó un segundo análisis inmunocitoquímico utilizando los marcadores MAP2, proteína asociada principalmente a procesos dendríticos, y MAP1B, proteína del citoesqueleto neuronal particularmente asociada a procesos axonales. La tinción para MAP1B permitió visualizar la extensa red de procesos axonales en las células mantenidas con vitamina C, mientras que en las neuronas

sometidas a déficit de esta vitamina presentaron una menor densidad de los procesos (Figura 34A, B). Por otro lado, la tinción para MAP2 presento una menor intensidad en ambos grupos experimentales, restringiéndose a solo algunos procesos dendríticos (Figura 34C, D). El análisis cuantitativo mostró un mayor porcentaje de área positiva para MAP1B en las neuronas suplementadas, mientras que no se observaron diferencias significas entre ambas condiciones para MAP2.

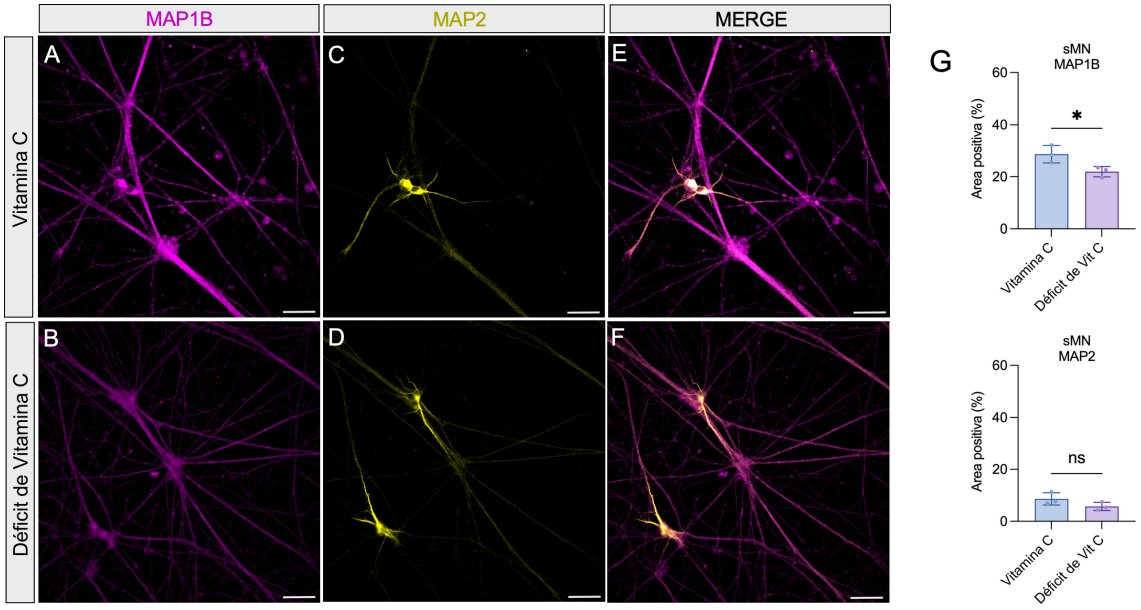


Figura 34. El déficit de vitamina C reduce la densidad de procesos axonales MAP1B positivos en sMN.

(A-F) Análisis de inmunocitoquímica de sMN diferenciadas utilizando los marcadores MAP1B (magenta) y MAP2 (amarillo), evaluando procesos dendríticos y axonales. Barra de tamaño: 20 μm. **(G)** Análisis cuantitativo del área positiva a la tinción. Las mediciones

obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p*<0,05; ns = no significativo.

En conjunto, estos resultados indican que el déficit de vitamina C altera la organización morfológica de las sMN humanas in vitro, observándose principalmente por una menor extensión y densidad de procesos neuronales.

6.2.2 Diferenciación de AF22 a neuronas motoras cervicales.

A partir de las observaciones obtenidas en el modelo de neuronas motoras espinales, se implementó un modelo *in vitro* de neuronas motoras cervicales diferenciadas a partir de la línea celular AF22. Estas neuronas corresponden a un subtipo motor localizado en la región más rostral de la médula espinal, adyacente al bulbo raquídeo. Dada la proximidad anatómica con las neuronas motoras bulbares evaluadas en el modelo de cobayo, se seleccionó este modelo para evaluar los efectos del déficit de vitamina C en las neuronas motoras humanas.

La diferenciación de las células AF22 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Yang y colaboradores (2023), el cual permite la obtención de neuronas motoras con identidad cervical (Figura 35) (Yang et al., 2023). Este

protocolo comprende tres etapas, definidas por el uso de distintos factores de diferenciación según el estado celular. La primera etapa corresponde a la inducción del dominio progenitor de neuronas motoras (MNp) y se desarrolla entre los días 1 y 6 del protocolo. Durante este periodo, se observó una proliferación y expansión de las células sobre la superficie de cultivo, generando agrupaciones celulares, las cuales presentaron pequeños procesos neuronales (Figura 36A-D).

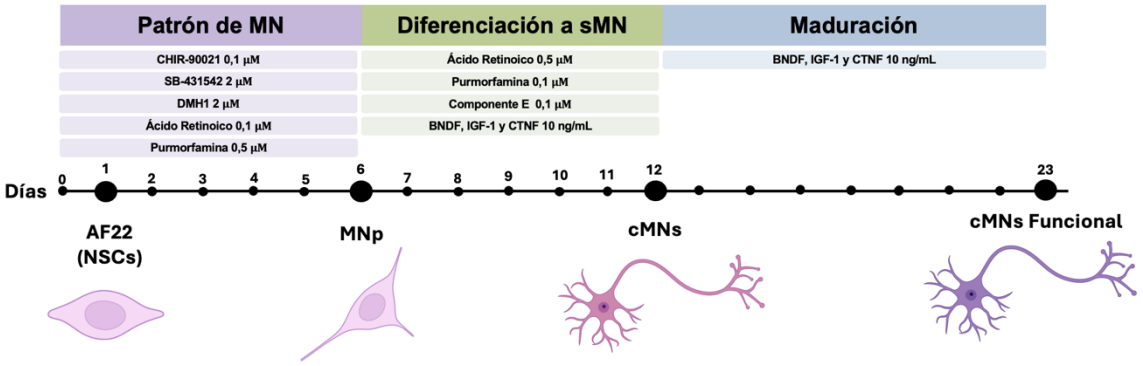


Figura 35. Protocolo de diferenciación de células AF22 humanas a neuronas motoras cervicales (cMN).

Se realizó el protocolo de diferenciación a neuronas motoras cervicales descrito por Yang et al. 2023, utilizando las células AF22. Este protocolo consta de tres partes. Entre el día 1 y 6 se generó el patrón de neurona motora, llevando a las células a un estado de progenitor de neurona motora (MNp). Entre los días 7 y 12 se realizó la diferenciación de las MNp a neuronas motoras espinales (sMN). Finalmente, entre los días 13 y 23 se realizó la maduración de las sMN, las cuales presentan una identidad cervical (cMN).

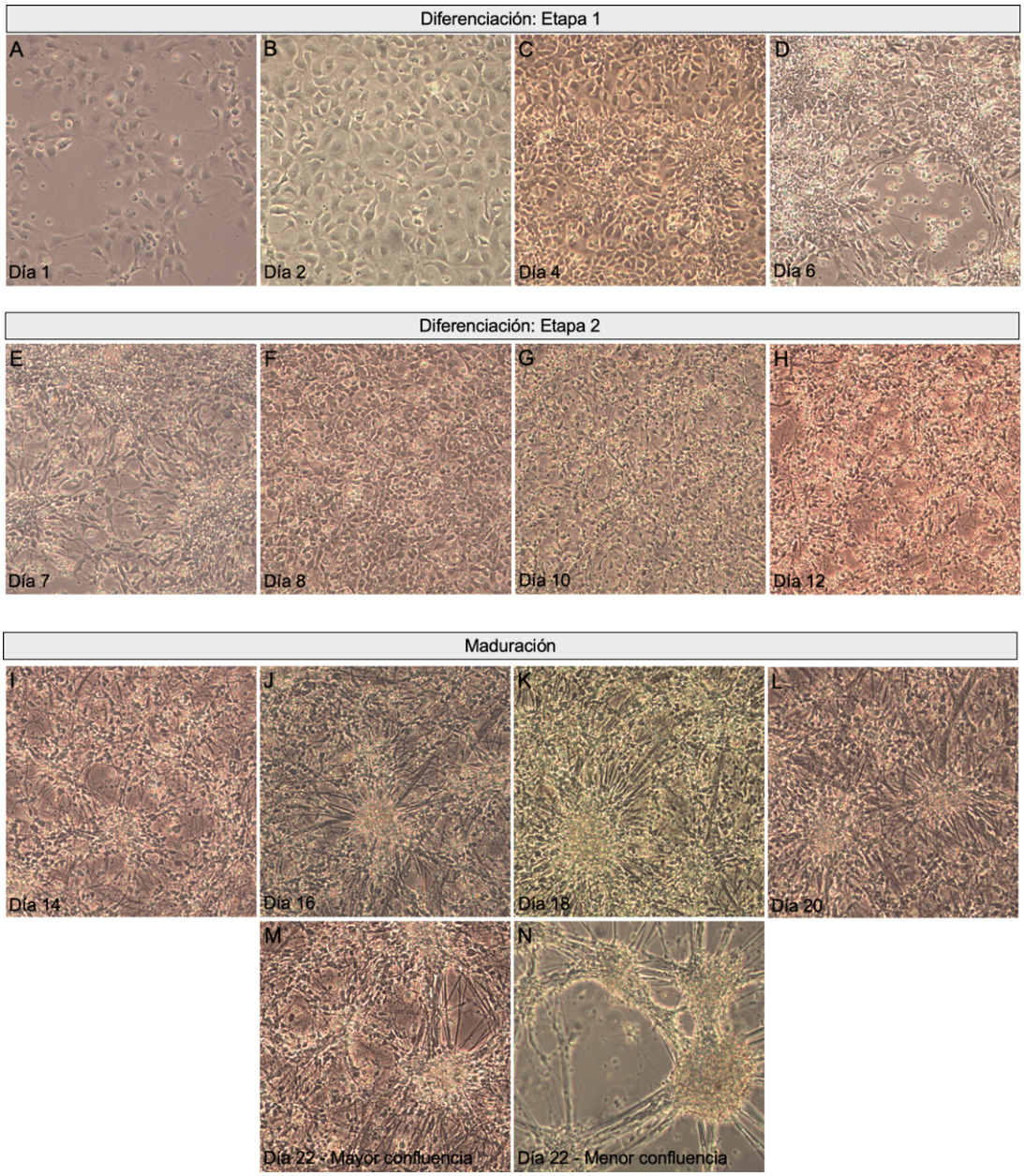


Figura 36. Etapas y cambios morfológicos durante la diferenciación y maduración in vitro de cMN a partir de las células madre neuronales AF22.

(A-D) Primera del protocolo de diferenciación, correspondiente a la generación del progenitor de progenitor de motoneuronas (MNp). **(E-H)** Segunda etapa de diferenciación, donde las células completan la diferenciación a neuronas motoras

espinales (sMN) de fenotipo cervical (cMN). **(I-N)** Etapa de maduración neuronal, donde se obtienen neuronas motoras con características funcionales. Magnificación = 100x.

Posteriormente, las células fueron subcultivadas en placas de cultivo, donde completaron su diferenciación y maduración neuronales. La segunda etapa del protocolo, que se desarrolla entre los días 7 y 12, corresponde a la diferenciación de las MNp hacia neuronas motoras espinales (sMN). En este periodo, se observaron agrupaciones celulares más definidas y una mayor extensión de procesos neuronales (Figura 36E-H).

Finalmente, entre los días 13 y 23, las sMN continuaron su proceso de maduración hasta adquirir un fenotipo funcional, que presenta identidad cervical (cMN) (Figura 36I-N). Durante esta etapa, se observaron agrupaciones celulares más compactas, algunas de ellas organizadas en estructuras semejantes a neuroesferas junto con una extensa red de prolongaciones neuronales que conectaban entre sí (Figura 36N). Por otra parte, se observaron agrupaciones menos compactas, pero con una mayor densidad de procesos neuronales (Figura 36M).

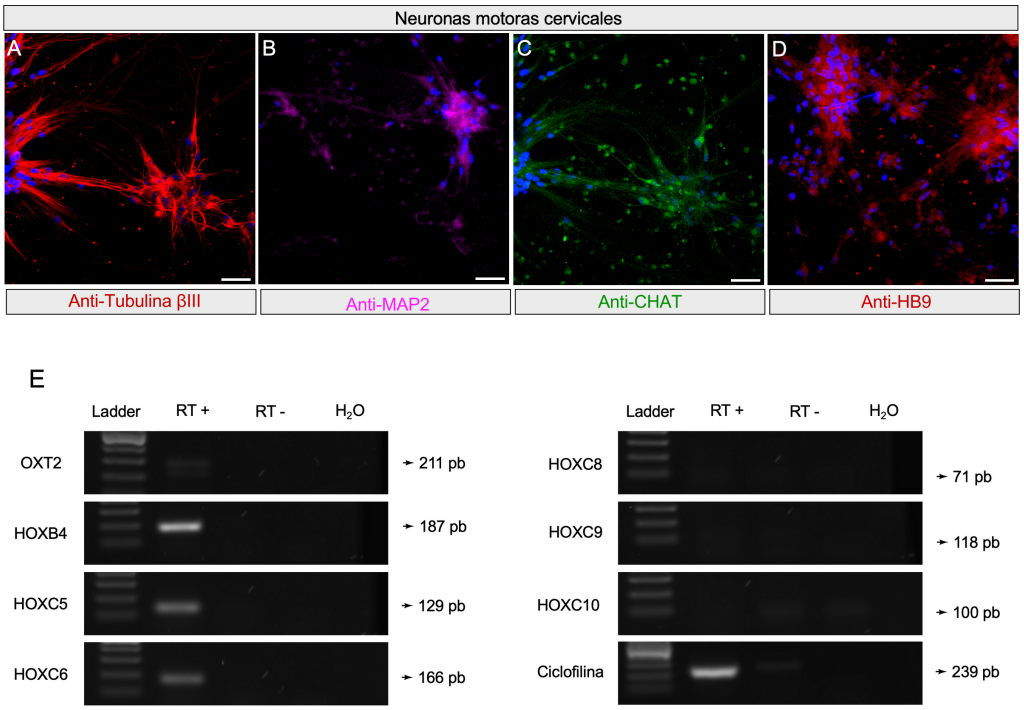


Figura 37. Caracterización del fenotipo neuronal y motor de las cMN diferenciadas in vitro.

Se evaluaron los marcadores neuronales Tubulina βIII (rojo) **(A)** y MAP2 (magenta) **(B)**, el marcador de neuronas colinérgicas CHAT (verde) **(C)** y el marcador especifico de neuronas motora HB9 (rojo) **(D)** en las cMN diferenciadas a partir de AF22. Tinción nuclear: Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(E)** PCR convencional para la evaluación de los genes asociados a la identidad rostro-caudal de las cMN diferenciadas a partir de AF22. Se evaluó la expresión de los genes OTX2 (cerebro anterior y mesencéfalo); HOXB4, HOXC5 y HOXC6 (identidad cervical); y HOXC8, HOXC9 y HOXC10 (identidad torácico-lumbar). Se utilizó Ciclofilina como control de expresión. Se incluyeron tres condiciones de control: RT+ (transcripción), RT- (sin transcripción), y agua, como control negativo. Los tamaños de los productos de amplificación se indican en pares de bases (pb).

A continuación, con el objetivo de hacer una primera caracterización de las neuronas motoras obtenidas a través de este protocolo de diferenciación, se realizó un análisis de inmunocitoquímica utilizando los marcadores tubulina-βIII, MAP2, HB9 y CHAT. El marcaje para tubulina-βIII y MAP2 permitió identificar las células con fenotipo neuronal (Figura 37A,B), mientras que la expresión de CHAT (Figura 37C), enzima característica de neuronas colinérgicas, y HB9 (Figura 37D), un marcador especifico de neuronas motoras, nos permitió confirmar la obtención del fenotipo neuronal.

Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo de PCR convencional a partir de ARN obtenido de las cMN maduras, con el objetivo de evaluar la expresión de genes asociados a la identidad rostro-caudal y confirmar el fenotipo de motoneurona obtenido. Se analizaron OTX2, asociado a la identidad del cerebro anterior y mesencéfalo; HOXB4, HOXC5 y HOXC6, asociados a la identidad cervical de las neuronas motoras; y HOXC8, HOXC9 y HOXC10, asociados a identidades más caudales de la médula espinal (torácico-lumbar). El análisis mostró amplificación para HOXB4, HOXC5 y HOXC6, mientras que no se detectaron productos de amplificación para los otros genes evaluados. Este patrón de expresión nos confirmó la obtención del fenotipo de neurona motora cervical (Figura 37E).

En conjunto, los cambios morfológicos observados durante el proceso de diferenciación, la expresión de los marcadores neuronales tubulina-βIII y MAP2,

y de los marcadores asociados al fenotipo de motoneurona HB9 y CHAT, junto con el patrón de expresión génica obtenido mediante PCR convencional, permitieron caracterizar y validar la obtención de motoneuronas de identidad cervical a partir de la línea de células madre neuronales AF22. Una vez establecido y caracterizado este modelo, se procedió a evaluar los efectos del déficit de vitamina C en las cMN.

6.2.2 Análisis morfológico y subcelular de neuronas motoras cervicales inducidas a un déficit de vitamina C.

Una vez establecida la diferenciación hacia neuronas motoras cervicales, se evaluaron los efectos del déficit de vitamina C en las características morfológicas y subcelulares de estas células. Para ello, una vez que las células llegaron al día 23 de maduración, se mantuvieron durante 6 días en condiciones de déficit de vitamina C.

Con el objetivo de verificar la reducción de los niveles intracelulares de AA, se cuantificó su contenido mediante el ensayo EnzyChrom Ascorbic Acid Assay, un método colorimétrico cuantitativo. El ensayo mostró una disminución significativa de la concentración intracelular de AA en las neuronas sometidas a déficit, en comparación con las células mantenidas en condiciones de suplementación con vitamina C (Figura 38). En particular, las neuronas suplementadas con vitamina C presentaron una concentración intracelular de 0,315 ($\pm$ 0,02)

nmol/μL/10^6células, mientras que las neuronas en déficit de vitamina C presentaron una concentración de 0,047 ($\pm$ 0,01) nmol/μL/10^6celulas. De esta forma, se validó el establecimiento del modelo celular con deficiencia de vitamina C para los análisis posteriores.

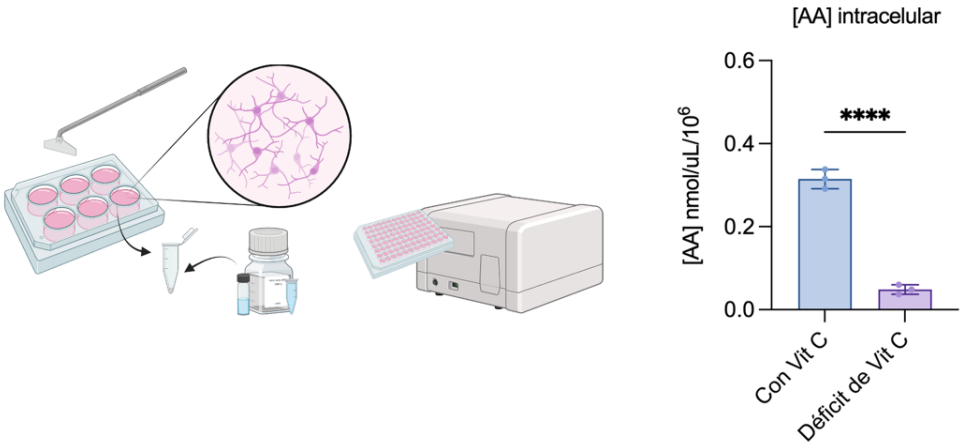


Figura 38. Disminución del contenido intracelular de AA en cMN bajo condiciones de déficit de vitamina C.

La concentración de AA intracelular fue determinado utilizando el ensayo colorimétrico EnzyChrom Ascorbic Acid Assay en cMN tratadas con y sin vitamina C. Los datos se presentaron como media $\pm$ SD. El análisis cuantitativo se realizó considerando un n=3 por condición, utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p****<0,0001.

Una vez confirmada la deficiencia de vitamina C en el modelo celular, se procedió a caracterizar las posibles cambios inducidos por esta condición mediante análisis inmunocitoquímico. Como primera aproximación, se utilizaron los

marcadores CHAT y tubulina-βIII para evaluar la morfología de estas neuronas. En ambas condiciones experimentales se identificaron neuronas positivas para ambos marcadores, permitiendo visualizar tanto el soma como la red de procesos neuronales (Figura 39A-F). Sin embargo, las neuronas mantenidas en condiciones de déficit de vitamina C presentaron una menor densidad de procesos neuronales en comparación con las neuronas suplementadas (Figuras 39B y 39D). La cuantificación del porcentaje de área de tinción positiva mostró una disminución significativa de ambos marcadores en las cMN sometidas a déficit de vitamina C (Figura 39G).

Posteriormente, se realizó un análisis de inmunocitoquímica utilizando los marcadores HB9 y MAP1B. La inmunotinción para HB9 se observó principalmente restringida a los núcleos y somas neuronales, mientras que MAP1B presentó una distribución predominantemente asociada a los procesos neuronales. Nuevamente, se determinó, en las neuronas sometidas a déficit de vitamina C, una menor densidad de procesos neuronales (Figura 39I, K). En consecuencia, el análisis cuantitativo mostró una disminución significativa en el porcentaje de área positiva tanto para el marcador HB9 como para el MA1B (Figura 39N).

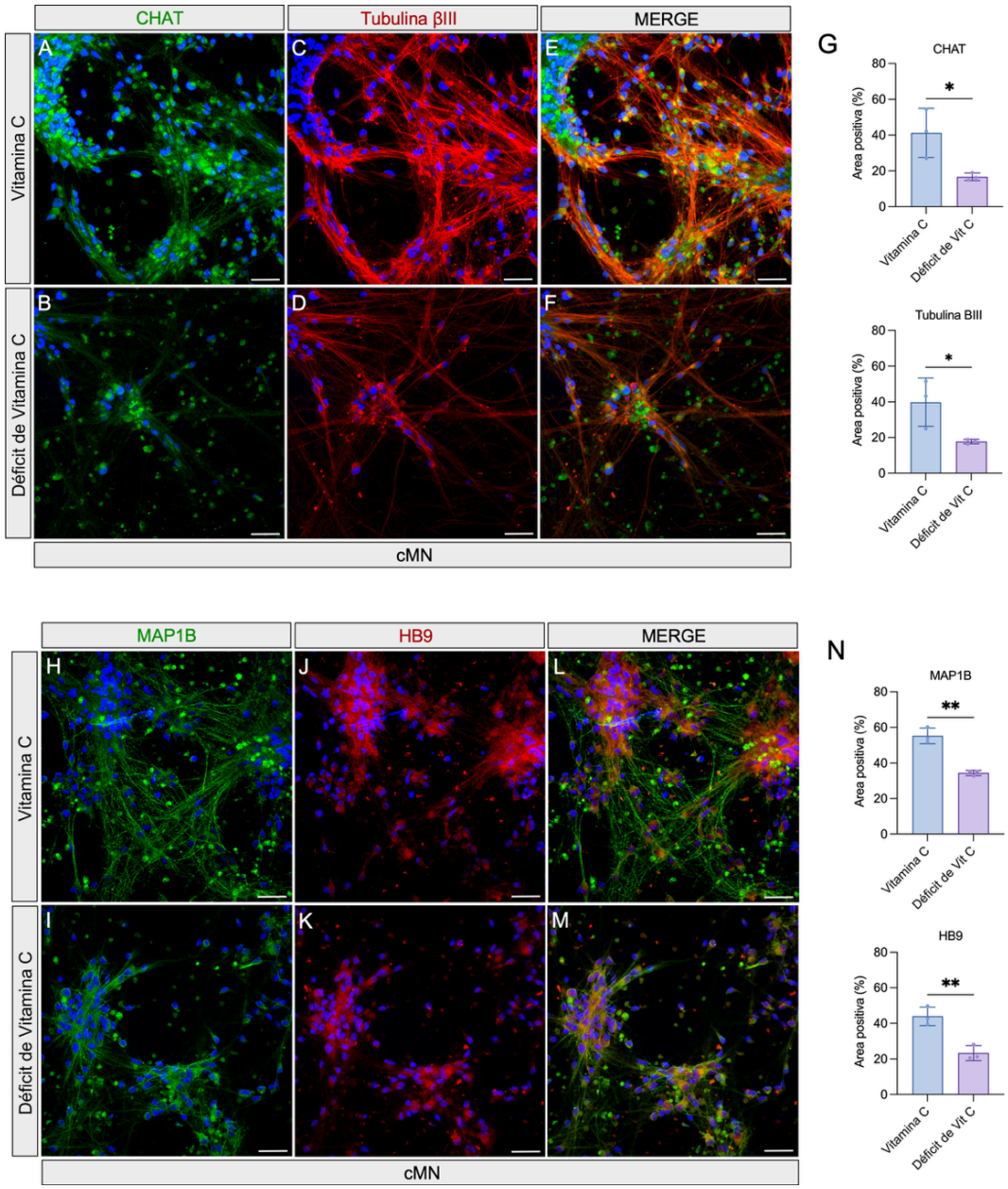


Figura 39. Alteraciones morfológicas de los procesos neuronales en las cMN en déficit de vitamina C.

Análisis de inmunocitoquimica con los marcadores neuronales CHAT (verde) **(A,B)** y tubulina-βIII (rojo) **(C,D)** en las cMN. Luego, se realizó un segundo análisis con los marcadores MAP1B (verde) **(A,B)** y HB9 (rojo) **(C,D)** en las cMN. Tinción nuclear:

Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(G)** Análisis cuantitativo del área positiva para CHAT y tubulina-βIII. (N) Análisis cuantitativo del área positiva para MAP1B y HB9. Las mediciones obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p*<0,05; p**<0,01.

De manera complementaria, se realizó un análisis mediante holotomografía, con el objetivo de realizar un seguimiento de los cambios morfológicos asociados a las neuronas motoras en déficit de vitamina C. Para ello, las células fueron incubadas en un medio deficiente en vitamina C y se adquirieron imágenes de las mismas células a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento.

Al inicio del tratamiento (0 horas), las células presentaron una morfología neuronal con múltiples procesos bien definidos de diferente calibre (Figura 40A). A las 24 horas, se observó una leve reducción de los procesos de menor calibre (Figura 40B). Luego, a las 48 horas, estos cambios fueron más evidentes, con una marcada disminución de los procesos neuronales (Figura 40C). Además, al observar otro plano de enfoque la misma imagen, se identificó la aparición de estructuras como ”burbujas” en la superficie celular (Figura 40D, flechas blancas), sugerentes de un proceso asociado muerte celular.

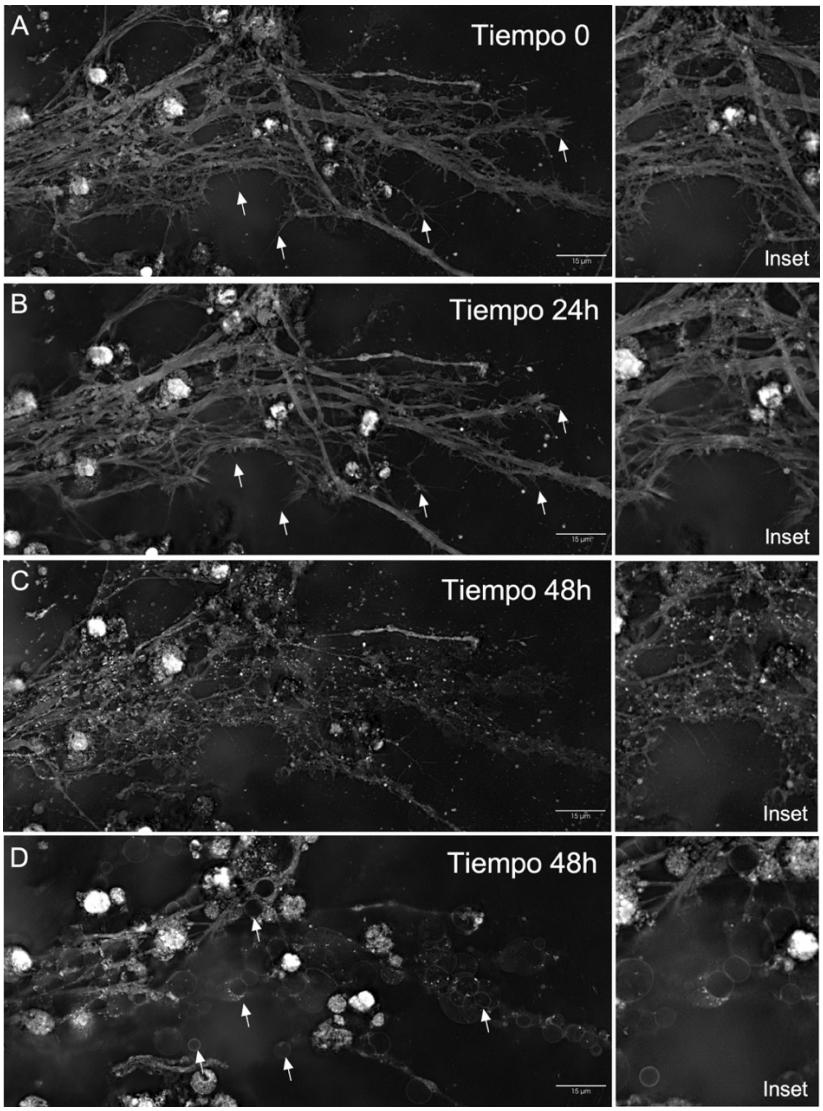


Figura 40. Seguimiento de la dinámica morfológica de neuronas motoras mediante holotomografía.

Las neuronas motora se analizaron a tiempo 0 **(A)** y luego tras 24 **(B)** y 48 **(C,D)** horas. Observando la distribución y morfología de los procesos neuronales (flecha blanca) en un tratamiento de déficit de vitamina C. Se determinó una disminución y alteración de procesos neuronales tras 48 horas de tratamiento deficiente en vitamina C. Barra de tamaño: 15 μm.

Dadas las alteraciones del RE previamente observadas en el modelo de cobayo escorbútico, se evaluó la inmunotinción de este organelo en las cMN. Para ello, se realizó un análisis de inmunocitoquímica con marcadores de RE, KDEL y PDI, una proteína chaperona encargada de la formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas.

En ambas condiciones experimentales se identificaron neuronas positivas para ambos marcadores. KDEL presentó una señal predominantemente localizada en los somas neuronales, con una distribución citoplasmática relativamente homogénea (Figura 41A,B). Por otro lado, PDI mostró una tinción más heterogénea, observándose señal tanto en los somas como en algunos procesos neuronales (Figura 41C,D). Al igual que en los análisis anteriores, las cMN mantenidas en déficit de vitamina C presentaron una menor densidad de células y reducción de los procesos neuronales, respecto a las células suplementadas. Sin embargo, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para KDEL y PDI no evidenció diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales (Figura 41G).

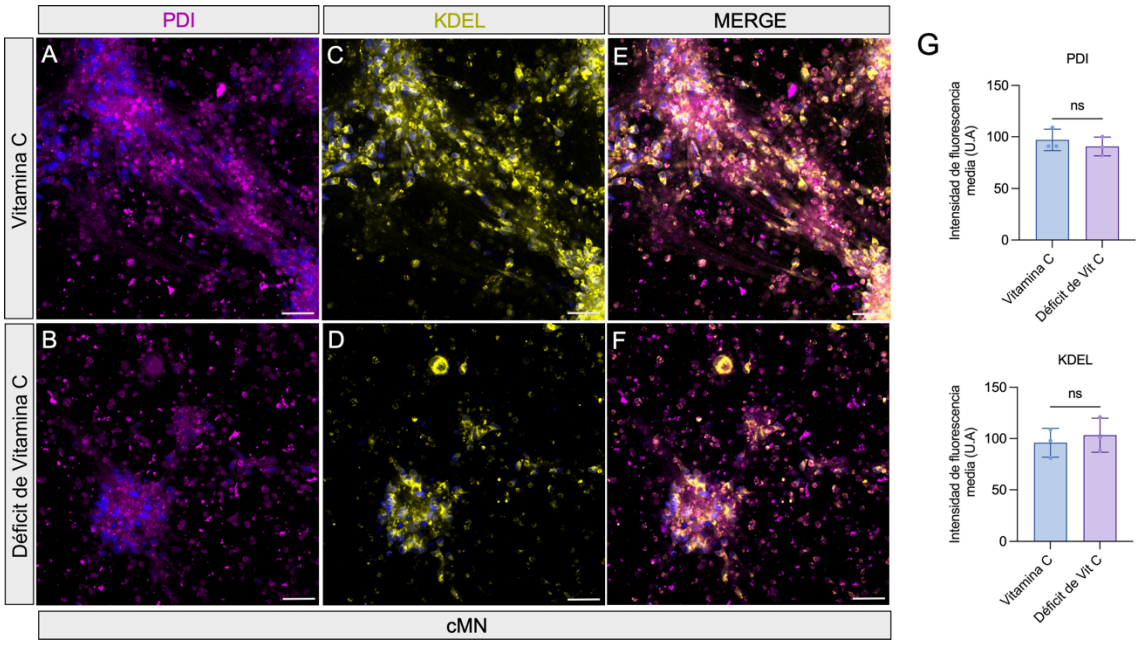


Figura 41. Caracterización inmunocitoquimica del RE en cMN sometidas a déficit de vitamina C.

Análisis de inmunocitoquímica con los marcadores reticulares PDI (magenta) **(A,B)** y KDEL (amarillo) **(C,D)** en las cMN. Tinción nuclear: Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(G)** Análisis cuantitativo intensidad de fluorescencia media para estos marcadores. Las mediciones obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media $\pm$ SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con ns = no significativo.

Adicionalmente y considerando el papel de la vitamina C como agente antioxidante, se evaluaron la expresión y la distribución de proteínas involucradas en la respuesta celular y en el estrés oxidativo. Para ello, se analizó a través de

inmunocitoquimica SOD1, enzima antioxidante que participa en la neutralización del anión superóxido, y p47PHOX, proteína del complejo NOX. Ambos marcadores se observaron positivos en las cMN, con una señal predominante en las agrupaciones neuronales. En las células suplementadas con vitamina C, la tinción presento una distribución difusa y homogénea, mientras que en las neuronas sometidas a déficit de vitamina C se observó un patrón de tinción más definido, lo que permitió distinguir señal asociada a algunos procesos neuronales. Sin embargo, la cuantificación de intensidad de fluorescencia no mostró diferencias significativas entre las condiciones experimentales para ninguno de los marcadores analizados (Figura suplementaria 4).

Con el fin de evaluar directamente la presencia y la distribución intracelular de ROS en estas células, se utilizaron de las sondas fluorescentes CellROX. En las neuronas suplementadas con vitamina C, se observó una señal fluorescente de tamaño heterogéneo localizada principalmente en los procesos neuronales y, en menor medida, en el soma (Figura 42A, flechas blancas). La distribución de estas estructuras presentó un patrón sugerente de mitocondrias. Por otro lado, las neuronas sometidas a déficit de vitamina C presentaron una menor intensidad de señal, tanto en el soma como en los procesos neuronales, junto con una marcada reducción en el tamaño de las estructuras positivas de aspecto puntiforme (Figura 42B). Estos datos sugieren que las mitocondrias podrían estar siendo fisionadas en las neuronas.

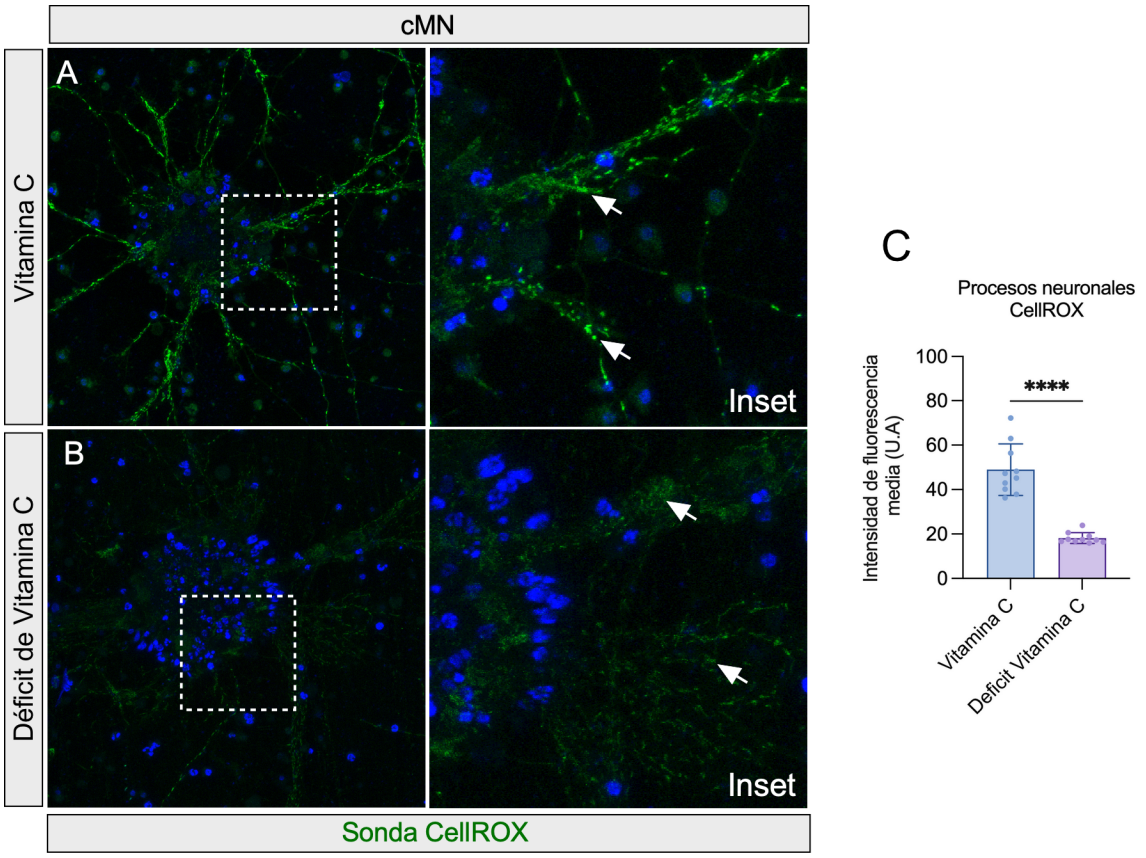


Figura 42. Distribución intracelular de la señal de CellROX en cMN suplementadas y deficientes en vitamina C.

Ensayo con la sonda CellROX (verde) en cMN suplementadas **(A)** y no suplementadas **(B)** con vitamina C. Se observa marcaje de la sonda de manera puntiforme en el soma y procesos neuronales, además de una disminución de la señal en las neuronas en déficit de vitamina C. Tinción nuclear: Hoechst (azul). **(C)** Análisis cuantitativo intensidad de fluorescencia media en los procesos neuronales. Los datos se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con ****p<0,0001.

Para intentar profundizar en este contexto, se realizó un análisis inmunocitoquímico utilizando los marcadores VDAC (proteína localizada en la membrana externa de la mitocondria) y DRP1 (dinamina involucrada en la fisión mitocondrial), en conjunto con el anticuerpo axonal MAP1B para identificación de los procesos neuronales.

En las neuronas suplementadas con vitamina C, MAP1B presentó una distribución predominantemente asociada a la red de procesos neuronales, lo que permitió visualizar y delimitar su organización (Figuras 43A,B). DRP1 y VDAC se localizaron principalmente en los somas neuronales, con una señal relativamente escasa en los procesos neuronales (Figura 43C ,E, I), similar a lo que se observó en los estudios con tejido de cobayo.

En condiciones de déficit de vitamina C, se observó un cambio en la distribución de ambos marcadores. DRP1 y VDAC mostraron una señal preferentemente localizada en los procesos neuronales (MAP1B positivos) (Figuras 43D, F, I, flechas blancas), lo que generó una colocalización entre ambos marcadores (Figura 43J). Estos resultados reproducen también lo observado en el tejido de animales escorbúticos. Por lo tanto, concluimos que DRP1 está asociado a las mitocondrias en condiciones de déficit de vitamina C, sugiriendo inducción de fisión mitocondrial.

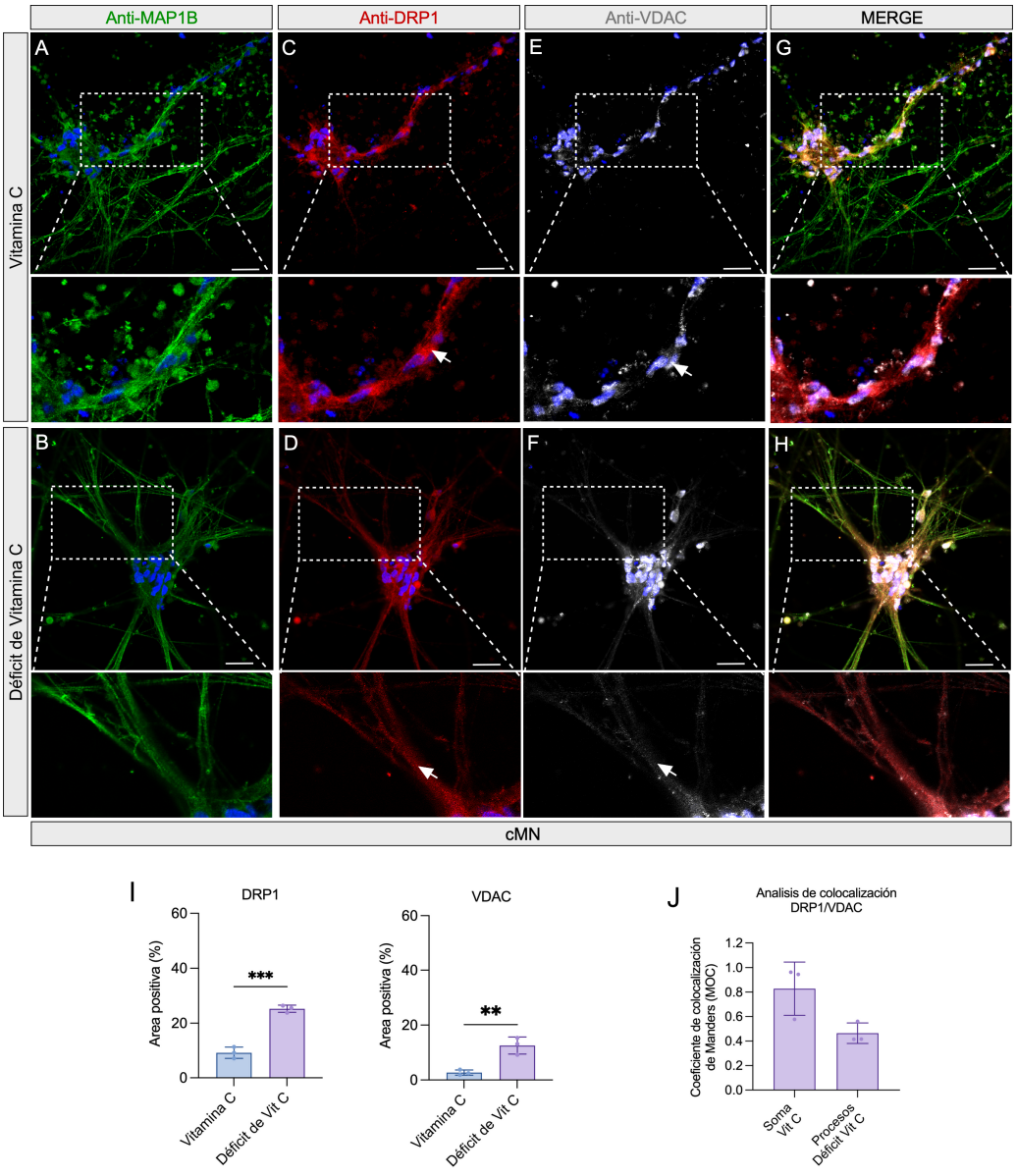


Figura 43. Redistribución de DRP1 y VDAC hacia los procesos neuronales MAP1B-positivos en cMN deficientes en vitamina C.

Análisis de inmunocitoquimica con los marcadores MAP1B (verde) **(A,B)**, DRP1 (rojo) **(C,D)** y VDAC (blanco) **(E,F)** en las cMN. Se observó tinción de los marcadores mitocondriales DRP1 y VDAC en los somas neuronales, mientras que MAP1B mostró

señal en los procesos de las cMN. Tinción nuclear: Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(I)** Análisis cuantitativo del área positiva para DRP1 y VDAC. **(J)** Análisis de colocalización de DRP1 sobre VDAC con el coeficiente de colocalización de Manders (MOC). Las mediciones obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p**<0,01; p***<0,001.

En conjunto, los resultados obtenidos en las cMN mostraron que el déficit de vitamina se asocia con una disminución de la densidad de los procesos neuronales. El análisis de CellROX sugirió una afectación mitocondrial, junto a una redistribución de los marcadores mitocondriales DRP1 y VDAC en los procesos neuronales, estando ambas proteínas colocalizadas. El tamaño de la red mitocondrial fue menor en déficit de vitamina C, lo que sugiere un procesos de fisión mitocondrial.

6.2.3 Análisis de neuronas motoras cervicales inducidas a déficit de vitamina C y exposición a daño oxidativo.

Considerando que el déficit de vitamina C se asoció a alteraciones en la organización neuronal y subcelular, se planteó evaluar la respuesta de las cMN deficientes en vitamina C frente a una condición de daño oxidativo. Para ello, una vez finalizada la maduración de las neuronas, estas fueron mantenidas durante

6 días en condiciones de suplementación o déficit de vitamina C. Posteriormente, ambas condiciones experimentales fueron expuestas a H_2O_2 durante 8 horas, con el fin de inducir un estado de estrés oxidativo. Estas condiciones experimentales fueron previamente descritas para inducción de estrés oxidativo en motoneuronas diferenciadas a partir de iPSC (Onda-Ohto et al., 2023).

Se realizó un análisis inmunocitoquímico para los marcadores neuronales CHAT y tubulina-βIII, cuya tinción está asociada a somas y procesos neuronales. En las neuronas suplementadas con vitamina C se observó una extensa red de procesos neuronales positivos para ambos marcadores, caracterizada por múltiples prolongaciones que se extendían desde los somas en diferentes direcciones (Figura 44A-C). En particular, la tinción para tubulina-βIII nos permitió visualizar en más detalle los procesos neuronales de menor calibre, evidenciando una red de prolongaciones finas que no fueron observadas a través la tinción para CHAT. En las neuronas que no fueron suplementadas con vitamina C, se observó una menor densidad de procesos neuronales en comparación con las cMN suplementadas, pero de igual manera se mantuvo una red de procesos relativamente extensa (Figura 44D-F).

Tras la exposición de daño oxidativo, se observó una reducción de la densidad de los procesos neuronales en ambas condiciones experimentales. En las neuronas suplementadas e incubadas con H_2O_2 se observó una disminución de

la red neuronal en comparación con las células no expuestas a daño oxidativo (Figura 44G-I). Este cambio fue aún más evidente en las neuronas sometidas simultáneamente a déficit de vitamina C y exposición de daño oxidativo, donde se observó una menor cantidad de procesos neuronales y la presencia de prolongaciones de menor longitud (Figura 44J-L). El análisis cuantitativo mostró una disminución significativa del área positiva para CHAT y tubulina-βIII en las cMN deficientes en vitamina C, tanto en ausencia como presencia de daño oxidativo, en comparación con las cMN suplementadas con vitamina C. Asimismo, se observó una diferencia significativa entre las cMN suplementadas con vitamina C y expuestas a H_2O_2, y aquellas deficientes en vitamina C y expuestas a H_2O_2 (Figura 44M).

Finalmente, se evaluó el efecto de la exposición al daño oxidativo sobre la distribución de los componentes asociados a la dinámica mitocondrial. Como se describió previamente, bajo condiciones de déficit de vitamina C, se observó una redistribución de la tinción para DRP1 y VDAC desde el soma hacia los procesos neuronales positivos a MAP1B (Figura 43). A partir de estas observaciones, a continuación evaluamos la respuesta de estos marcadores frente a la exposición a daño oxidativo.

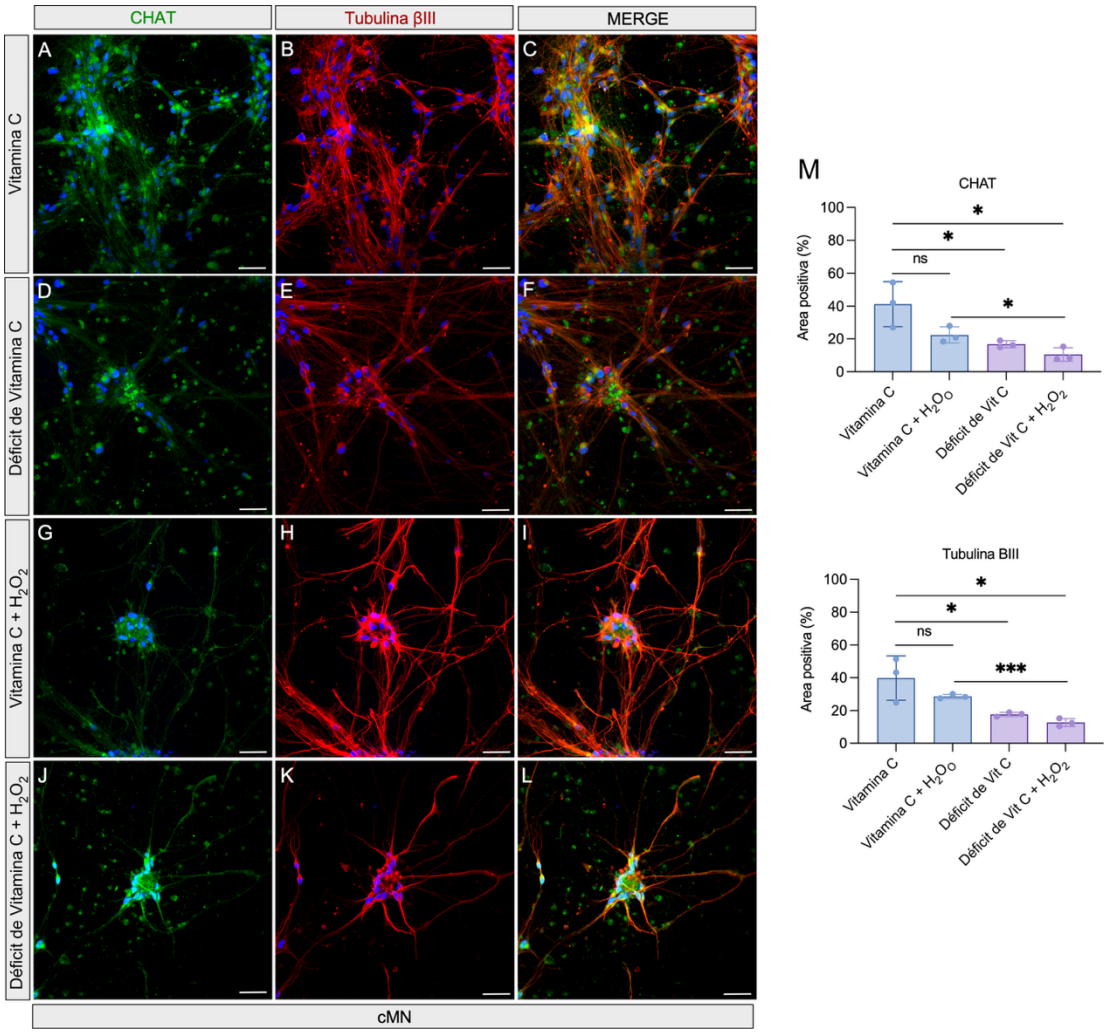


Figura 44. Alteraciones de la densidad y extensión de los procesos neuronales de cMN inducidas por el déficit de vitamina y daño oxidativo.

Análisis de inmunocitoquimica con los marcadores neuronales CHAT (verde) y tubulina-βIII (rojo) en las cMN. Se evaluaron las cMN mantenidas bajo condiciones de suplementación de vitamina C **(A-C)**, déficit de vitamina C **(D-F)**, suplementación con vitamina C y exposición a H_2O_2 **(G-I)**, y déficit de vitamina C y exposición a H_2O_2 **(J-L)**. Tinción nuclear: Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(G)** Análisis cuantitativo del área positiva para CHAT y tubulina-βIII. Las mediciones obtenidas corresponden a tres

diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p*<0,05; p***<0,001; ns = no significativo.

Para ello, se realizó un análisis de inmunocitoquímica utilizando los marcadores mitocondriales VDAC y DRP1, junto con el anticuerpo MAP1B como marcador de procesos neuronales. En las cMN suplementadas con vitamina C e incubadas con H_2O_2, la tinción para DRP1 se observó principalmente asociada a procesos positivos para MAP1B (Figura 45C). Por otro lado, VDAC presentó una baja tinción y distribución predominantemente difusa, aunque se identificaron agregados intensamente positivos de aspecto puntiforme, localizados en determinados procesos neuronales (Figura 45E, flechas blancas).

En las neuronas sometidas a déficit de vitamina C y exposición a daño oxidativo, MAP1B mantuvo una señal asociada a los procesos neuronales, aunque con una menor densidad de procesos de menor tamaño (Figura 45B). Se observaron algunos procesos DRP1 positivos (Figura 45D). Sin embargo, VDAC mostró una marcada reducción de la intensidad de la tinción, con un patrón predominantemente difuso y de baja intensidad, prácticamente indetectable en los procesos o somas neuronales (Figura 45F). El análisis cuantitativo mostró que, en las cMN suplementadas con vitamina C, la exposición a H_2O_2 generó un

aumento significativo del área positiva para ambos marcadores, incremento que también se observó en las cMN deficientes en vitamina C. Por otro lado, las cMN deficientes en vitamina C y tratadas con H_2O_2 no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, se observó una disminución para ambos marcadores al comparar las cMN con y sin vitamina C tratadas con H_2O_2 (Figura 45I).

En conjunto, la exposición a daño oxidativo genero una reducción en la densidad y extensión de los procesos neuronales, efecto que fue más evidente en las cMN sometidas a déficit de vitamina C. Además, el daño oxidativo indujo cambios en la distribución de DRP1 y VDAC, destacando la aparición de agregados VDAC positivos en los procesos neuronales en las cMN suplementadas con vitamina C y la escasa tinción observada en condiciones de déficit. Estos resultados sugieren que la suplementación de vitamina C podría influir en la capacidad de las cMN para mantener la organización neuronal y la distribución de componentes mitocondriales frente a un estímulo oxidativo.

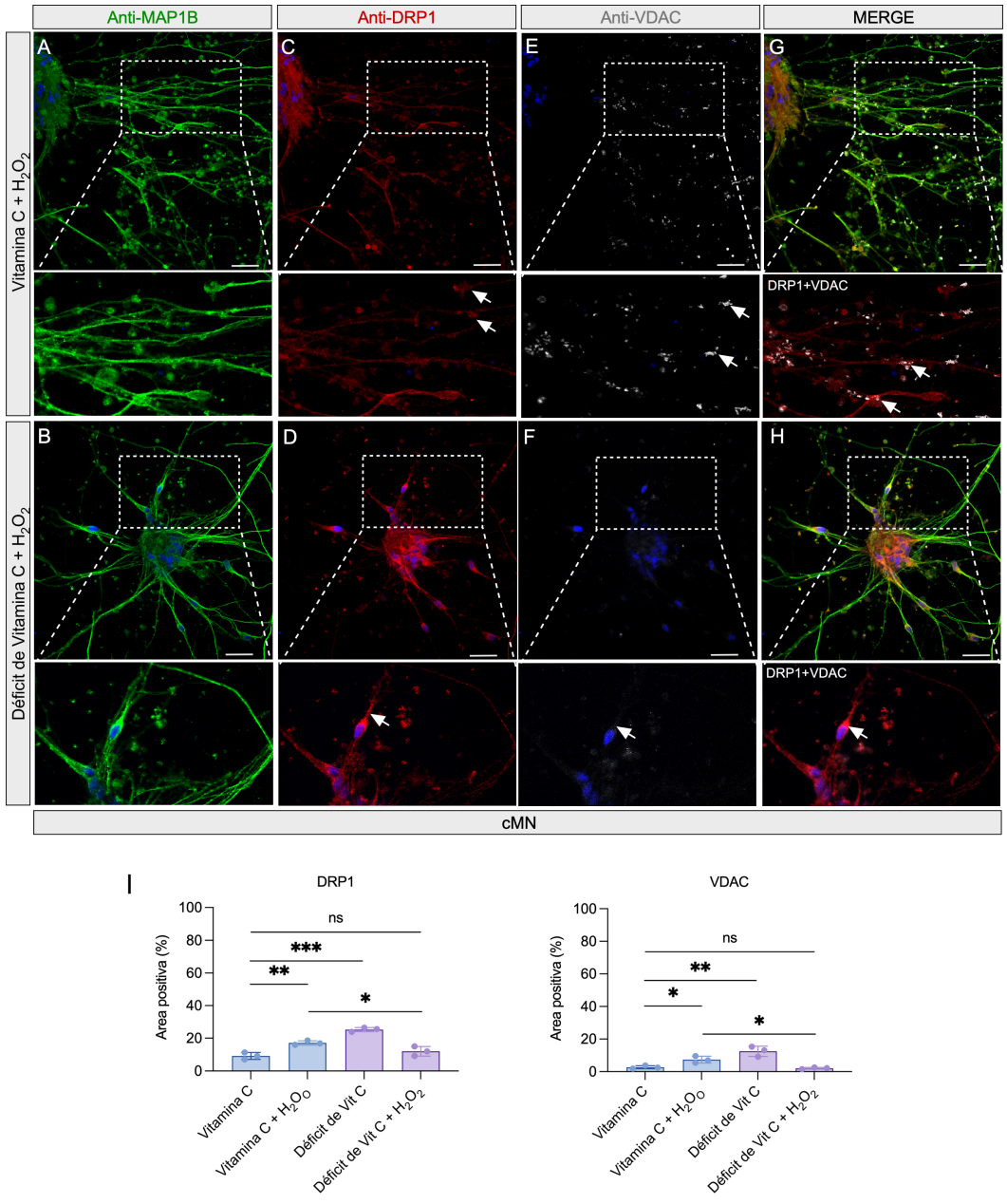


Figura 45. Distribución de DRP1 y VDAC en procesos neuronas de cMN sometidas a déficit de vitamina C y daño oxidativo.

Análisis de inmunocitoquimica con los marcadores MAP1B (verde) **(A,B)**, DRP1 (rojo) **(C,D)** y VDAC (blanco) **(E,F)** en las cMN. Se evaluaron las cMN mantenidas bajo

suplementación con vitamina C y exposición a H_2O_2 **(A,C,E,G)**, y déficit de vitamina C y exposición a H_2O_2 **(B,D,F,H).** Se observó tinción de los marcadores mitocondriales DRP1 y VDAC en los somas neuronales, mientras que MAP1B mostró señal en los procesos de las cMN. Tinción nuclear: Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(I)** Análisis cuantitativo del área positiva para DRP1 y VDAC. Las mediciones obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con p*<0,05; p***<0,001; ns = no significativo.

7. DISCUSIÓN

7.1 Vulnerabilidad de las neuronas motoras bulbares frente al déficit de vitamina C.

Para la primera parte del desarrollo de esta tesis, utilizamos al cobayo escorbútico como modelo experimental de deficiencia de vitamina C, debido a su incapacidad para sintetizar endógenamente esta vitamina, lo que los hace dependientes del aporte dietético. Asimismo, este modelo ha sido previamente vinculado a una afectación de las motoneuronas espinales (den Hartog Jager, 1985), lo que aporta un antecedente para el estudio de las alteraciones neurológicas asociadas al déficit de vitamina C.

Una dieta deficiente en vitamina C permitió establecer una condición escorbútica y evaluar sus efectos fisiológicos y neurológicos. A partir del día 21 de tratamiento, los animales presentaron una disminución del peso corporal, de la ingesta de alimento y de la frecuencia respiratoria, lo que estuvo acompañado de alteraciones en la evaluación del agarre y del enderezamiento, indicando un compromiso de la función motora y, particularmente, una posible afectación de la región bulbar. Estos hallazgos adquieren especial relevancia al considerar la participación del bulbo raquídeo en funciones motoras esenciales. En esta región se localizan núcleos de células neuronales asociados a los nervios glosofaríngeo, vago e hipogloso, involucrados en el control de la deglución, la respiración y otras

funciones viscerales. En particular, las motoneuronas de los núcleos ambiguo e hipogloso participan en el control de la musculatura faríngea, laríngea y lingual a través de los nervios vago e hipogloso. Además, el núcleo dorsal del vago contribuye al control parasimpático de la musculatura involuntaria de órganos como los bronquios, el corazón y el tracto gastrointestinal. Por otro lado, el núcleo del tracto solitario recibe e integra información proveniente de estas estructuras, contribuyendo a la coordinación de la respuesta respiratoria y de la deglución. Estas estructuras, junto con el núcleo espinal del trigémino, dan origen a los nervios craneales del bulbo raquídeo evaluados en este estudio (Hall, 2015; Krohn et al., 2023).

En este contexto, la presencia de alteraciones motoras plantea la posibilidad de que determinadas poblaciones neuronales del bulbo raquídeo sean más susceptibles al déficit de vitamina C. En este sentido, la vitamina C cumple un rol como uno de los principales antioxidantes del sistema nervioso, donde contribuye al mantenimiento del equilibrio redox y a la protección de las neuronas frente al daño oxidativo. Sin embargo, la generación de ROS no se distribuye de manera homogénea en el cerebro, y existen regiones que presentan una mayor actividad oxidativa basal. Entre ellas se encuentra el tronco encefálico, estructura que comprende al bulbo raquídeo, lo que podría implicar una mayor demanda de los mecanismos antioxidantes, para mantener la homeostasis redox, en estas

poblaciones celulares en particular (Harrison & May, 2009; Vinokurov et al., 2021).

Además, la disponibilidad de vitamina C puede variar entre las distintas poblaciones neuronales debido a la expresión diferencial del transportador SVCT2 en distintas regiones cerebrales. Previamente, se ha descrito que el bulbo raquídeo presenta una menor expresión de este transportador en comparación con regiones como la corteza cerebral, lo que podría contribuir a una menor disponibilidad de AA en determinadas regiones neuronales (Mun et al., 2006; Rao et al., 2014). Considerando estos antecedentes, nuestros resultados mostraron, en general, una baja expresión de SVCT2 en los tejidos cerebrales, donde además se observó una disminución del transportador en la corteza cerebral y en la médula espinal de los animales escorbúticos. Asimismo, en los núcleos bulbares evaluados, si bien no se observaron diferencias significativas en la inmunotinción de SVCT2, el análisis de hibridación in situ evidenció una disminución significativa del ARNm de SVCT2 en las neuronas bulbares de los animales escorbúticos. Estos resultados sugieren que el déficit de vitamina C puede afectar la expresión del transportador a nivel neuronal, lo que podría contribuir a una menor capacidad de captación de la vitamina C en estas células y, potencialmente, limitar su capacidad antioxidante en condiciones oxidativas.

Por otra parte, la evaluación del transportador SVCT2 en el tronco encefálico evidenció una respuesta astrocitaria frente al déficit de vitamina C, caracterizada por la presencia de astrocitos positivos para SVCT2. Los astrocitos participan en la mantención de la disponibilidad de vitamina C mediante la captación del DHA (AA oxidado) y su posterior reciclaje, contribuyendo a mantener AA disponible para las neuronas (Nualart et al., 2003). Además, estudios previos han demostrado que, tanto en condiciones *in vitro* como en contextos fisiopatológicos de estrés, los astrocitos pueden inducir la expresión de SVCT2 y, en consecuencia, la captación de AA (Berger & Hediger, 2000; Salazar et al., 2018). En este contexto, el incremento de astrocitos que expresan el transportador SVCT2 modifica la captación y reciclaje del AA, alterando la disponibilidad de este antioxidante para las neuronas y, eventualmente, aumentando su susceptibilidad frente el daño oxidativo.

Adicionalmente, se observaron múltiples astrocitos GFAP positivos en el tronco encefálico, cuya presencia nos indicaría una activación astrocítica frente al déficit de vitamina C. La astrogliosis reactiva es un proceso mediante el cual los astrocitos sufren cambios morfológicos y moleculares en respuesta a un daño o patología en el tejido nervioso (Escartin et al., 2021). Esta respuesta ha sido descrita en patologías neurodegenerativas como la ELA, en la que se ha observado un aumento de astrocitos reactivos en la médula espinal lumbar de ratones transgénicos SOD1-G93A (Rossi et al., 2008). En este modelo, además,

se ha descrito que los astrocitos activados adquieren un fenotipo neurotóxico en respuesta a factores secretados por la microglía, como factores IL-1α, TNFα y C1q, cuya inhibición se asoció con una extensión de la supervivencia de estos animales (Guttenplan et al., 2020). En nuestro modelo, la presencia de astrocitos reactivos en el tronco encefálico evidencia una respuesta astrocítica frente al déficit de vitamina C. En particular, en el núcleo dorsal del vago, se identificó una mayor presencia de procesos astrocíticos GFAP positivos rodeando los somas neuronales de los animales escorbúticos, lo que sugiere una respuesta localizada. Considerando que los astrocitos reactivos pueden adquirir características nocivas para las neuronas en determinadas condiciones patológicas, esta respuesta podría contribuir a las alteraciones neuronales observadas frente al déficit de vitamina C.

Entre las distintas poblaciones neuronales, las motoneuronas se consideran particularmente vulnerables al estrés oxidativo dadas sus características morfológicas y su elevada demanda energética (Shaw & Eggett, 2000). En este contexto, la presencia y el mantenimiento de los mecanismos antioxidantes resultan fundamentales para preservar la homeostasis redox de estas células, cuya alteración podría favorecer la acumulación de especies reactivas y, en consecuencia, la generación de daño oxidativo, un proceso ampliamente descrito como mecanismo patológico en las MND. En este sentido, se ha descrito que los pacientes con ELA presentan niveles séricos más bajos de vitamina C, lo que

podría indicar una disminución de la capacidad antioxidante en esta patología (Barber et al., 2006; Wang et al., 2020).

En este contexto, nuestros resultados en el modelo de cobayo escorbútico mostraron una menor cantidad de neuronas en el núcleo del tracto solitario, pero en mayor medida en el núcleo dorsal del vago. Este último corresponde a un centro viscero-motor, cuyas neuronas originan fibras parasimpáticas eferentes que forman parte del componente motor del nervio vago y participan en la regulación de diversas funciones viscerales como la actividad gastrointestinal, cardíaca y respiratoria (Ma et al., 2025; Purves, 2017). Esta mayor susceptibilidad resulta particularmente relevante, dado que se ha descrito que las neuronas del núcleo dorsal del vago presentan una mayor vulnerabilidad al daño oxidativo en comparación con otras poblaciones neuronales colinérgicas (Musgrove et al., 2019). Por lo tanto, una menor cantidad de neuronas observadas en esta región bajo un déficit de vitamina C, podría estar relacionada con su particular susceptibilidad frente a condiciones de estrés oxidativo y asociada a la pérdida de la protección antioxidante proporcionada por la vitamina C.

7.2 Alteraciones de la homeostasis del RE neuronal asociadas al déficit de vitamina C.

A nivel subcelular, la tinción histológica de Nissl proporcionó un primer indicio de alteraciones en la organización de RE, particularmente en las poblaciones

neuronales del hipogloso, dorsal del vago y del tracto solitario, donde se observó una disminución del marcaje de los cuerpos de Nissl. Considerando que estos corresponde principalmente a estructuras del RE y ribosomas, esta disminución podría reflejar modificaciones en la organización o la abundancia de los mecanismos asociados a la síntesis proteica.

En este sentido, resulta particularmente relevante el incremento de la inmunotinción para KDEL observado en las neuronas escorbúticas. KDEL corresponde a una secuencia de retención presente en diversas proteínas residentes del RE, incluidas chaperonas y otras proteínas involucradas en el control de calidad proteico. Por lo tanto, el aumento de esta señal podría reflejar modificaciones en la abundancia, distribución o retención de estas proteínas en el RE, lo cual podría deberse a una alteración en el equilibrio de la síntesis, plegamiento o eliminación de proteínas dentro de este organelo (X. Chen et al., 2023; Perri et al., 2015; Wires et al., 2021).

Por otro lado, el análisis mediante TEM permitió caracterizar con mayor detalle las alteraciones estructurales del RE en neuronas deficientes en vitamina C, evidenciando una desorganización y dilatación de sus cisternas. La dilatación del RE ha sido descrita en modelos de daño neuronal, como la hipoxia-isquemia neonatal, donde se ha observado mediante TEM como parte de las alteraciones estructurales asociadas a la activación de la respuesta a estrés del RE y la UPR

(Chavez-Valdez et al., 2016; X. Chen et al., 2023). En nuestro modelo, la presencia de cisternas dilatadas y desorganizadas, junto con la disminución de la tinción de los cuerpos de Nissl y el incremento de la inmunotinción para KDEL, sugiere que el déficit de vitamina C altera la homeostasis del RE, y que estas modificaciones podrían estar relacionadas con alteraciones en el procesamiento de las proteínas, incluyendo cambios en la distribución o retención de proteínas residentes KDEL-positivas.

Adicionalmente, el análisis proteómico del bulbo raquídeo nos proporcionó evidencias a nivel molecular que complementan las alteraciones del RE observadas mediante los análisis histológicos y ultraestructurales. En particular, una de las principales vías enriquecidas fue el procesamiento de proteínas en el RE, donde se observó una menor expresión de proteínas asociadas a este proceso. Entre las proteínas diferencialmente expresadas asociadas a esta vía se identificaron GRP78/BiP y Sec13, cuyos cambios podrían estar relacionados con alteraciones de la homeostasis del RE y del tráfico intracelular de proteínas. GRP78, también llamada BiP, es una proteína chaperona residente del RE que participa en el reconocimiento y el procesamiento de proteínas mal plegadas y en la regulación de la UPR. En condiciones de estrés reticular, la acumulación de proteínas mal plegadas, que presentan regiones hidrofóbicas normalmente ocultas en su estructura, favorece su reconocimiento por GRP78 y la liberación de esta chaperona de los tres sensores de estrés de la UPR (PERK, IRE1, ATF6),

promoviendo su activación. La activación de esta respuesta reduce temporalmente la síntesis de proteínas, aumenta la expresión de chaperonas, expande el RE y favorece la eliminación de las proteínas mal plegadas (Jeon et al., 2023; Ong & Logue, 2023). Se ha demostrado que la inhibición de esta proteína en células de Purkinje, produjo activación de la UPR y dilatación pronunciada del RE (Wang et al., 2010). En este contexto, la disminución de GRP78 observada bajo en déficit de vitamina C podría comprometer el reconocimiento y procesamiento de proteínas mal plegadas, limitando la capacidad adaptativa de las neuronas frente a una alteración sostenida de la homeostasis del RE, y generando acumulación de estas proteínas y un agrandamiento del RE.

Por otro lado, SEC13 es una proteína que forma parte de la cubierta de las vesículas COPII, involucradas en el transporte de proteínas recién sintetizadas desde el RE hacia el aparato de Golgi, y del complejo del poro nuclear, que regula el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (Niu et al., 2014). En este contexto, la menor expresión de Sec13 observada en escorbuto podría estar relacionada con alteraciones del tráfico intracelular de proteínas, lo que contribuiría a una acumulación de proteínas en el RE. Esta función es particularmente relevante en las neuronas con largos axones, como las neuronas motoras, que presentan una elevada demanda de transporte de proteínas necesarias para mantener su estructura y función (Wu et al., 2025).

7.3 Alteraciones en la organización y estructura de la vaina de mielina en neuronas deficientes en vitamina C.

El análisis mediante TEM evidenció alteraciones en la organización de la vaina de mielina de los axones del bulbo raquídeo de los animales escorbúticos, con discontinuidades y pérdida de compactación. La mielina cumple un papel fundamental en la conducción eficiente de los potenciales de acción y la protección estructural de los axones, por lo que alteraciones en su organización comprometen la transmisión del impulso nervioso (Stadelmann et al., 2019). La estructura de la mielina presenta una elevada proporción de lípidos, los cuales son susceptibles a oxidación. Por lo tanto, un aumento prolongado de ROS podría favorecer la peroxidación lipídica y alterar las propiedades estructuras de las membranas que conforman la vaina de mielina (Xu et al., 2024).

Las alteraciones estructurales observadas podrían estar relacionadas con los cambios detectados en el análisis proteómico, en el que se determinó un enriquecimiento de las vías asociadas a una menor expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de esteroides. En este contexto, el colesterol constituye uno de los principales componentes de la mielina ya que le otorga organización, estabilidad y compactación a sus membranas (Luoma et al., 2015). Entre las proteínas diferencialmente expresadas de esta vía, destaca la disminución de la proteína DHCR24, identificada como una de las diez con mayor reducción de expresión en el análisis proteómico. DHCR24 corresponde a una

enzima involucrada en la etapa final de la biosíntesis del colesterol, en la que cataliza la reducción del doble enlace del desmosterol para generar colesterol (Zhu et al., 2026). En este sentido, la disminución de DHCR24 podría reducir la disponibilidad de colesterol necesario para mantener la organización de la mielina.

Por otra parte, la disminución de la proteína Sec13, determinada mediante análisis proteómico, podría estar relacionada con alteraciones en procesos asociados a los oligodendrocitos. Sec13 forma parte del complejo COPII y participa en el tráfico intracelular de proteínas. Sin embargo, se ha descrito que esta proteína es fundamental para la diferenciación de progenitores de oligodendrocitos y para los procesos de mielinización y desmielinización posteriores a una lesión (Liu et al., 2022). En este contexto, la disminución de Sec13 en nuestro modelo podría alterar procesos dependientes del tráfico y distribución de proteínas necesarios para la función glial y, potencialmente, comprometer la capacidad de las células oligodendrocíticas para mantener o reparar la vaina de mielina.

7.3 Alteraciones asociadas a la fragmentación mitocondrial en déficit de vitamina C.

Subcelularmente, los resultados obtenidos evidencian que el déficit de vitamina C no solo se asocia con alteraciones en la homeostasis del RE, sino también con

cambios en la organización y distribución de las mitocondrias neuronales. En el bulbo raquídeo de los animales escorbúticos, el análisis mediante TEM permitió identificar mitocondrias de menor tamaño, sugerentes de fraccionamiento mitocondrial, y estructuras de doble membrana compatibles con un proceso de mitofagia.

Las mitocondrias constituyen una de las principales fuentes celulares de especies reactivas. En condiciones fisiológicas, los niveles de ROS están regulados por los sistemas antioxidantes de las neuronas, que permiten mantener la homeostasis redox. La vitamina C constituye un componente esencial de la defensa antioxidante neuronal, por lo que su disminución podría favorecer un aumento del estrés oxidativo y, potencialmente, alterar el funcionamiento neuronal. En este sentido, las alteraciones morfológicas observadas en las mitocondrias podrían representar tanto una consecuencia del estrés oxidativo generado durante el déficit de vitamina C, como una respuesta adaptativa frente a un funcionamiento deficiente (W. Chen et al., 2023).

En este contexto, la presencia de mitocondrias de menor tamaño podría ser indicativa de modificaciones en el equilibrio entre la fisión y la fusión mitocondrial. La fisión o fraccionamiento de las mitocondrias es un proceso mediante el cual se generan fragmentos de mitocondrias dañadas o funcionalmente comprometidas, que posteriormente son reconocidos y eliminados por mitofagia

(Basak & Holzbaur, 2025; Knott et al., 2008). En este proceso, la proteína DRP1 desempeña un papel fundamental al participar en la división de la membrana mitocondrial (Li et al., 2024). La alteración de este mecanismo ha sido descrita en el contexto de la ELA, donde se ha observado una fragmentación mitocondrial asociada a una hiperactivación patológica de DRP1 (Joshi et al., 2018).

En nuestro modelo, los tejidos control presentaron una tinción para DRP1 predominantemente asociada a los somas neuronales. Sin embargo, en un déficit de vitamina C se observó una redistribución de esta proteína hacia los procesos neuronales, colocalizando con el marcador mitocondrial VDAC, una proteína abundante en la membrana externa de la mitocondria que participa en el intercambio de metabolitos entre la mitocondria y el citoplasma. En ese sentido, el incremento de la señal de DRP1 y su redistribución hacia los procesos neuronales podrían reflejar modificaciones en el mecanismo de fisión mitocondrial en estas neuronas. Por otra parte, el aumento de la señal de VDAC en determinados núcleos neuronales, junto con una redistribución de VDAC y DRP1 hacia los procesos neuronales, sugiere modificaciones en la organización y distribución de las mitocondrias en estas estructuras. Esta distribución resulta particularmente relevante en las neuronas, ya que la presencia de mitocondrias en axones y dendritas permite satisfacer las demandas energéticas locales y contribuir a procesos como la regulación del calcio y la mantención del potencial de membrana. Por lo tanto, esta redistribución observada podría eventualmente

representar una respuesta frente a un aumento de la demanda metabólica en los procesos neuronales o, de otra forma, una alteración de los mecanismos que regulan el transporte y localización de las mitocondrias (Cai & Sheng, 2009).

Asimismo, las observaciones obtenidas mediante TEM permitieron identificar estructuras de doble membrana compatibles con estructuras autofágicas asociadas a mitocondrias. Estas observaciones podrían ser indicativas de la participación de mecanismos de control de calidad mitocondrial, particularmente de la mitofagia, mediante la cual las células reconocen y eliminan mitocondrias dañadas para evitar su acumulación y limitar la generación de ROS (Shoshan-Barmatz et al., 2020; Wang et al., 2019).

7.4 Modelo *in vitro* vs *in vivo* ante un déficit de vitamina C.

Las iPSC se han establecido como una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de procesos asociados a enfermedades neurodegenerativas, debido a su capacidad para generar diferentes tipos celulares humanos. En particular, la diferenciación dirigida de iPSC hacia neuronas motoras permite estudiar alteraciones celulares y moleculares que pueden resultar difíciles de abordar directamente en tejido humano (Bianchi et al., 2018). En este contexto, el uso de un modelo de motoneuronas humanas constituye otra aproximación al modelo *in vivo* de deficiencia de vitamina C.

Una vez establecido el proceso de diferenciación, los cambios morfológicos observados, junto con la expresión de los marcadores neuronales tubulina-βII y MAP2, y de los marcadores asociados al fenotipo de motoneurona HB9 y CHAT, permitieron caracterizar la obtención de neuronas motoras. Además, el patrón de expresión génica obtenido mediante RT-PCR convencional, con resultados positivos únicamente para los genes HOXB4, HOXC5 y HOXC6, permitió establecer la identidad cervical de estas neuronas y validar el modelo obtenido (Yang et al., 2023).

En las motoneuronas humanas cultivadas, tanto sMN como cMN, el déficit de vitamina C se asoció principalmente con alteraciones en la organización y la densidad de los procesos neuronales, lo que sugiere que la disponibilidad de vitamina C contribuye al mantenimiento de la arquitectura neuronal. De acuerdo con estas observaciones, en cultivos de neuronas corticales y líneas de células neuronales, se ha descrito que la sobreexpresión del transportador de vitamina C SVCT2 favorece la arborización neuronal (Salazar et al., 2021). En este contexto, la relación entre la organización de los procesos neuronales podría estar mediada por la disponibilidad de la vitamina C. Adicionalmente, en el modelo de cobayo escorbútico se determinó una disminución en la inmunotinción del marcador de microtúbulos tubulina-βIII en las neuronas del núcleo hipogloso y dorsal del vago, principalmente a nivel del soma neuronal. Si bien estas alteraciones no fueron idénticas en ambos modelos experimentales, en conjunto

sugieren que el déficit de vitamina C puede afectar la organización y la estructura de las neuronas.

Sin embargo, también deberían considerarse las diferencias entre ambos modelos experimentales. En el modelo de cobayo escorbútico, la deficiencia de vitamina C se estableció durante varias semanas y estuvo acompañada de un deterioro fisiológico progresivo de los animales, mientras que las células cultivadas fueron sometidas a una deficiencia de vitamina C durante un periodo relativamente corto de 6 días. Por lo tanto, los cambios observados en el cultivo celular probablemente representan respuestas celulares tempranas y no necesariamente reproducen la totalidad de las alteraciones observadas en el estado escorbútico prolongado. En ese sentido, la reducción de la densidad de procesos neuronales podría constituir una de las primeras manifestaciones de la alteración celular, mientras que manifestaciones más complejas como la alteración de la homeostasis del RE, podrían requerir de una exposición más prolongada.

Adicionalmente, otro aspecto relevante fue la ausencia de cuerpos de Nissl en las neuronas cultivadas. A diferencia del tejido nervioso, en el que los cuerpos de Nissl permitieron identificar alteraciones en su distribución y organización, las características del cultivo celular, incluida la formación de agrupaciones neuronales y neuroesferas, no permitieron evaluar este componente mediante la

misma aproximación histológica. En consecuencia, no fue posible determinar si las alteraciones de los cuerpos de Nissl observadas en el modelo de cobayo escorbútico también se reproducen en las motoneuronas cultivadas *in vitro*.

Por otro lado, el análisis de CellROX y de los marcadores mitocondriales DRP1 y VDAC evidenció alteraciones en la organización de las mitocondrias bajo condiciones de déficit de vitamina C. La evaluación mediante CellROX permitió observar diferencias en la organización de estructuras celulares positivas para ROS entre las condiciones experimentales. En las cMN suplementadas con vitamina C, la señal presentó una distribución principalmente asociada a los procesos neuronales y un patrón sugerente de estructuras mitocondriales. En contraste, las células sometidas a un déficit de vitamina C mostraron una disminución de la intensidad de la señal y adquirieron un aspecto puntiforme. Estos cambios en el patrón de distribución de la señal sugieren una alteración en la organización mitocondrial, posiblemente asociada a un aumento en la fragmentación de estos organelos. En paralelo, las modificaciones observadas en la distribución de DRP1 y VDAC podrían estar relacionadas con un incremento de la fisión mitocondrial, mientras que VDAC podría sugerir modificaciones en la distribución de las mitocondrias. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas en el modelo de cobayo escorbútico donde se observaron mitocondrias de menor tamaño y una redistribución de DRP1 y VDAC hacia los procesos neuronales.

Para complementar esta evaluación, se analizó el efecto del déficit de vitamina C en relación con la inducción del daño oxidativo. La exposición al daño oxidativo indujo modificaciones en la organización de los procesos neuronales, evidenciadas por una reducción de su densidad. Este efecto fue aún más evidente en las cMN deficientes en vitamina C, sugiriendo que la ausencia de este antioxidante podría disminuir la capacidad de estas neuronas para mantener su organización estructural frente a un estímulo oxidativo. Asimismo, bajo estas condiciones, se observaron modificaciones en la distribución de DRP1 y VDAC, con una respuesta diferencial según la disponibilidad de vitamina C. En las cMN suplementadas, el daño oxidativo generó una redistribución de DRP1 hacia los procesos y la aparición de algunas estructuras positivas para VDAC. En cambio, las cMN deficientes en vitamina C y expuestas a daño oxidativo presentaron una señal prácticamente ausente de VDAC y una marcada disminución de la señal de DRP1, lo que sugiere que el déficit de vitamina C compromete la capacidad de las neuronas motoras para mantener la organización mitocondrial frente a un estímulo oxidativo.

En conjunto, los resultados obtenidos en los diferentes modelos experimentales demuestran que el déficit de vitamina C provoca alteraciones que afectan múltiples componentes de la homeostasis neuronal (Figura 46).

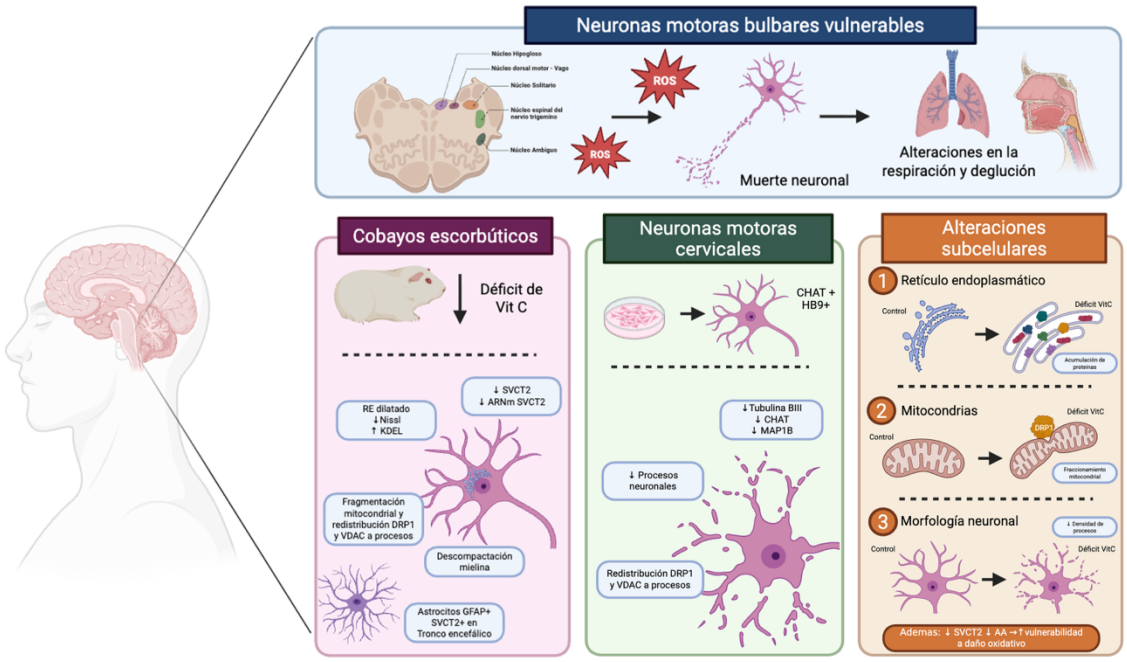


Figura 46. Esquema resumen de las alteraciones neuronales asociadas al déficit de vitamina C.

Esquema integrativo de los principales hallazgos obtenidos en el modelo de cobayo escorbútico y en el modelo de motoneuronas *in vitro*. Se resumen las alteraciones observadas en la disponibilidad y captación de la vitamina C, la arquitectura neuronal, la homeostasis del RE y la organización de las mitocondrias. En conjunto, estos hallazgos proponen que la disminución de la disponibilidad de vitamina C y de la protección antioxidante podría comprometer distintos mecanismos de homeostasis neuronal y aumentando la susceptibilidad de estas neuronas frente a condiciones de estrés oxidativo.

8. CONCLUSIONES

1) El modelo de cobayo escorbútico presentó deterioro en la función motora, acompañado de una menor cantidad de neuronas en el bulbo raquídeo, particularmente del núcleo dorsal del vago. Además, se observó una disminución del transportador de vitamina C SVCT2 y de su ARNm en el tejido nervioso. Sin embargo, en el tronco encefálico se observaron astrocitos SVCT2+, lo que compromete el reciclaje de AA en esta región.
2) A nivel subcelular, se determinó una dilatación y un agrandamiento de las cisternas del RE mediante TEM, acompañados de una disminución de los cuerpos de Nissl y un incremento de la inmunotinción para KDEL, lo que indica una alteración en la homeostasis reticular.
3) A nivel mitocondrial, se identificaron mitocondrias de menor tamaño y una redistribución de la inmunotinción de DRP1 y VDAC hacia los procesos neuronales, junto con la presencia de mitocondrias con doble membrana compatibles con un proceso de mitofagia.
4) En el modelo celular de cMN se evidenció una alteración en la organización de los procesos neuronales y en la distribución de los marcadores mitocondriales bajo déficit de vitamina C, la cual fue más evidente en exposición a daño oxidativo. De esta forma, el modelo celular *in vitro* se complementa con los análisis del modelo *in vitro* del cobayo escorbútico.

9. ANEXO

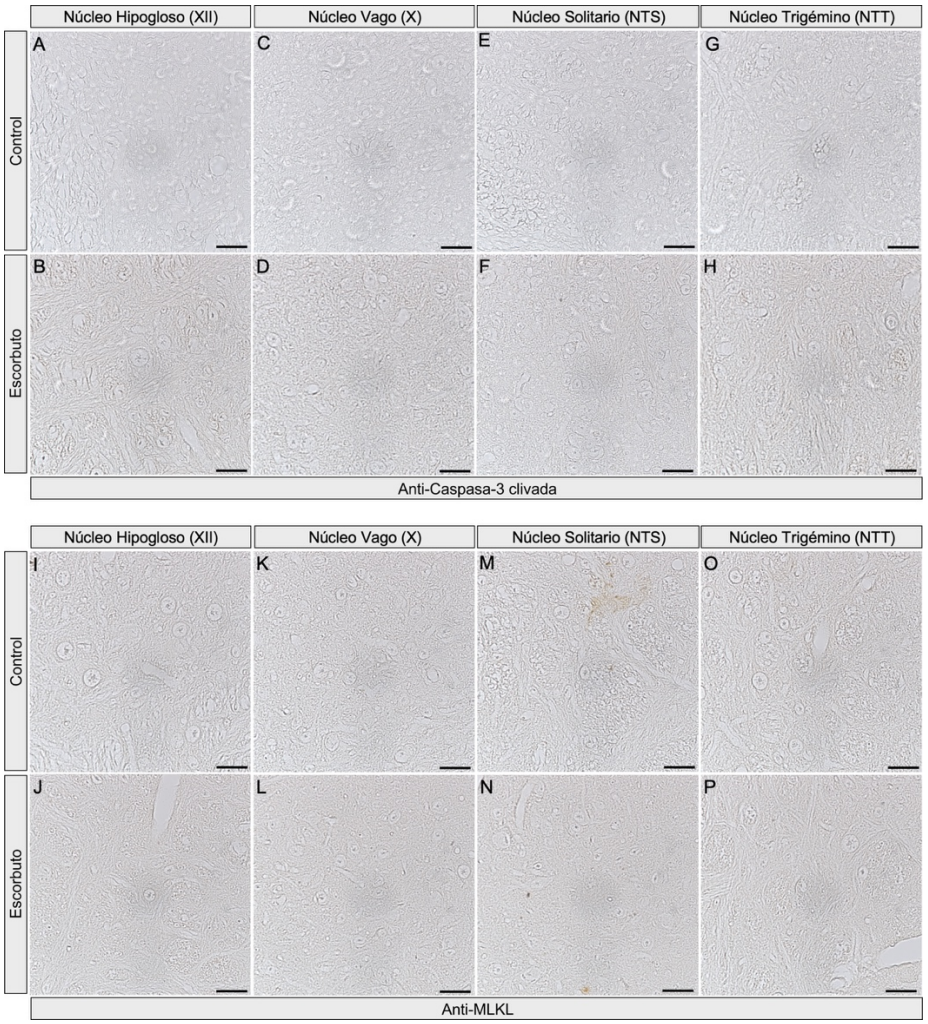


Figura suplementaria 1. Análisis de inmunohistoquímica para los marcadores de muerte celular, Caspasa-3 clivada y MLKL, en bulbo raquídeo de cobayos escorbúticos.

Análisis de inmunohistoquímica con los marcadores Caspasa-3 clivada **(A-H)** y MLKL **(I-P)** en bulbo raquídeo de cobayos control y escorbútica. No se observó inmunotinción para ninguno de los marcadores en ambas condiciones experimentales. Barra de tamaño: 50 μm

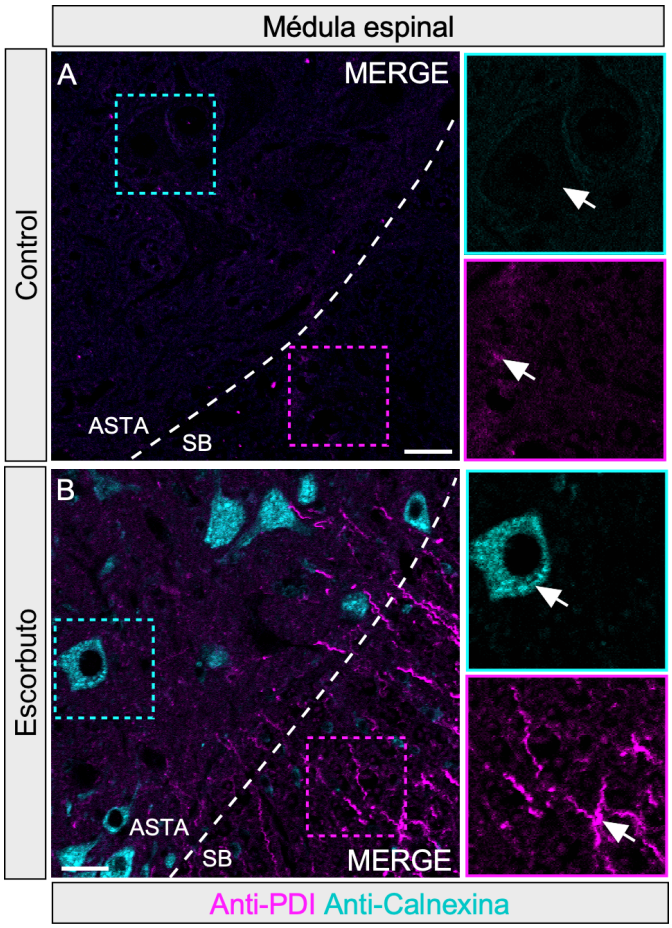


Figura suplementaria 2. Análisis de inmunofluorescencia para Calnexina y PDI en médula espinal de cobayos escorbúticos.

Análisis de fluorescencia con los marcadores Calnexina (cian) y PDI (Magenta) en médula espinal control **(A)** y escorbútica **(B)**. Se observó un incremento de tinción para Calnexina en el soma de las neuronas escorbúticas, mientras que PDI se observó positivo en la sustancia blanca de medula espinal. Barra de tamaño: 20 μm.

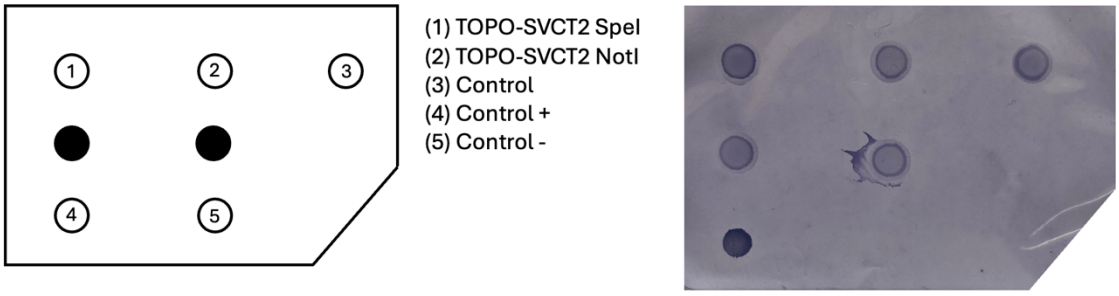


Figura suplementaria 3. *Dot blot* de ácidos nucleicos para la sonda SVCT2 sentido (SN, NotI) y antisentido (AS, SpeI).

Ensayo de Dot blot para verificación de la correcta linealización de la sonda TOPO-SVCT2 para el análisis de hibridación *in situ*. Se evaluó en (1) la sonda AS (TOPO-SVCT2 SpeI) y (2) la sonda SN (TOPO-SVCT2 NotI), así como los controles positivos (3) y (4) y negativo (5) de la sonda y el kit de ensayo. El análisis confirmó la correcta obtención de la sonda.

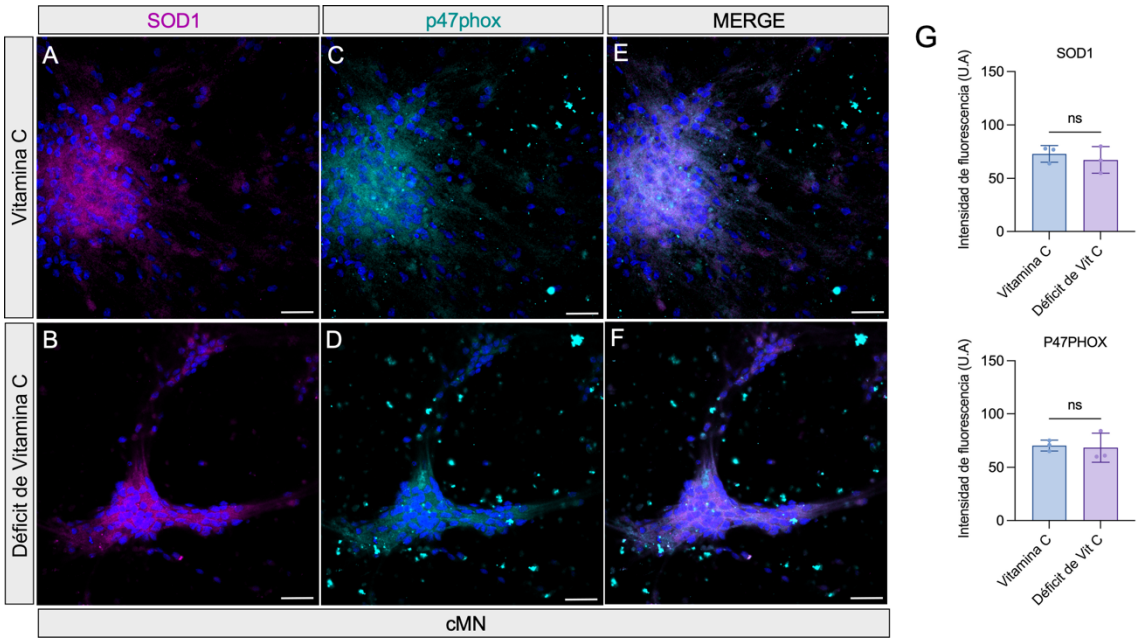


Figura suplementaria 4. Caracterización inmunocitoquimica de proteínas asociadas a la homeostasis redox en cMN, sometidas a déficit de vitamina C.

Análisis de inmunocitoquimica con los marcadores SOD1 (magenta) **(A,B)** y p75PHOX (cian) **(C,D)** en las cMN. Tinción nuclear: Hoechst (azul). Barra de tamaño: 20 μm. **(G)** Análisis cuantitativo intensidad de fluorescencia para estos marcadores. Las mediciones obtenidas corresponden a tres diferentes campos de observación a partir de un mismo análisis para cada condición experimental y se presentaron como media ± SD. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un t-test no emparejado de dos colas. Con ns = no significativo.

10. BIBLIOGRAFÍA

Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, *2014*, 360438. https://doi.org/10.1155/2014/360438

Ayna, A., Caglayan, C., & Taysi, S. (2025). Cellular and Molecular Mechanisms of Oxidative DNA Damage and Repair. *Medicina (Kaunas)*, *61*(11). https://doi.org/10.3390/medicina61112013

Baek, S. H., Park, S. J., Jeong, J. I., Kim, S. H., Han, J., Kyung, J. W., Baik, S. H., Choi, Y., Choi, B. Y., Park, J. S., Bahn, G., Shin, J. H., Jo, D. S., Lee, J. Y., Jang, C. G., Arumugam, T. V., Kim, J., Han, J. W., Koh, J. Y., . . . Jo, D. G. (2017). Inhibition of Drp1 Ameliorates Synaptic Depression, Abeta Deposition, and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *J Neurosci*, *37*(20), 5099-5110. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2385-16.2017

Barber, S. C., Mead, R. J., & Shaw, P. J. (2006). Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, *1762*(11-12), 1051-1067. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.03.008

Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, *3*(3), 205-214. https://doi.org/10.1038/nrd1330

Basak, B., & Holzbaur, E. L. F. (2025). Mitochondrial damage triggers the concerted degradation of negative regulators of neuronal autophagy. *Nat Commun*, *16*(1), 7367. https://doi.org/10.1038/s41467-025-62379-5

Berger, U. V., & Hediger, M. A. (2000). The vitamin C transporter SVCT2 is expressed by astrocytes in culture but not in situ. *Neuroreport*, *11*(7), 1395-1399. https://doi.org/10.1097/00001756-200005150-00009

Bianchi, F., Malboubi, M., Li, Y., George, J. H., Jerusalem, A., Szele, F., Thompson, M. S., & Ye, H. (2018). Rapid and efficient differentiation of functional motor neurons from human iPSC for neural injury modelling. *Stem Cell Res*, *32*, 126-134. https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.09.006

Bono, S., Feligioni, M., & Corbo, M. (2021). Impaired antioxidant KEAP1-NRF2 system in amyotrophic lateral sclerosis: NRF2 activation as a potential therapeutic strategy. *Mol Neurodegener*, *16*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s13024-021-00479-8

Bos, P. H., Lowry, E. R., Costa, J., Thams, S., Garcia-Diaz, A., Zask, A., Wichterle, H., & Stockwell, B. R. (2019). Development of MAP4 Kinase Inhibitors as Motor Neuron-Protecting Agents. *Cell Chem Biol*, *26*(12), 1703-1715 e1737. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.10.005

Brown, R. H., Jr., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*, *377*(16), 1602. https://doi.org/10.1056/NEJMc1710379

Cai, Q., & Sheng, Z. H. (2009). Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol*, *218*(2), 257-267. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.03.024

Cai, Z., & Yan, L. J. (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res*, *1*(1), 15-26. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662248

Calvo-Garrido, J., Winn, D., Maffezzini, C., Wedell, A., Freyer, C., Falk, A., & Wredenberg, A. (2021). Protocol for the derivation, culturing, and differentiation of human iPS-cell-derived neuroepithelial stem cells to study neural differentiation in vitro. *STAR Protoc*, *2*(2), 100528. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100528

Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J. C., Vasquez, O., Aguayo, L. G., & Nualart, F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem*, *78*(4), 815-823. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00461.x

Chavez-Valdez, R., Flock, D. L., Martin, L. J., & Northington, F. J. (2016). Endoplasmic reticulum pathology and stress response in neurons precede programmed necrosis after neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci*, *48*, 58-70. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.11.007

Chen, W., Zhao, H., & Li, Y. (2023). Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther*, *8*(1), 333. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01547-9

Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., & Xia, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, *8*(1), 352. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01570-w

Cisternas, P., Salazar, K., Ramirez, E., Elgueta, S., de Lima, I., Munoz, V., & Nualart, F. (2026). Activated astrocytes increase dehydroascorbic acid uptake, changing intracellular metabolism and vitamin C recycling and emulating neuropathological conditions. *Redox Biol*, *92*, 104074. https://doi.org/10.1016/j.redox.2026.104074

Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Martinez, F., Fernandez, E., Ferrada, L., Oyarce, K., Salazar, K., Bolanos, J. P., & Nualart, F. (2014). The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *J Neurochem*, *129*(4), 663-671. https://doi.org/10.1111/jnc.12663

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, *10*(2), 389-406. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x

den Hartog Jager, W. A. (1985). Experimental amyotrophic lateral sclerosis in the guinea-pig. *J Neurol Sci*, *67*(2), 133-142. https://doi.org/10.1016/0022-510x(85)90110-8

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., . . . Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, *24*(3), 312-325. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4

Espinoza, F., Magdalena, R., Saldivia, N., Jara, N., Martinez, F., Ferrada, L., Salazar, K., Avila, F., & Nualart, F. (2020). Vitamin C Recycling Regulates Neurite Growth in Neurospheres Differentiated In Vitro. *Antioxidants (Basel)*, *9*(12). https://doi.org/10.3390/antiox9121276

Esteban, M. A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., Chen, K., Li, Y., Liu, X., Xu, J., Zhang, S., Li, F., He, W., Labuda, K., Song, Y., . . . Pei, D. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *6*(1), 71-79. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.12.001

Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., Wiskow, O., Tailor, J., Trotter, M., Pollard, S., Smith, A., & 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*(1), e29597. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029597

Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, *400*(10360), 1363-1380. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01272-7

Ferrada, L., Barahona, M. J., Salazar, K., Vandenabeele, P., & Nualart, F. (2020). Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress. *Redox Biol*, *29*, 101408. https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101408

Ferrada, L., Barahona, M. J., Vera, M., Stockwell, B. R., & Nualart, F. (2023). Dehydroascorbic acid sensitizes cancer cells to system x(c)(-) inhibition-induced ferroptosis by promoting lipid droplet peroxidation. *Cell Death Dis*, *14*(9), 637. https://doi.org/10.1038/s41419-023-06153-9

Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H., Jr., & Beal, M. F. (1997).

Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, *69*(5), 2064-2074. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x

Gandhi, M., Elfeky, O., Ertugrul, H., Chela, H. K., & Daglilar, E. (2023). Scurvy: Rediscovering a Forgotten Disease. *Diseases*, *11*(2). https://doi.org/10.3390/diseases11020078

Garcia-Krauss, A., Ferrada, L., Astuya, A., Salazar, K., Cisternas, P., Martinez, F., Ramirez, E., & Nualart, F. (2016). Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. *Mol Neurobiol*, *53*(9), 5847-5863. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9497-3

Grad, L. I., Rouleau, G. A., Ravits, J., & Cashman, N. R. (2017). Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harb Perspect Med*, *7*(8). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024117

Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Adler, D. I., Couthouis, J., Liddelow, S. A., Gitler, A. D., & Barres, B. A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nat Commun*, *11*(1), 3753. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17514-9

Hall, J. E. (2015). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Sciences. https://books.google.cl/books?id=3sWNCgAAQBAJ

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17071. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71

Hardiman, O., van den Berg, L. H., & Kiernan, M. C. (2011). Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*, *7*(11), 639-649. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.153

Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med*, *46*(6), 719-730. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018

Hirschmann, J. V., & Raugi, G. J. (1999). Adult scurvy. *J Am Acad Dermatol*, *41*(6), 895-906; quiz 907-810. https://doi.org/10.1016/s0190-9622(99)70244-6

Jara, N., Cifuentes, M., Martinez, F., Gonzalez-Chavarria, I., Salazar, K., Ferrada, L., & Nualart, F. (2022). Vitamin C Deficiency Reduces Neurogenesis and Proliferation in the SVZ and Lateral Ventricle Extensions of the Young Guinea Pig Brain. *Antioxidants (Basel)*, *11*(10). https://doi.org/10.3390/antiox11102030

Jara, N., Cifuentes, M., Martinez, F., Salazar, K., & Nualart, F. (2016). Cytoarchitecture, Proliferative Activity and Neuroblast Migration in the Subventricular Zone and Lateral Ventricle Extension of the Adult Guinea Pig Brain. *Stem Cells*, *34*(10), 2574-2586. https://doi.org/10.1002/stem.2430

Jeon, Y. M., Kwon, Y., Lee, S., & Kim, H. J. (2023). Potential roles of the endoplasmic reticulum stress pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Aging Neurosci*, *15*, 1047897. https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1047897

Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*, *97*(10), 2499-2574. https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9

Joshi, A. U., Saw, N. L., Vogel, H., Cunnigham, A. D., Shamloo, M., & Mochly-Rosen, D. (2018). Inhibition of Drp1/Fis1 interaction slows progression of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med*, *10*(3). https://doi.org/10.15252/emmm.201708166

Juan, C. A., Perez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Perez-Lebena, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their

Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci*, *22*(9). https://doi.org/10.3390/ijms22094642

Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol*, *24*(4), 325-340. https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325

Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., & Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, *9*(7), 505-518. https://doi.org/10.1038/nrn2417

Krohn, F., Novello, M., van der Giessen, R. S., De Zeeuw, C. I., Pel, J. J. M., & Bosman, L. W. J. (2023). The integrated brain network that controls respiration. *Elife*, *12*. https://doi.org/10.7554/eLife.83654

Leon-Rodriguez, A., Fernandez-Arjona, M. D. M., Grondona, J. M., Pedraza, C., & Lopez-Avalos, M. D. (2022). Anxiety-like behavior and microglial activation in the amygdala after acute neuroinflammation induced by microbial neuraminidase. *Sci Rep*, *12*(1), 11581. https://doi.org/10.1038/s41598-022-15617-5

Li, D., Li, Y., Pan, W., Yang, B., & Fu, C. (2024). Role of dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res*, *206*, 107250. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107250

Liu, Z., Yan, M., Lei, W., Jiang, R., Dai, W., Chen, J., Wang, C., Li, L., Wu, M., Nian, X., Li, D., Sun, D., Lv, X., Wang, C., Xie, C., Yao, L., Wu, C., Hu, J., Xiao, N., . . . Zhang, L. (2022). Sec13 promotes oligodendrocyte differentiation and myelin repair through autocrine pleiotrophin signaling. *J Clin Invest*, *132*(7). https://doi.org/10.1172/JCI155096

Luoma, A. M., Kuo, F., Cakici, O., Crowther, M. N., Denninger, A. R., Avila, R. L., Brites, P., & Kirschner, D. A. (2015). Plasmalogen phospholipids protect internodal myelin from oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, *84*, 296-310. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.012

Ma, L., Wang, H. B., & Hashimoto, K. (2025). The vagus nerve: An old but new player in brain-body communication. *Brain Behav Immun*, *124*, 28-39. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.11.023

Magdalena, R., Ferrada, L., Ramirez, E., Smith-Ghigliotto, J. F., Salazar, K., & Nualart, F. (2025). Dehydroascorbic acid impairs neurite growth through RIPK1-associated caspase activation. *Free Radic Biol Med*, *239*, 406-416. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2025.07.036

Maldonado, E., Morales-Pison, S., Urbina, F., & Solari, A. (2023). Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, *12*(3). https://doi.org/10.3390/antiox12030651

Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*, *14*(10), 2013-2054. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3208

Miana-Mena, F. J., Gonzalez-Mingot, C., Larrode, P., Munoz, M. J., Olivan, S., Fuentes-Broto, L., Martinez-Ballarin, E., Reiter, R. J., Osta, R., & Garcia, J. J. (2011). Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, *258*(5), 762-769. https://doi.org/10.1007/s00415-010-5825-8

Miyata, H., Toyoda, Y., Takada, T., Hiragi, T., Kubota, Y., Shigesawa, R., Koyama, R., Ikegaya, Y., & Suzuki, H. (2022). Identification of an exporter that regulates vitamin C supply from blood to the brain. *iScience*, *25*(1), 103642. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103642

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., & Lee, W. J. (2006). Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res*, *83*(5), 919-928. https://doi.org/10.1002/jnr.20751

Musgrove, R. E., Helwig, M., Bae, E. J., Aboutalebi, H., Lee, S. J., Ulusoy, A., & Di Monte, D. A. (2019). Oxidative stress in vagal neurons promotes

parkinsonian pathology and intercellular alpha-synuclein transfer. *J Clin Invest*, *129*(9), 3738-3753. https://doi.org/10.1172/JCI127330

Niu, X., Hong, J., Zheng, X., Melville, D. B., Knapik, E. W., Meng, A., & Peng, J. (2014). The nuclear pore complex function of Sec13 protein is required for cell survival during retinal development. *J Biol Chem*, *289*(17), 11971-11985. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547190

Nualart, F., Cifuentes, M., Ramirez, E., Martinez, F., Barahona, M. J., Ferrada, L., Saldivia, N., Bongarzone, E. R., Thorens, B., & Salazar, K. (2023). Hyperglycemia increases SCO-spondin and Wnt5a secretion into the cerebrospinal fluid to regulate ependymal cell beating and glucose sensing. *PLoS Biol*, *21*(9), e3002308. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002308

Nualart, F., Mack, L., Garcia, A., Cisternas, P., Bongarzone, E. R., Heitzer, M., Jara, N., Martinez, F., Ferrada, L., Espinoza, F., Baeza, V., & Salazar, K. (2014). Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *J Stem Cell Res Ther*, *4*(5), 209. https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000209

Nualart, F. J., Rivas, C. I., Montecinos, V. P., Godoy, A. S., Guaiquil, V. H., Golde, D. W., & Vera, J. C. (2003). Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem*, *278*(12), 10128-10133. https://doi.org/10.1074/jbc.M210686200

Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., & Holsinger, R. M. D. (2023). Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants (Basel)*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/antiox12020517

Onda-Ohto, A., Hasegawa-Ogawa, M., Matsuno, H., Shiraishi, T., Bono, K., Hiraki, H., Kanegae, Y., Iguchi, Y., & Okano, H. J. (2023). Specific vulnerability of iPSC-derived motor neurons with TDP-43 gene mutation to oxidative stress. *Mol Brain*, *16*(1), 62. https://doi.org/10.1186/s13041-023-01050-w

Ong, G., & Logue, S. E. (2023). Unfolding the Interactions between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/antiox12050981

Oswald, M. C., Brooks, P. S., Zwart, M. F., Mukherjee, A., West, R. J., Giachello, C. N., Morarach, K., Baines, R. A., Sweeney, S. T., & Landgraf, M. (2018). Reactive oxygen species regulate activity-dependent neuronal plasticity in Drosophila. *Elife*, *7*. https://doi.org/10.7554/eLife.39393

Oviedo, M. J., Ramirez, E., De Lima, I., Grondona, J. M., Cifuentes, M., Martinez, F., Barahona, M. J., Nualart, F., & Salazar, K. (2026). IIIG9 and PP1alpha form a protein complex in the adherens junctions of polarized ependymal and MDCK cells. *Fluids Barriers CNS*, *23*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s12987-026-00762-0

Padayatty, S. J., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis*, *22*(6), 463-493. https://doi.org/10.1111/odi.12446

Pastor, P., Cisternas, P., Salazar, K., Silva-Alvarez, C., Oyarce, K., Jara, N., Espinoza, F., Martinez, A. D., & Nualart, F. (2013). SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche. *Front Cell Neurosci*, *7*, 119. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00119

Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M., & Atkin, J. D. (2015). The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol*, *3*, 80. https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00080

Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol*, *10*(3), 253-263. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70015-1

Portugal, C. C. (2024). Ascorbate and its transporter SVCT2: The dynamic duo's integrated roles in CNS neurobiology and pathophysiology. *Free Radic Biol Med*, *212*, 448-462. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.12.040

Purves. (2017). *Neuroscience 6th Edition*. Oxford University Press, Incorporated. https://books.google.cl/books?id=oWWnzgEACAAJ

Rahman, M. A., Khatun, M. T., Mim, A. K., Khandocar, M. P., Rahman, A., Hasan, M. H., Shimki, A. I., Hossain, M. S., Shoily, M. S. A., Faraque, A., Amin, M. F., Ferdous, R., & Islam, M. S. (2025). Oxidative Stress in DNA Damage and Neurodegenerative Diseases: Unveiling The Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cell Biochem Biophys*, *83*(4), 4233-4252. https://doi.org/10.1007/s12013-025-01845-9

Ramirez, E., Jara, N., Ferrada, L., Salazar, K., Martinez, F., Oviedo, M. J., Tereszczuk, J., Ramirez-Carbonell, S., Vollmann-Zwerenz, A., Hau, P., & Nualart, F. (2022). Glioblastoma Invasiveness and Collagen Secretion Are Enhanced by Vitamin C. *Antioxid Redox Signal*, *37*(7-9), 538-559. https://doi.org/10.1089/ars.2021.0089

Rao, A. R., Quach, H., Smith, E., Vatassery, G. T., & Rao, R. (2014). Changes in ascorbate, glutathione and alpha-tocopherol concentrations in the brain regions during normal development and moderate hypoglycemia in rats. *Neurosci Lett*, *568*, 67-71. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.035

Reiner, A., Medina, L., Figueredo-Cardenas, G., & Anfinson, S. (1995). Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol*, *131*(2), 239-250. https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90046-2

Rice, M. E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, *23*(5), 209-216. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01543-x

Riess, K. P., Farnen, J. P., Lambert, P. J., Mathiason, M. A., & Kothari, S. N. (2009). Ascorbic acid deficiency in bariatric surgical population. *Surg Obes Relat Dis*, *5*(1), 81-86. https://doi.org/10.1016/j.soard.2008.06.007

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., & et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59-62. https://doi.org/10.1038/362059a0

Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D. E., & Volterra, A. (2008). Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ*, *15*(11), 1691-1700. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.99

Rowe, S., & Carr, A. C. (2020). Global Vitamin C Status and Prevalence of Deficiency: A Cause for Concern? *Nutrients*, *12*(7). https://doi.org/10.3390/nu12072008

Salazar, K., Cerda, G., Martinez, F., Sarmiento, J. M., Gonzalez, C., Rodriguez, F., Garcia-Robles, M., Tapia, J. C., Cifuentes, M., & Nualart, F. (2014). SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *J Neurochem*, *130*(5), 693-706. https://doi.org/10.1111/jnc.12793

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., & 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*(9). https://doi.org/10.3390/antiox10091413

Salazar, K., Jara, N., Ramirez, E., de Lima, I., Smith-Ghigliotto, J., Munoz, V., Ferrada, L., & Nualart, F. (2023). Role of vitamin C and SVCT2 in neurogenesis. *Front Neurosci*, *17*, 1155758. https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1155758

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., & Nualart, F. (2018). SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Mol Neurobiol*, *55*(7), 5439-5452. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0762-5

Saldivia, N., Salazar, K., Cifuentes, M., Espinoza, F., Harrison, F. E., & Nualart, F. (2024). Ascorbic acid and its transporter SVCT2, affect radial glia cells differentiation in postnatal stages. *Glia*, *72*(4), 708-727. https://doi.org/10.1002/glia.24498

Sasaki, S. (2010). Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, *69*(4), 346-355. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181d44992

Shaw, P. J., & Eggett, C. J. (2000). Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, *247 Suppl 1*, I17-27. https://doi.org/10.1007/BF03161151

Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res*, *50*(W1), W216-W221. https://doi.org/10.1093/nar/gkac194

Shoshan-Barmatz, V., Shteinfer-Kuzmine, A., & Verma, A. (2020). VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules*, *10*(11). https://doi.org/10.3390/biom10111485

Shu, Y., Zou, C., Cai, Y., He, Q., Wu, X., Zhu, H., Qv, M., Chao, Y., Xu, C., Tang, L., & Wu, X. (2022). Vitamin C deficiency induces hypoglycemia and cognitive disorder through S-nitrosylation-mediated activation of glycogen synthase kinase 3beta. *Redox Biol*, *56*, 102420. https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102420

Siegel, A., Sapru, H. N., Siegel, H., Williams, L., & Wilkins. *Essential Neuroscience*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. https://books.google.com.cy/books?id=t3CkswEACAAJ

Smith, K. J., Kapoor, R., & Felts, P. A. (1999). Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol*, *9*(1), 69-92. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00212.x

Snell, R. S. (2010). *Clinical Neuroanatomy*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. https://books.google.cl/books?id=ABPmvroyrD0C

Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev*, *99*(3), 1381-1431. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018

Statland, J. M., Barohn, R. J., McVey, A. L., Katz, J. S., & Dimachkie, M. M. (2015). Patterns of Weakness, Classification of Motor Neuron Disease, and Clinical Diagnosis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin*, *33*(4), 735-748. https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.006

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Tang, D., Chen, M., Huang, X., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, G., Wu, S., & Wang, Y. (2023). SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One*, *18*(11), e0294236. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294236

Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F., & Hediger, M. A. (1999). A family of mammalian Na+-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, *399*(6731), 70-75. https://doi.org/10.1038/19986

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., & Nualart, F. (2019). Basal Sodium-Dependent Vitamin C

Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions. *Sci Rep*, *9*(1), 14422. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50772-2

Van San, E., Debruyne, A. C., Veeckmans, G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Zheng, H., Choi, S. M., Augustyns, K., van Loo, G., Michalke, B., Venkataramani, V., Toyokuni, S., Bayir, H., Vandenabeele, P., Hassannia, B., & Vanden Berghe, T. (2023). Ferroptosis contributes to multiple sclerosis and its pharmacological targeting suppresses experimental disease progression. *Cell Death Differ*, *30*(9), 2092-2103. https://doi.org/10.1038/s41418-023-01195-0

Vinokurov, A. Y., Stelmashuk, O. A., Ukolova, P. A., Zherebtsov, E. A., & Abramov, A. Y. (2021). Brain region specificity in reactive oxygen species production and maintenance of redox balance. *Free Radic Biol Med*, *174*, 195-201. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.014

Voitenko, L. P., & Marlinsky, V. V. (1993). Stereotaxic atlas of the guinea pig brainstem. *Neurophysiology*, *25*(1), 52-77.

Wang, M., Liu, Z., Sun, W., Yuan, Y., Jiao, B., Zhang, X., Shen, L., Jiang, H., Xia, K., Tang, B., & Wang, J. (2020). Association Between Vitamins and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Center-Based Survey in Mainland China. *Front Neurol*, *11*, 488. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00488

Wang, M., Ye, R., Barron, E., Baumeister, P., Mao, C., Luo, S., Fu, Y., Luo, B., Dubeau, L., Hinton, D. R., & Lee, A. S. (2010). Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ*, *17*(3), 488-498. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.144

Wang, Y., Liu, N., & Lu, B. (2019). Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther*, *25*(7), 859-875. https://doi.org/10.1111/cns.13140

Wilson, C., & Gonzalez-Billault, C. (2015). Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Front Cell Neurosci*, *9*, 381. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00381

Wires, E. S., Trychta, K. A., Kennedy, L. M., & Harvey, B. K. (2021). The Function of KDEL Receptors as UPR Genes in Disease. *Int J Mol Sci*, *22*(11). https://doi.org/10.3390/ijms22115436

Workman, M. J., Lim, R. G., Wu, J., Frank, A., Ornelas, L., Panther, L., Galvez, E., Perez, D., Meepe, I., Lei, S., Valencia, V., Gomez, E., Liu, C., Moran, R., Pinedo, L., Tsitkov, S., Ho, R., Kaye, J. A., Answer, A. L. S. C., . . . Svendsen, C. N. (2023). Large-scale differentiation of iPSC-derived motor neurons from ALS and control subjects. *Neuron*, *111*(8), 1191-1204 e1195. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.01.010

Xu, X., Pang, Y., & Fan, X. (2025). Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: from mechanisms to therapeutic advances. *Signal Transduct Target Ther*, *10*(1), 190. https://doi.org/10.1038/s41392-025-02253-4

Xu, Z., He, S., Begum, M. M., & Han, X. (2024). Myelin Lipid Alterations in Neurodegenerative Diseases: Landscape and Pathogenic Implications. *Antioxid Redox Signal*, *41*(16-18), 1073-1099. https://doi.org/10.1089/ars.2024.0676

Yamanaka, K., & Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci Res*, *126*, 31-38. https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.011

Yang, M., Liu, M., Sanchez, Y. F., Avazzadeh, S., Quinlan, L. R., Liu, G., Lu, Y., Yang, G., O'Brien, T., Henshall, D. C., Hardiman, O., & Shen, S. (2023). A novel protocol to derive cervical motor neurons from induced pluripotent stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cell Reports*, *18*(9), 1870-1883. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2023.07.004

Yu, T., Wang, L., Zhang, L., & Deuster, P. A. (2023). Mitochondrial Fission as a Therapeutic Target for Metabolic Diseases: Insights into Antioxidant Strategies. *Antioxidants (Basel)*, *12*(6). https://doi.org/10.3390/antiox12061163

Zhu, H., Li, S., Yang, Y., Zhang, S., Wang, Y., & Xiong, T. (2026). DHCR24 in cholesterol metabolism and diseases of the nervous system. *Lipids Health Dis*, *25*(1). https://doi.org/10.1186/s12944-026-02954-x