



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas

**CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE SVCT2 EN
PRESENCIA DE OLIGÓMEROS DEL PÉPTIDO A β EN MODELOS DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis de Magister presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de
Concepción como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en
Neurobiología

por

Camila Andrea Morel Soto

CONCEPCIÓN, CHILE

2024

Esta tesis ha sido realizada en el Departamentos de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dra. Carola Muñoz-Montesino
Profesora Guía
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Coralía Rivas Rocco
Profesora Co-Guía
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Fernando Martínez Acuña
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

Dra. Andrea Paula Lima
Profesora Evaluadora Externa
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Patricio Castro Maldonado
Director
Programa Magíster en Neurobiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

DEDICATORIA

A mi abuela, mi mamá, mi hermano y mi gata.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Enfermedades neurodegenerativas	16
1.2. Tendencias globales y cambios demográficos	16
1.4. Enfermedad de Alzheimer	19
1.4.1. Prevalencia y factores de riesgos	19
1.4.2. Formas de la Enfermedad de Alzheimer	20
1.4.3. Modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer	21
1.5. Histopatología y mecanismos moleculares de la EA	23
1.5.1. Péptidos β -amiloides ($A\beta$)	24
1.6. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	27
1.6.1. Homeostasis redox	27
1.6.1.1. Radicales Libres	27
1.6.1.2. Especies Reactivas de Oxígeno y estrés oxidativo	28
1.6.2. Disfunción mitocondrial	29
1.6.2.1. La mitocondria y sus procesos	29
1.6.2.2. ROS mitocondriales	31
1.6.3. Retroalimentación entre disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	32

1.6.4.	El cerebro como órgano susceptible	33
1.7.	Antioxidantes	35
1.7.1.	Sistemas de defensa antioxidante	35
1.7.2.	Antioxidantes enzimáticos	37
1.7.2.1.	Antioxidantes enzimáticos en el cerebro	37
1.7.3.	Antioxidantes no enzimáticos	38
1.8.	Vitamina C	39
1.8.1.	Formas de la vitamina C	41
1.8.2.	Transporte de vitamina C	42
1.8.2.1.	Transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs)	42
1.8.2.2.	Familia de transportadores concentrativos <i>SLC23</i>	43
1.8.2.3.	Caracterización de los transportadores SVCT1 y SVCT2	46
1.8.2.4.	Regulación de los transportadores SVCT1 y SVCT2	47
1.8.2.5.	Rol fisiológico de los transportadores SVCT1 y SVCT2	49
1.8.2.6.	Rol de SVCT2 en la mitocondria	50
2.	PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.....	53
3.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	55
4.	MÉTODOS Y MATERIALES	56
5.	RESULTADOS.....	67
5.1.	Caracterización de un nuevo anticuerpo anti-SVCT2 en modelos celulares de cáncer y enfermedad de Alzheimer	67
5.1.1.	Expresión de SVCT2 en neuronas hipocámpales de ratón utilizando un anticuerpo estandarizado en líneas celulares humanas (S19)	67

5.1.2. Caracterización de anticuerpos anti-SVCT2 L33 y L10 en neuronas hipocampales de ratón y células CAD	70
5.1.3. Caracterización del anticuerpo anti-SVCT2 L33 en células ZR-75 usando distintos marcadores mitocondriales	72
5.1.4. Detección de SVCT2 en células SH-SY5Y expuestas a concentraciones crecientes de A β O _s , utilizando los anticuerpos S19 y L33	75
5.2. Estudio de la localización de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón expuestas a oligómeros solubles del péptido A β ₄₀	78
5.2.1. Efecto de los A β O _s sobre la viabilidad celular	78
5.2.2. Análisis de colocalización de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón expuestas a un gradiente de A β O _s utilizando el anticuerpo L33	79
5.2.3. Análisis de la expresión de SVCT2 en proteínas totales de neuronas hipocampales de ratón	81
5.3. Localización de SVCT2 en la línea celular CAD diferenciada expuesta a concentraciones crecientes de A β O _s	83
5.3.1. Análisis de colocalización de SVCT2 en células CAD diferenciadas expuestas a un gradiente de A β O	83
5.3.2. Análisis de la expresión de SVCT2 en proteínas totales de células CAD diferenciadas	85
5.4. Localización de SVCT2 en tejidos cerebrales humanos con distintos grados de acumulación de A β O _s .	87
6. DISCUSIÓN.....	91
7. CONCLUSIÓN.....	102
8. REFERENCIAS.....	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Modelos comunes de ratones para la enfermedad de Alzheimer	22
Tabla 2.	Especies reactivas de oxígeno producidas de las reacciones metabólicas	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Descomposición porcentual del cambio en casos de demencia (2019-2050) a nivel global y regional	18
Figura 2.	Histopatología característica de la EA	23
Figura 3.	Clivajes proteolíticos por las enzimas α -secretasa, BACE1 y γ -secretasa en las vías no amiloidogénica y amiloidogénica	25
Figura 4.	Procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica	26
Figura 5.	Mecanismos de mantenimiento de la salud mitocondrial	31
Figura 6.	Sitios de fuga de electrones en la OXPHOS	32
Figura 7.	Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos	36
Figura 8.	Reacciones redox y vías de reciclaje y degradación de la vitamina C	42
Figura 9.	Modelo propuesto de la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico SVCT	49
Figura 10.	Evaluación de la inmunofluorescencia de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón tratadas con A β Os	69
Figura 11.	Localización del transportador SVCT2 en células CAD diferenciadas y neuronas hipocampales de ratón	71
Figura 12.	Caracterización de anticuerpo SVCT2 L33 en células ZR-75	74
Figura 13.	Localización de SVCT2 en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de A β Os	77
Figura 14.	Expresión de SVCT2 en proteínas totales de células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de A β Os	77

Figura 15.	Análisis del efecto citotóxico de A β Os sobre células CAD	78
Figura 16.	Localización subcelular de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón tratadas con A β Os	81
Figura 17.	Expresión del transportador SVCT2 en proteínas totales extraídas de neuronas hipocampales tratadas con A β Os	82
Figura 18.	Localización subcelular de SVCT2 en células CAD diferenciadas tratadas con A β Os	84
Figura 19.	Expresión de SVCT2 en proteínas totales extraídas de células CAD diferenciadas	86
Figura 20.	Acumulación de A β y NFT en la EA según la clasificación de Braak	88
Figura 21.	Expresión del transportador SVCT2 en tejidos sanos, tumorales y cerebrales	89
Figura 22.	Comparación entre cortes de tejido con neurodegeneración avanzada y tejido control sano obtenido de la literatura	90

ABREVIATURAS

AA:	Ácido ascórbico
A β :	Péptido β -amiloide
A β O:	Oligómeros solubles del péptido β -amiloide
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt:	ADN mitocondrial
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Mensajero de ARN
APOE:	Apolipoproteína E
APP:	Proteína precursora del amiloide
ATP:	Adenosina trifosfato
BACE1:	β -secretasa
BCA:	Ácido bicinconínico
BRET:	Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia
BSA:	Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺ :	Ion calcio
COXIV:	Citocromo c oxidasa IV
CMXRos:	MitoTracker Red CMXRos
DAB:	3,3 diaminobencidina
DAPI:	4,6-diamidino-2-fenilindol
DHA:	Ácido deshidroascórbico
DIV:	Días in vitro
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EA/AD:	Enfermedad de Alzheimer/Alzheimer's Disease
EOAD:	Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano
ETC:	Cadena transportadora de electrones
FAD:	Enfermedad de Alzheimer familiar
FBS:	Suero fetal bovino
Fe ²⁺ :	Hierro reducido
FRET:	Transferencia de energía por resonancia de Förster
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G β :	Subunidad β de la proteína G

GLUT:	Transportadores facilitativos de glucosa
HS:	Suero de caballo
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
KDM:	Desmetilasas de lisina
K _m :	Constante cinética de Michaelis-Menten
LOAD:	Enfermedad de Alzheimer esporádica de inicio tardío
L10:	Anti-SVCT2 L10
L33:	Anti-SVCT2 L33
MAP2:	Proteína asociada a microtúbulos
Mg ²⁺ :	Ion magnesio
miRNA:	Micro RNA
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF-κB:	Factor nuclear de cadenas ligeras κ de células B activadas
NFT:	Ovillos neurofibrilares de la proteína Tau
nH:	Coefficiente de Hill
O ₂ ^{•-} :	Anión superóxido
OH [•] :	Radical hidroxilo
OXPHOS:	Fosforilación oxidativa
PBS:	Tampón fosfato salino
PCC:	Coefficiente de correlación de Pearson
PFA:	Paraformaldehído
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C
PSEN:	Presenilina
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
Redox:	Reducción-oxidación
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SNC:	Sistema nervioso central
SVCT:	Cotransportadores de ácido ascórbico dependientes de sodio
SVCT2:	Cotransportador de ácido ascórbico dependiente de sodio 1
SVCT2:	Cotransportador de ácido ascórbico dependiente de sodio 2
SVCT2 <i>full length</i> :	Forma canónica de SVCT2

S19:	Anti-SVCT2 S19
TB:	Tampón Tris
TBS:	Solución salina amortiguada con Tris
TBST:	TBS/0.05% Tween 20
TETs:	Proteínas de la familia translocación diez-once
tM1:	Coefficiente de superposición de Mander bajo umbral en el canal 1
tM2:	Coefficiente de superposición de Mander bajo umbral en el canal 2
TMD:	Dominio transmembrana
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α
TOM20:	Translocasa de membrana externa mitocondrial
2-OGDDs:	Dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la acumulación de oligómeros solubles del péptido β -amiloide (A β Os) que provocan efectos deletéreos como estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. La vitamina C, un antioxidante fundamental, desempeña un papel protector en la preservación de la integridad y función mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo por el cual se transporta a las mitocondrias, especialmente en neuronas afectadas por la EA, aun no se comprende completamente. Si bien se ha propuesto que la vitamina C ingresa a la células principalmente como ácido deshidroascórbico (DHA) mediante transportadores de glucosa (GLUTs), investigaciones recientes indican que el transportador de vitamina C dependiente de sodio 2 (SVCT2), típicamente localizado en la membrana plasmática, también podría localizarse en las mitocondrias y mediar el transporte de vitamina C en su forma reducida, ácido ascórbico (AA).

La presente tesis busca investigar el papel de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón y células CAD diferenciadas expuestas a A β Os, con el objetivo de determinar si SVCT2 se localiza en las mitocondrias y si su expresión se ve afectada por el estrés inducido por los A β Os. A través de cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón y de modelos celulares, se evaluó la expresión y localización de SVCT2 en respuesta a concentraciones crecientes de A β Os. El estudio reveló un aumento significativo en la expresión de una variante corta de SVCT2, que podría representar una forma dominante-negativa, en neuronas tratadas con A β Os, lo que podría agravar el daño oxidativo al afectar el transporte de vitamina C. Además, en tejidos cerebrales de pacientes con enfermedades neurodegenerativas avanzadas, se detectó una señal débil de SVCT2, posiblemente debido a la marcada pérdida de neuronas.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the accumulation of soluble amyloid- β oligomers (A β O), which cause deleterious effects such as oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Vitamin C, an important antioxidant, plays a protective role in maintaining mitochondrial integrity and function, but its transport into mitochondria, particularly in neurons affected by AD, remains unclear. While previous studies suggest that vitamin C enters the cells primarily as dehydroascorbic acid (DHA) via glucose transporters (GLUTs), recent findings indicate that the sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2), typically located in the plasma membrane, may also localize to mitochondria and mediate the transport of vitamin C in its reduced form, ascorbic acid (AA).

This thesis aims to investigate the role of SVCT2 in hippocampal neurons and CAD cells exposed to A β O to determine whether SVCT2 localizes to mitochondria and how its expression is affected by A β O-induced stress. Using primary mouse hippocampal neurons and cellular models, we evaluated SVCT2 expression and localization in response to increasing concentrations of A β O. The study reveals a significant upregulation of a short SVCT2 variant, potentially a dominant-negative form, in neurons tested with A β O, which may exacerbate oxidative damage by impairing vitamin C transport. In addition, brain tissues from patients with advanced neurodegenerative diseases showed a weak signal of SVCT2, likely due to the marked loss of neurons.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades neurodegenerativas

El aumento de la esperanza de vida en la humanidad representa uno de los logros de la era moderna, en gran parte debido a los avances en medicina, salud pública y tecnología. Sin embargo, este aumento también ha llevado al desarrollo de patologías crónicas conocidas como las enfermedades neurodegenerativas. Estas enfermedades, a menudo llamadas sinaptopatías, representan un desafío para la salud pública debido a la pérdida neuronal selectiva y simétrica en los sistemas motores, sensoriales o cognitivos, ocasionando el deterioro progresivo de los procesos fisiológicos asociados a estos ^[1].

La incapacidad de revertir los efectos de las enfermedades neurodegenerativas se debe a que las neuronas, a diferencia de otras células del organismo, no pueden replicarse para reemplazar a las dañadas. En consecuencia, la pérdida de neuronas conduce a una disminución importante de la autonomía y calidad de vida del paciente. Hacen falta tratamientos definitivos para estas enfermedades, principalmente porque los mecanismos fisiopatológicos subyacentes no se comprenden completamente. Los tratamientos actuales se enfocan principalmente en detener la progresión de la neurodegeneración y en manejar los síntomas existentes, enfatizando la importancia de la detección temprana para un mejor manejo de estas condiciones ^[2].

1.2. Tendencias globales y cambios demográficos

A medida que aumenta la esperanza de vida y envejece la población mundial, la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas aumenta correspondientemente, aumentando las tasas de morbilidad y reflejándose en tratamientos más costosos.

Estas enfermedades generalmente producen un síndrome de demencia, que se caracteriza por una pérdida de la función cognitiva, la memoria, el razonamiento lógico y alteraciones de la personalidad. Estos síntomas interfieren significativamente con la vida diaria, haciendo que el manejo de estas condiciones sea cada vez más complejo y exigente.

A escala global se ha observado que el aumento de la prevalencia de la demencia está impulsado principalmente por el envejecimiento de la población y el crecimiento demográfico. Estos elementos son reconocidos como los determinantes principales de esta tendencia mundial (**Fig. 1**). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2020 se registraron 1.000 millones de personas de 60 años o más. Se prevé que esta cifra se duplique a 2.100 millones para 2050, mientras que se espera que el número de personas de 80 años o más se triplique, alcanzando los 426 millones. Este cambio demográfico sugiere que el número de personas que viven con demencia aumentará de 55 millones en 2019 a 139 millones para 2050, resaltando una urgencia de abordar este creciente problema de salud ^[3]

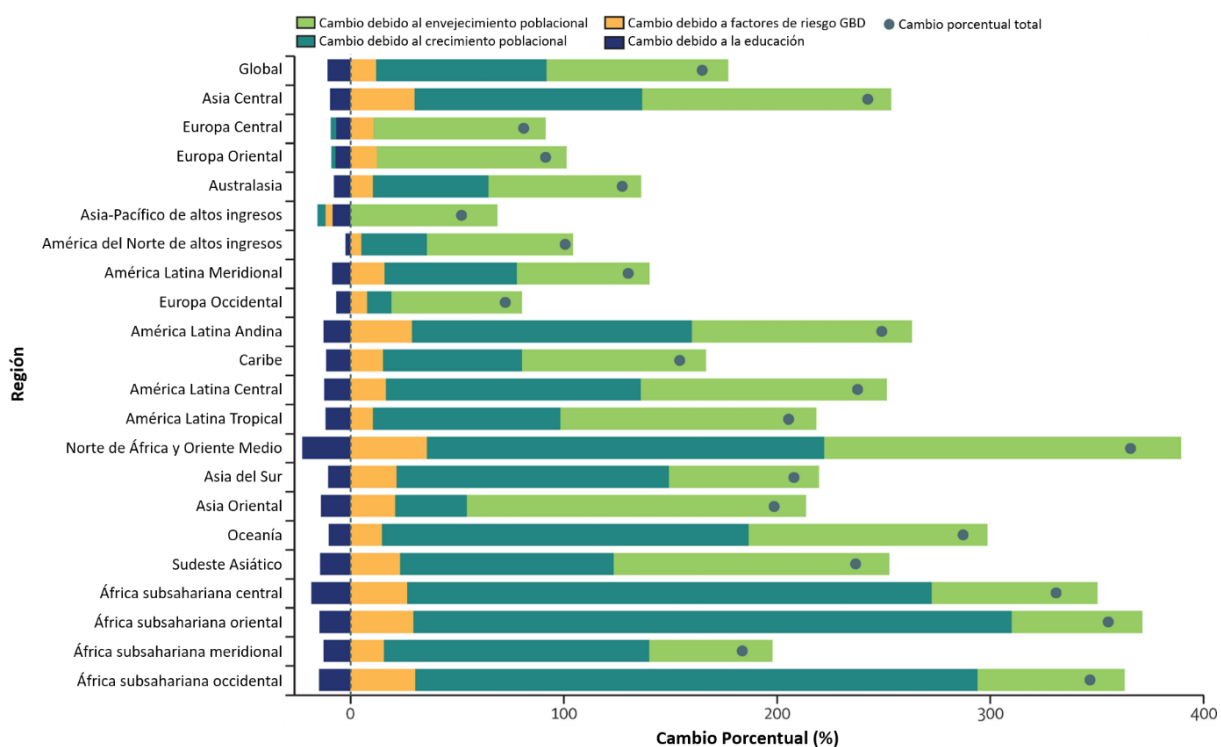


Figura 1: Descomposición porcentual del cambio en casos de demencia (2019-2050) a nivel global y regional. GBD = estudio de la carga global de enfermedades, lesiones y factores de riesgo. Reproducida de GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators, *Lancet Public Health*, 2022 [4].

La carga económica de las enfermedades neurodegenerativas es profunda, imponiendo una carga financiera considerable tanto en las familias como en los sistemas de salud. Estas enfermedades a menudo duran más de una década, durante la cual los pacientes requieren cuidados y tratamientos continuos. Solo en Europa, se estima que el costo económico anual de cuidar y tratar a pacientes con enfermedades neurodegenerativas es de aproximadamente 130.000 millones de euros (alrededor de 140 mil millones de dólares) [5]. Además, se espera que los costos asociados con los síndromes de demencia causados por estas enfermedades se dupliquen, de 1.3 billones de dólares en 2019 a 2.8 billones de dólares para 2030. [3]. Esta escalada en los costos subraya la necesidad de estrategias efectivas para manejar y mitigar el impacto de las enfermedades neurodegenerativas en la sociedad.

1.4. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se encuentra dentro del espectro de enfermedades neurodegenerativas. Identificada por primera vez en 1907 por los médicos alemanes Alois Alzheimer y Oskar Fischer ^[6,7], la EA representa la enfermedad neurodegenerativa más común y la principal causa de demencia en individuos mayores de 65 años, representando aproximadamente entre el 60 % y el 80 % de los casos ^[8]. Esta enfermedad se caracteriza por un declive progresivo en las habilidades cognitivas debido a la muerte neuronal, comenzando típicamente de manera sutil con deterioros en la memoria a corto plazo.

1.4.1. Prevalencia y factores de riesgos

A pesar de que la causa precisa de la EA sigue siendo poco comprendida, existe un consenso general de que la edad constituye el principal factor de riesgo ^[9-15]. Se estima que alrededor del 5 % de los individuos de entre 65 y 74 años son afectados por demencia relacionada a la EA, con esta prevalencia aumentando al 13,2 % en aquellos de entre 75 y 84 años. Entre los individuos de 85 años y más, la demencia se observa entre un tercio y la mitad de la población. Sin embargo, es importante señalar que la demencia relacionada a la EA no es un aspecto intrínseco del envejecimiento, ya que la edad avanzada por sí sola no es suficiente para inducir la enfermedad. Más bien, la evidencia sugiere que la EA está asociada con un envejecimiento no saludable, involucrando procesos patológicos específicos diferentes al proceso del envejecimiento normal ^[16-20].

1.4.2. Formas de la Enfermedad de Alzheimer

Los casos de EA se clasifican ampliamente en la EA de inicio temprano y la EA esporádica de inicio tardío (EOAD y LOAD, respectivamente). Algunos casos de EOAD pueden incluso subdividirse en un grupo familiar de inicio temprano (FAD), el cual es causado por mutaciones genéticas específicas y se hereda típicamente de manera autosómica dominante. La mayoría de los casos de EA son de la variedad LOAD y su origen es más complejo, ya que está influenciado por una combinación de factores genéticos y ambientales. En contraste, la forma familiar de inicio temprano (FAD) afecta a alrededor del 5 % de los casos de EA, y está principalmente asociada a un perfil genético de alrededor de 200 mutaciones, todas agrupadas en tres genes: el de la proteína precursora del amiloide (*APP*), el de la presenilina 1 (*PSEN1*) y el de la presenilina 2 (*PSEN2*). El gen *APP* se encuentra en el cromosoma 21 y codifica la proteína precursora del amiloide (*APP*), mientras que los genes *PSEN1* y *PSEN2* codifican las proteínas *PSEN1* y *PSEN2*, las que forman parte del complejo γ -secretasa que cliva a la proteína precursora del amiloide [21].

Además de estas mutaciones bien estudiadas, se han identificado otras mutaciones y variantes genéticas en la patogénesis de la EA. El riesgo de desarrollar LOAD se ha asociado con variaciones genéticas identificadas mediante estudios de asociación del genoma completo. Entre estos genes, el más importante es el de la Apolipoproteína E (*APOE*), ubicado en el cromosoma 19. Existen tres alelos comunes en este gen, que son *APOE2*, *APOE3* y *APOE4*. El alelo *APOE3* tiene un efecto neutro sobre el riesgo de padecer EA, mientras que el alelo *APOE2* se hereda como protector. Por otro lado, el alelo *APOE4* aumenta significativamente el riesgo de LOAD dosis-dependiente; el

riesgo de desarrollar EA aumenta 3 a 4 veces en los portadores heterocigotos, mientras que en los portadores homocigotos aumenta hasta 12 veces [22,23].

Las mutaciones en el gen *BACE1*, que codifica a la enzima BACE1 responsable del clivaje inicial de la APP en la vía amiloidogénica, se han relacionado con un aumento en la producción de péptidos β -amiloide ($A\beta$). Las variantes de BACE1 pueden aumentar su actividad, lo que lleva a una mayor generación de $A\beta_{42}$, la forma más amiloidogénica del péptido $A\beta$ [24].

La variante sueca es una mutación específica en el gen *APP* donde los aminoácidos lisina (K) y metionina (M) en las posiciones 670 y 671 son reemplazadas por asparagina (N) y leucina (L), respectivamente. Esta mutación incrementa el clivaje de APP por BACE1, resultando en niveles más altos de producción de péptidos $A\beta$ [25]. Es una mutación asociada con la EOAD y ha sido ampliamente estudiada en modelos animales transgénicos. [26-28]

1.4.3. Modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer

Basándose en el conocimiento de las mutaciones genéticas previamente mencionadas, se han desarrollado varios modelos animales para explorar los mecanismos y posibles blancos terapéuticos para la EA, además de comprender mejor su patogénesis y progresión. Los modelos más utilizados incorporan estas mutaciones, ya sea de manera individual o combinada, para replicar los factores genéticos y las características de la EA en humanos. Por ejemplo, modelos como los ratones Tg2576 y 5Xfad expresan formas mutantes de los genes *APP* y *PSEN1*, lo que conduce al desarrollo de placas amiloides y alteraciones cognitivas similares a lo observado en pacientes con EA. La utilidad de estos modelos se extiende a la prueba

de posibles intervenciones terapéuticas destinadas a mitigar las características patológicas de la EA. A continuación, se resumen estos modelos ampliamente empleados (**Tabla 1**).

Modelo	Transgen(es)	Mutación(es)	Promotor(es)	Referencias
PDAPP	<i>hAPP</i>	V717F	<i>PDGF</i>	[29]
H6	<i>hAPP</i>	N/A	<i>PDGF</i>	[30]
J9	<i>hAPP</i>	N/A	<i>PDGF</i>	[31]
J20	<i>hAPP</i>	N/A	<i>PDGF</i>	[31]
Tg2576	<i>hAPP</i>	K670N M671L	PrP de hámster	[28]
APP23	<i>hAPP</i>	K670N M671L	<i>Thy-1.2</i>	[32]
C3-3	<i>APP</i> quimérico <i>humano/murino</i>	K670N M671L	Promotor priónico de ratón	[33]
CRND8	<i>hAPP</i>	K670N M671L V717F	Promotor priónico de hámster	[34]
APPDutch	<i>hAPP</i>	E693Q	<i>Thy-1.2</i>	[35]
ARC6/ARC48	<i>hAPP</i>	E22G	<i>PDGF</i>	[36]
C3-3 x PSEN1	<i>APP</i> quimérico <i>humano/murino, Hpsen1</i>	<i>APP</i> K670N, M671L; <i>PSEN1</i> A246E	Promotor priónico de ratón (<i>APP, PSEN1</i>)	[33]
PSAPP	<i>hAPP</i> , <i>hPSEN1</i>	<i>APP</i> K670N, M671L; <i>PSEN1</i> M146L	PrP de hamster (<i>APP</i>), HMG-CoA reductasa (<i>PSEN1</i>)	[37]
APP _{SL} PS1 _{M146L}	<i>hAPP</i> , <i>hPSEN1</i>	<i>APP</i> K670N, M671L, V717I; <i>PSEN1</i> M146L	<i>Thy-1 (APP)</i> HMG-CoA reductasa (<i>PSEN1</i>)	[38]
APP _{SL} PS1 _{kl}	<i>hAPP</i> , <i>hPSEN1</i>	<i>APP</i> M233T, L235P ; <i>PSEN1</i> M233T, L235P	<i>Thy-1 (APP)</i>	[39]
5Xfad	<i>hAPP</i> , <i>hPSEN1</i>	<i>APP</i> K670N, M671L, I716V, V717I; <i>PSEN1</i> M146L, L286V	<i>Thy-1</i>	[40]
Hbace1/Happ	<i>hAPP</i> , <i>hBACE1</i>	N/A	<i>Thy-1 (BACE1, APP)</i>	[41]
Htau	<i>hTau</i>	mTauKO	<i>Tau, Thy-1</i>	[33]
Tau P301L	<i>hTau</i>	P301L	<i>Thy-1.2</i>	[35]
Tau V337M	<i>hTau</i>	V337M	<i>PDGF</i>	[36]
Tau P301S	<i>hTau</i>	P301S	<i>Thy-1.2</i>	[37]
Tau G272V, P301S	<i>hTau</i>	G272V P301S	<i>Thy-1.2</i>	[38]
3xTg-AD	<i>hAPP</i> , <i>hPSEN1</i> <i>hTau</i>	<i>APP</i> K670N, M671L; <i>PSEN1</i> M146V; <i>tau</i> P301L	<i>Thy-1.2 (APP, Tau)</i>	[39]

Tabla 1: Modelos comunes de ratones para la enfermedad de Alzheimer, incluyendo sus transgenes, mutaciones relevantes, si aplican, y el promotor bajo el cual se expresan los transgenes. Modificado de Cavanaugh y colaboradores, *Altex*, 2014 [42].

1.5. Histopatología y mecanismos moleculares de la Enfermedad de Alzheimer

La histopatología de la demencia relacionada a la EA se caracteriza por la presencia de placas neuríticas extracelulares conformadas por variedades del péptido β -amiloide ($A\beta$), distribuidas ampliamente por todo el hipocampo y la corteza cerebral, y ovillos neurofibrilares de la proteína Tau (NFT), que aparecen inicialmente en el lóbulo temporal medial, y posteriormente en las regiones corticales de los lóbulos temporal, parietal y frontal (**Fig. 2**).

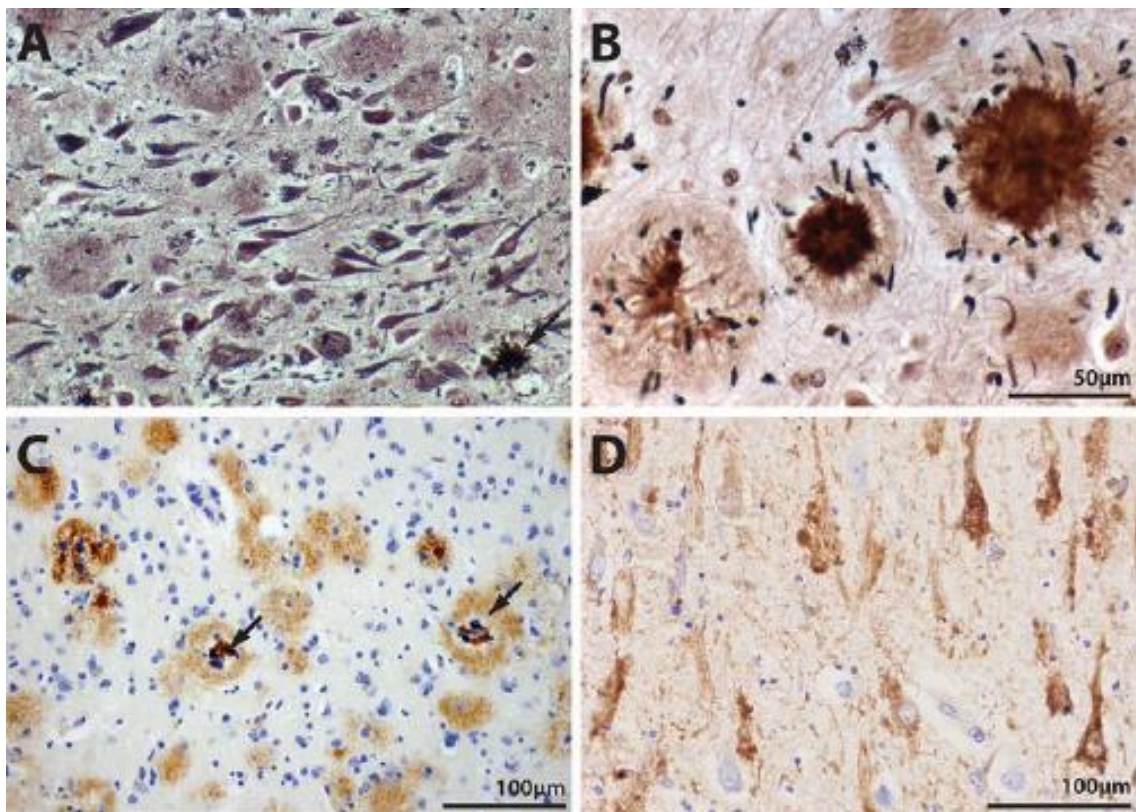


Figura 2: Histopatología característica de la EA. A. Imagen de tinción de plata de tejido cerebral cortical, donde se observan placas y ovillos. B. Imagen ampliada de placas neuríticas positivas a la plata. C. Proteína β -amiloide en placas. D. Tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares. La escala de C es equivalente a la de A, y las flechas indican las placas neuríticas. Reproducida de Kumfor y col., *Adv. Neurobiol.*, 2017. ^[43]

La acumulación de péptidos $A\beta$ y Tau en el cerebro se asocia a la pérdida sináptica, la muerte neuronal, y una respuesta inflamatoria que agrava el daño neuronal. También se ha observado, recientemente, que la activación crónica de la microglía y

los astrocitos en respuesta a A β y Tau desencadenan la liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta inflamación persistente agrava el daño tisular y promueve un entorno tóxico en el cerebro, contribuyendo a la progresión de la neurodegeneración [44].

1.5.1. Péptidos β -amiloides (A β)

Los péptidos A β se derivan de una proteína precursora más grande conocida como proteína precursora amiloide (APP), una proteína transmembrana presente predominantemente en las sinapsis neuronales [45]. Existen dos vías de procesamiento de APP mediadas por una familia de enzimas proteolíticas denominadas secretasas (**Fig. 2**). En la vía no amiloidogénica, la proteína APP es clivada por la enzima la α -secretasa dentro del dominio de A β , entre los aminoácidos 16K y 17L. La actividad de α -secretasa no solo impide la formación de péptidos A β al clivar al centro de la secuencia de A β , sino que también provoca la liberación de APP α hacia el medio extracelular, desde donde ejerce efectos neuroprotectores [46]. En la vía amiloidogénica, BACE1 es la enzima β -secretasa responsable del clivaje de la APP. Junto con γ -secretasa, BACE1 genera especies de péptido A β que en la enfermedad de Alzheimer se presentan como agregados cerebrales de tamaño y complejidad conformacional crecientes. El clivaje de APP mediado por BACE1 constituye el paso limitante en la producción de A β [47]. Por otro lado, γ -secretasa no tiene una ubicación exacta en su sitio de escisión, lo que resulta en una variabilidad en la longitud de los péptidos A β generados. Estos pueden oscilar entre 36 y 43 residuos, sin embargo, las especies predominantes son las de 40 y 42 residuos de longitud (**Fig. 3**).

En condiciones normales, los péptidos A β se producen en forma monomérica soluble y se secretan al espacio extracelular, donde circulan a bajas concentraciones, desempeñando funciones neurotróficas y neuroprotectoras [48].

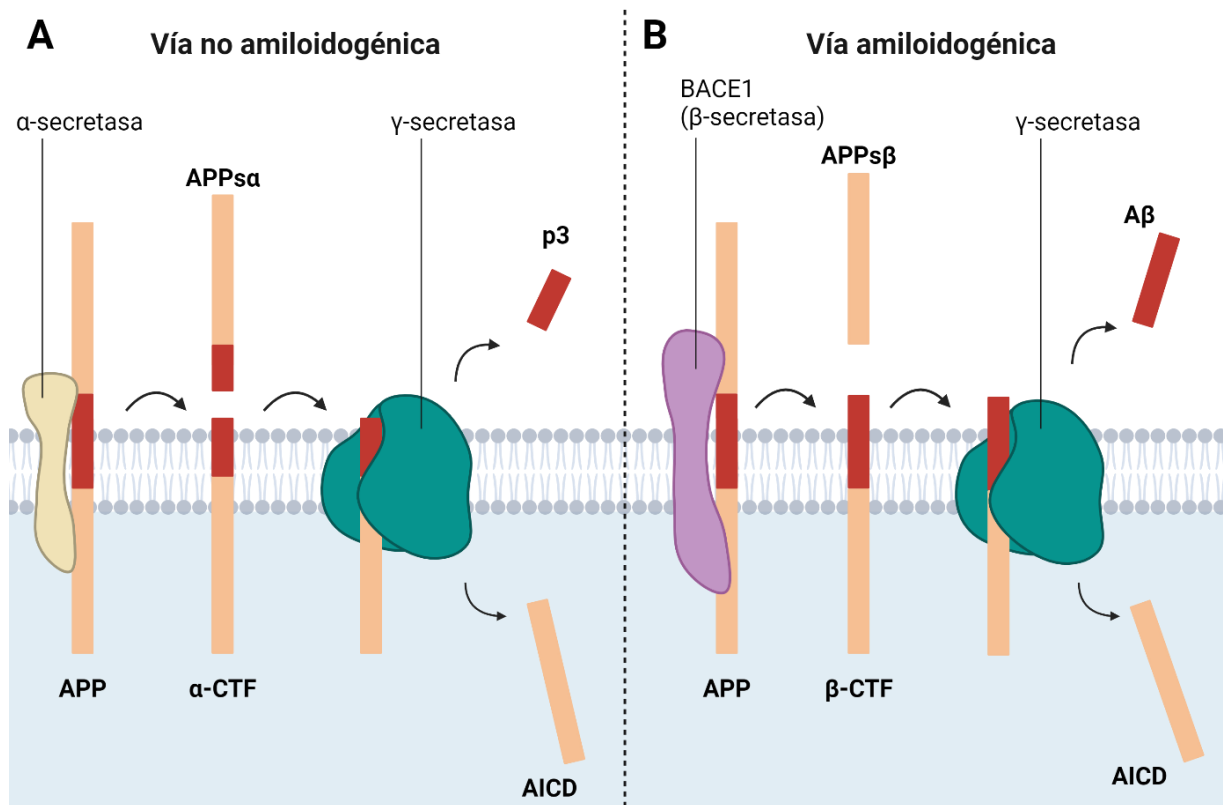


Figura 3: Clivajes proteolíticos de APP por las enzimas α-secretasa, BACE1 y γ-secretasa en las vías no amiloidogénica y amiloidogénica. Esta última trae como consecuencia la generación de variedades del péptido Aβ. Adaptada de Thinakaran, G. y Koo, E.H., *J. Biol. Chem.*, 2008. [48]

Existe la afirmación frecuentemente mencionada de que “Aβ₄₂ es más amiloidogénica que Aβ₄₀” [49-52]. A partir de datos obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X y microscopía electrónica (ME), se han observado estados conformacionales significativamente diferentes entre las variedades de Aβ₄₀ y Aβ₄₂ [53,54]. Aβ₄₂ forma una horquilla β antiparalela que conecta los residuos del núcleo hidrofóbico central (16-21) con los residuos 29-36, compatible con las regiones conocidas de formación de fibrillas amiloides. Por otro lado, Aβ₄₀ genera una horquilla β antiparalela alternativa, aunque menos común, que une el núcleo hidrofóbico central con los residuos 9-13, y que en ocasiones se asocia con los residuos 35-37 para formar una lámina β. Además, los dos residuos hidrofóbicos adicionales en el extremo C-terminal de Aβ₄₂ regulan directamente las diferencias en el contenido de láminas β observadas entre las estructuras de Aβ₄₀ y Aβ₄₂. Estos estados conformacionales

hacen que los péptidos A β , especialmente A β_{42} , sean propensos a agregarse en varios tipos de ensamblajes, tales como oligómeros, protofibrillas y fibrillas amiloides. Las fibrillas amiloides, de mayor tamaño e insolubles, forman placas amiloides (también llamadas placas seniles), mientras que los oligómeros, al ser solubles, se pueden difundir por el cerebro [55].

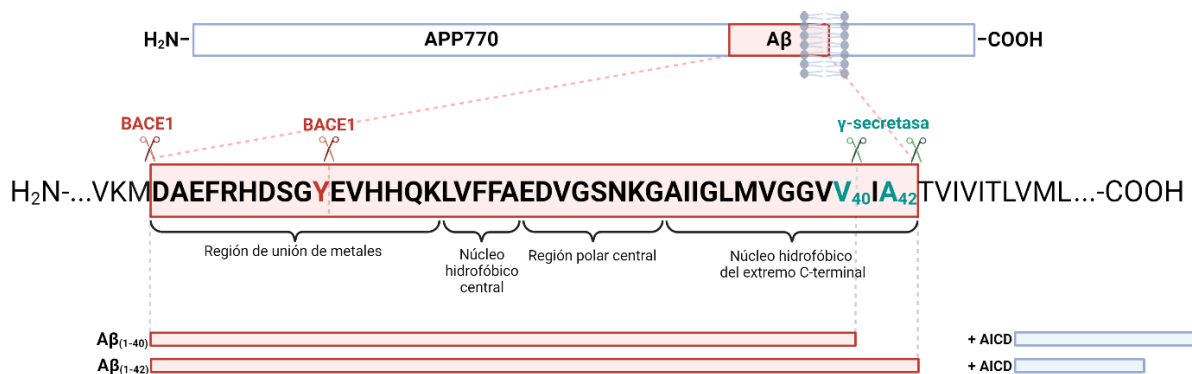


Figura 4: Procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica. En el procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica ocurren clivajes secuenciales por las enzimas BACE1 y γ -secretasa en los extremos terminales N y C, respectivamente. El fragmento C terminal (β -CTF) generado por BACE1 es internalizado y procesado por γ -secretasa en múltiples sitios, produciendo variedades de péptidos A β , entre ellos las formas principales A β_{40} y A β_{42} . Modificada de Kumar-Singh, S., *Int J Mol Sci*, 2009 [56].

Los péptidos solubles de A β se agregan para formar oligómeros (A β O), los cuales se asocian con la membrana celular y forman estructuras anulares con poros acuosos. La formación de estos poros compromete la integridad de la membrana plasmática neuronal y resulta en un influjo de iones de calcio (Ca²⁺) independiente de la actividad del receptor de glutamato [57,58]. El aumento del Ca²⁺ intracelular provoca estrés celular, lo que finalmente conduce a la muerte neuronal. Además, los A β O promueven la hiperfosforilación de Tau, contribuyendo a la formación de NFT al interior de las neuronas [59]. También se ha demostrado que los A β O son perjudiciales para las mitocondrias al aumentar el estrés oxidativo, reducir su umbral apoptótico y alterar sus procesos dinámicos [60,61].

1.6. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

1.6.1. Homeostasis redox

La homeostasis reducción-oxidación (redox) es fundamental para el funcionamiento apropiado de los organismos vivos. Prácticamente todos los procesos esenciales, desde la generación de energía hasta el metabolismo y las funciones vitales, contienen procesos redox. Es relevante señalar que no existe un único equilibrio redox en las células; en distintos compartimentos celulares, tanto internos como externos, se pueden observar variaciones fisiológicas o patológicas en los sistemas redox, los que operan de forma simultánea. Las reacciones redox se distribuyen en forma precisa y coordinada de acuerdo con los principios del Código Redox [62].

1.6.1.1. Radicales Libres

Los radicales libres se definen como átomos o moléculas que presentan al menos un electrón desapareado en su capa de valencia y que pueden existir de forma autónoma en cierto grado. La formación de radicales libres puede ocurrir a través de la adición de un electrón a un átomo o molécula neutra, o mediante la eliminación de un electrón de un átomo o molécula neutra. También pueden formarse de la ruptura homolítica de enlaces covalentes, generalmente en presencia de energía en forma de calor, luz ultravioleta o radiación ionizante [63].

Los radicales libres pueden actuar como oxidantes, aceptando electrones de otras moléculas, o bien, como reductores, cediendo electrones a otras moléculas [64,65]. Esto puede generar una amplia gama de productos electrófilos secundarios que tienden a atacar sitios de alta densidad electrónica, normalmente presentes en

compuestos con átomos de nitrógeno (como proteínas y ácidos nucleicos) y en compuestos con enlaces dobles carbono-carbono (como fosfolípidos) [66].

1.6.1.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y estrés oxidativo

Los radicales libres más relevantes que se producen de las reacciones metabólicas son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Tabla 2**). Las ROS en el organismo pueden originarse tanto de fuentes exógenas como endógenas. Las fuentes exógenas abarcan alimentos específicos, fármacos, alcohol, tabaco, agentes contaminantes en el aire, pesticidas y radiación [67]. Por otro lado, las fuentes endógenas de ROS incluyen ciertas proteínas, como la familia de las NOX, y organelos celulares como mitocondrias, peroxisomas y el retículo endoplásmico, donde la demanda de oxígeno es alta [68-71].

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	Símbolo	Vida media
Radicales		
Superóxido	O ₂ •	10 ⁻⁶ s
Hidroxilo	OH•	10 ⁻¹⁰ s
Radical alcoxi	RO•	10 ⁻⁶ s
Radical peroxi	ROO•	17 s
No radicales		
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Estable
Oxígeno singlete	¹ O ₂	10 ⁻⁶ s
Ozono	O ₃	Segundos
Peróxido orgánico	ROOH	Estable
Ácido hipocloroso	HOCl	Estable (min)
Ácido hipobromoso	HOBr	Estable (min)

Tabla 2: Especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas de las reacciones metabólicas. Modificada de Phaniendra y colaboradores, *Indian J Clin Biochem*, 2015 [72].

En condiciones fisiológicas, las ROS desempeñan funciones biológicas importantes, sobre todo en el metabolismo celular, donde participan en la transducción de señales,

la expresión génica, la activación de factores de transcripción, la respuesta mitogénica y la protección inmunológica, entre otras [73]. Sin embargo, las ROS también pueden ser perjudiciales; al ser inestables y por lo tanto altamente reactivas, pueden gatillar una reacción en cadena de formación de radicales libres que altera biomoléculas esenciales (lípidos, ADN y proteínas) al sustraerles electrones para lograr la estabilidad. Este proceso se considera a menudo auto-propagante, ya que las biomoléculas atacadas pierden un electrón y se convierten en radicales libres electrófilos, lo que inicia una cadena de reacciones que deja a varias otras moléculas alteradas e incapaces de cumplir sus funciones. Existen mecanismos antioxidantes que pueden atenuar este daño al ceder un electrón a los radicales libres reactivos para detener la propagación, pero cuando estos mecanismos no dan abasto debido a una elevada concentración de ROS, la célula entra en una condición conocida como estrés oxidativo [74,75].

1.6.2. Disfunción mitocondrial

1.6.2.1. La mitocondria y sus procesos

Las mitocondrias juegan un papel central en varias funciones celulares. Son el núcleo del metabolismo energético celular, siendo el sitio donde se genera la mayor parte del ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). También participan en el balance osmótico, la regulación y homeostasis del calcio y la comunicación entre organelos. Además, intervienen en la respuesta celular ante múltiples situaciones de estrés fisiológico y genético, así como en procesos complejos como la proliferación celular, la muerte celular programada y la senescencia [76].

Las mitocondrias son organelos dinámicos que se fusionan, dividen y cambian de localización en la célula. Además, contienen su propio ADN (mtDNA), el cual es más propenso a sufrir mutaciones en comparación con el DNA genómico [77], por lo que requieren de procesos constantes de reparación y reemplazo de sus componentes para mantener un funcionamiento adecuado (**Fig. 5**). Experimentan fisión y fusión para formar redes interconectadas. La fisión mitocondrial genera nuevas mitocondrias durante la división celular, facilita el transporte y la redistribución de las mitocondrias, y permite la eliminación de las mitocondrias alteradas, contribuyendo al control de calidad mitocondrial y promoviendo la apoptosis en respuesta a un estrés celular severo. En contraste, la fusión mitocondrial permite el intercambio de material intramitocondrial entre mitocondrias, esencial para mantener un conjunto equilibrado de proteínas mitocondriales, incluidas las enzimas de síntesis del ADNmt y proteínas de la cadena transportadora de electrones (ETC). La dinámica mitocondrial también incluye la mitofagia, un proceso mediante el cual las mitocondrias son dirigidas hacia los autofagosomas y posteriormente degradadas en los lisosomas, lo que mantiene una población mitocondrial saludable e inhibe la liberación de proteínas proapoptóticas a través de la eliminación selectiva de mitocondrias alteradas. Estos procesos continuos y dinámicos determinan la morfología, calidad, cantidad y distribución de las mitocondrias dentro de las células [78].

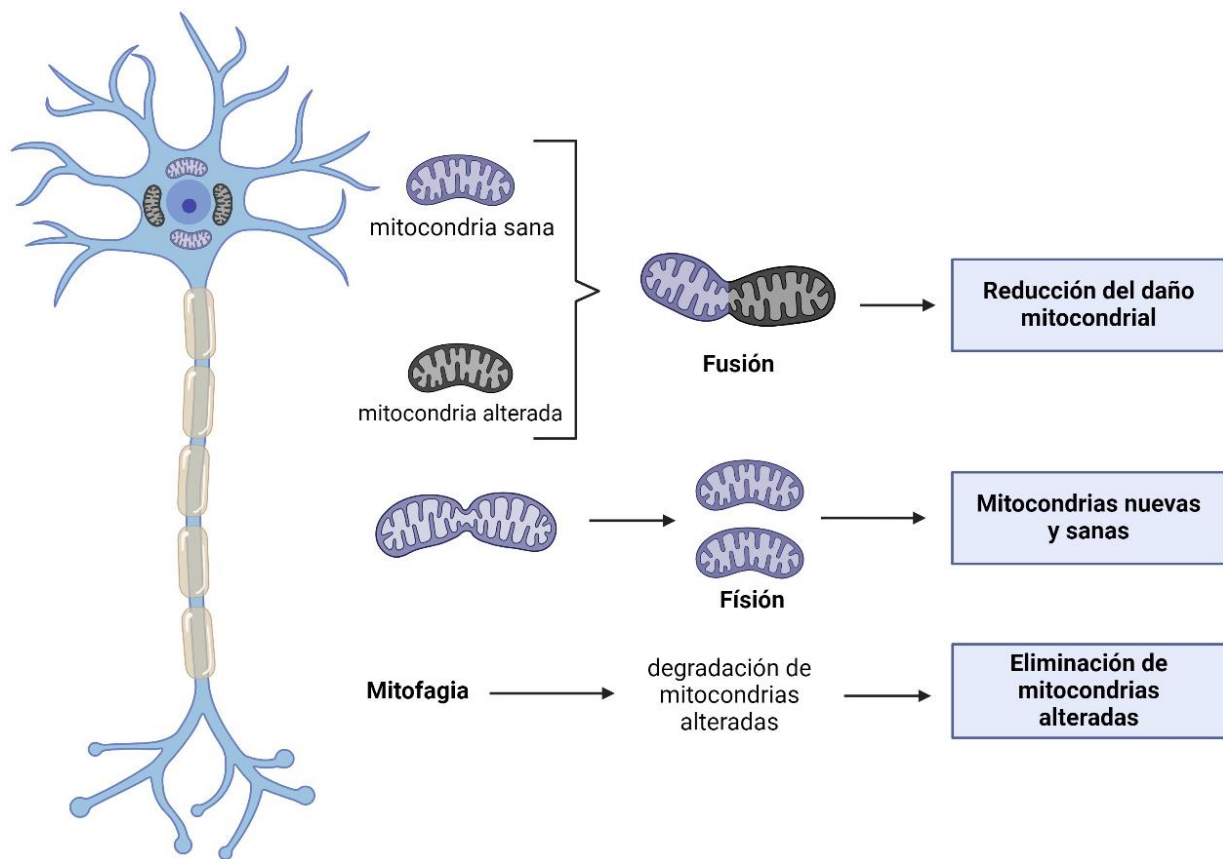


Figura 5: Mecanismos de mantenimiento de la salud mitocondrial. La fusión mitocondrial combina mitocondrias sanas y alteradas para mitigar el daño mitocondrial. La fisión permite la creación de nuevas mitocondrias saludables, mientras que la mitofagia elimina las mitocondrias irreversiblemente alteradas a través de su degradación.

1.6.2.2. ROS mitocondriales

Las mitocondrias también participan activamente en la producción de ROS fisiológica. Es más, la mayoría de las ROS intracelulares se producen en las mitocondrias, surgiendo como subproductos del metabolismo celular durante la respiración celular [79]. En la OXPHOS, los electrones liberados de los sustratos reductores son entregados al oxígeno para establecer el gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP desde el complejo F₀F₁, pero pueden fugarse prematuramente hacia el oxígeno desde otros complejos de la ETC. Si se fugan de uno en uno, generan radicales superóxidos, mientras que, si se fugan en pares, producen peróxido de hidrógeno [80] (**Fig. 6**). A diferencia del superóxido, el peróxido de hidrogeno puede

atravesar la membrana mitocondrial externa hacia el citoplasma, donde puede reaccionar con hierro reducido (Fe^{2+}) proveniente de proteínas hierro-azufre o hemo para generar el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), una ROS altamente reactiva, en un proceso conocido como reacción de Fenton [81-83]. Cuando la tasa metabólica es alta y hay una mayor demanda de ATP, el flujo de electrones a través de la ETC aumenta, resultando en una mayor probabilidad de fuga de electrones desde los complejos y, por lo tanto, una mayor producción de ROS [84].

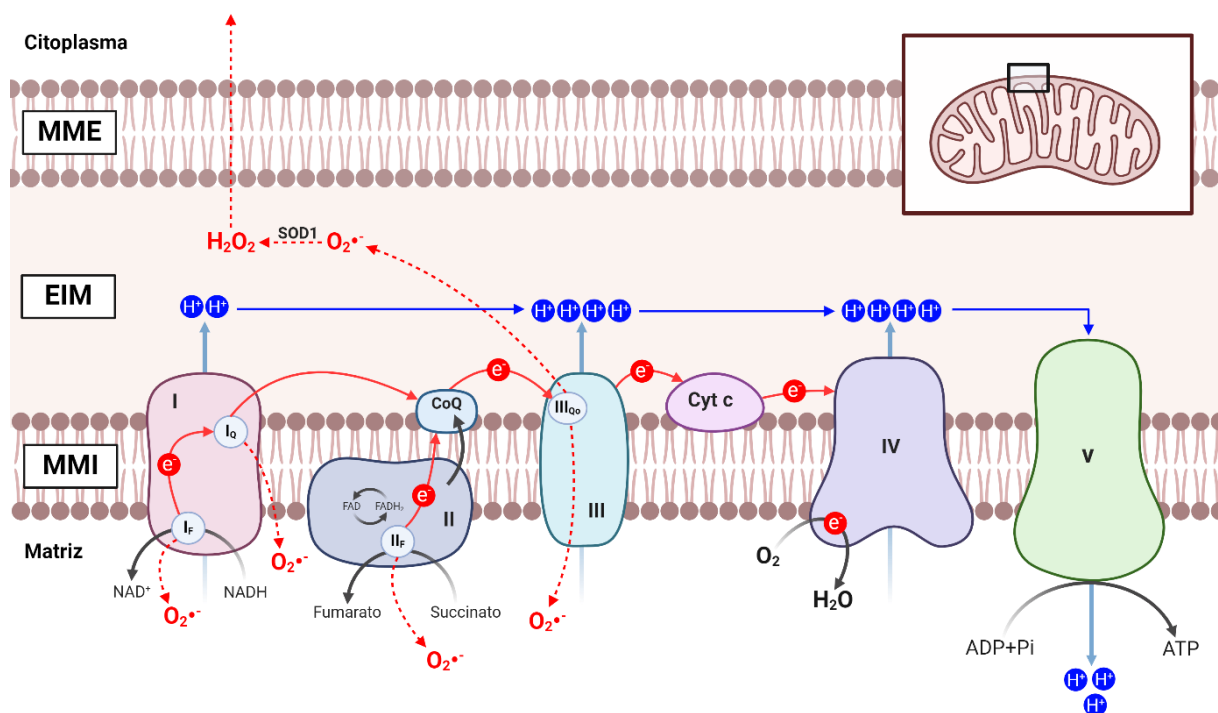


Figura 6: Sitios de fuga de electrones en la OXPHOS. Los electrones provenientes de sustratos oxidables son transferidos a través de los complejos I, III y IV o II, III y IV, en un proceso exergónico que impulsa el bombeo de protones desde los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembrana (EIM). El gradiente de protones resultante impulsa la síntesis de ATP en el complejo V. Las flechas rojas punteadas identifican los sitios de fuga de electrones, y por consiguiente de producción de ROS, las flechas rojas continuas señalan la trayectoria de los electrones a lo largo de la cadena, las flechas azules ilustran el recorrido de los protones, y las flechas negras representan las reacciones de los sustratos. MMI = Membrana mitocondrial interna. MME = Membrana mitocondrial externa. Adaptada de Zhao, R. y colaboradores, *Int. J. Mol. Med.*, 2019 [85].

1.6.3. Retroalimentación de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo

En condiciones normales, la producción de ROS está regulada por sistemas antioxidantes y cumple una función biológica relevante tanto en las funciones

mitocondrias como celulares [86,87]. Las ROS modulan la dinámica mitocondrial actuando sobre las proteínas de fusión y fisión, permitiendo la autorregulación de la morfología y función mitocondrial mediante la señalización mediada por el estado redox [76,80,83]. No obstante, un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes puede provocar estrés oxidativo en la mitocondria. Esto es particularmente evidente en el proceso del envejecimiento, donde las defensas antioxidantes del organismo disminuyen progresivamente y el daño oxidativo generado durante la OXPHOS va alterando biomoléculas tales como el ADNmt, proteínas y lípidos, lo que finalmente deteriora el ensamblaje y/o la función de la ETC, provocando una mayor fuga de electrones y por lo tanto, una mayor producción de ROS [88]. Esto perpetua el estado de estrés oxidativo y no solo interrumpe la bioenergética mitocondrial, sino que también altera el equilibrio de sus procesos dinámicos, resultando en mitocondrias fragmentadas que son menos eficientes en la producción de energía y más susceptibles a daños oxidativos adicionales [88-91].

El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial establecen un ciclo de retroalimentación perjudicial, en el cual las mitocondrias disfuncionales producen un exceso de ROS, dañando aún más las biomoléculas, exacerbando así la disfunción mitocondrial y el daño celular [92]. Esta interacción se ha observado en la EA, donde el estrés oxidativo y las anomalías mitocondriales previamente descritas son características importantes observadas en las neuronas afectadas [93].

1.6.4. El cerebro como órgano susceptible

El cerebro es un órgano complejo que tiene una alta demanda de oxígeno. A pesar de representar solo alrededor del 2% del peso corporal, utiliza aproximadamente el 20% del oxígeno total del organismo [94], lo que lo posiciona como un órgano con una tasa

metabólica muy elevada. Esto le permite sustentar funciones complejas, pero a su vez lo convierte en un sitio de alta generación de ROS. Si bien las ROS cumplen un rol importante la fisiología neuronal, como en la producción de precursores esenciales para procesos como la potenciación a largo plazo (LTP) ^[95], su exceso provoca la oxidación masiva de proteínas, peroxidación de lípidos y productos finales de glicación y lipoxidación avanzada (AGEs y ALEs, respectivamente). La acumulación excesiva de estos compuestos induce el entrecruzamiento y agregación de proteínas, alterando la señalización y el funcionamiento neuronal ^[96].

La disfunción mitocondrial es otro factor al cual el cerebro es especialmente susceptible. Debido a sus requerimientos energéticos, la población mitocondrial en las neuronas alcanza alrededor de los 2 millones de estos organelos por neurona ^[97], en contraste con otros tipos celulares, donde esta cifra varía entre 1000 y 2000 ^[98]. La plasticidad sináptica, por ejemplo, depende de la señalización de Ca^{2+} , y las neuronas invierten grandes cantidades de ATP para mantener el equilibrio intracelular de este ion. Las mitocondrias disfuncionales no solo producen menos ATP, sino que producen alteraciones en la homeostasis del calcio, perturbando la plasticidad sináptica ^[99].

Se ha evidenciado que los procesos anteriormente descritos son prevalentes en los cerebros de pacientes afectados con EA ^[100,101]. Estos cambios patológicos potencian el ciclo de retroalimentación entre el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, lo que lleva en última instancia a la muerte neuronal. Considerando que el cerebro tiene una alta demanda energética, abunda en contenidos lipídicos y además presenta un sistema de defensa antioxidante enzimático débil en comparación al de otros órganos, es de esperar que sea especialmente vulnerable al daño por estrés oxidativo ^[40].

1.7. Antioxidantes

A pesar de su importancia en los campos de la biología y la medicina, no existe un consenso universal sobre la definición precisa de “antioxidante.” Este término se emplea generalmente para referirse a una amplia gama de moléculas que pueden prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas. Sin embargo, las diferencias en las estructuras químicas y los mecanismos de acción de los distintos antioxidantes dificultan la elaboración de una definición precisa y única. En ese sentido, una declaración de consenso publicada en 2022 propuso dos posibles definiciones para el término ^[102]. Según el documento, un antioxidante puede definirse como “*cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo en una molécula específica*” o como “*una sustancia que reacciona con un oxidante para regular sus interacciones con otras moléculas, influyendo así en las vías de señalización dependientes del redox y/o en el daño oxidativo.*”

1.7.1. Sistemas de defensa antioxidante

Los sistemas de defensa antioxidante en el organismo pueden actuar en tres niveles ^[103]. El nivel primario incluye aquellos antioxidantes que participan activamente en la prevención de la formación de ROS mediante reacciones tales como la hidrólisis. En el nivel secundario, los antioxidantes intervienen capturando las ROS existentes. El nivel terciario se enfoca en la reparación de moléculas oxidadas, utilizando fuentes dietéticas o antioxidantes subsecuentes. También se ha propuesto un cuarto nivel que abarca una serie de procesos de adaptaciones celulares a niveles elevados de oxidantes ^[104].

Existen varias formas de clasificar a los antioxidantes de acuerdo con sus orígenes y funciones. En principio, se pueden dividir en dos grandes categorías: sintéticos y

naturales. Los antioxidantes sintéticos incluyen los nano-oxidantes como los óxidos y las nanopartículas metálicas, y estructuras fenólicas como BHA, BHT y TBHQ. Por otro lado, los antioxidantes naturales se pueden subdividir en endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos incluyen compuestos no enzimáticos como sustancias de bajo peso molecular y proteínas de unión a metales, como la ferritina y la albumina. También incluyen los antioxidantes enzimáticos, que a su vez pueden comprender en los sistemas de defensa previamente mencionados. Los antioxidantes exógenos, que provienen de fuentes externas, abarcan las vitaminas, minerales, carotenoides y polifenoles [105].

Para este estudio, nos enfocamos en una clasificación simplificada de los antioxidantes, diferenciando entre los de origen enzimático y no enzimáticos, destacando dentro de estos últimos las vitaminas (Fig. 7).

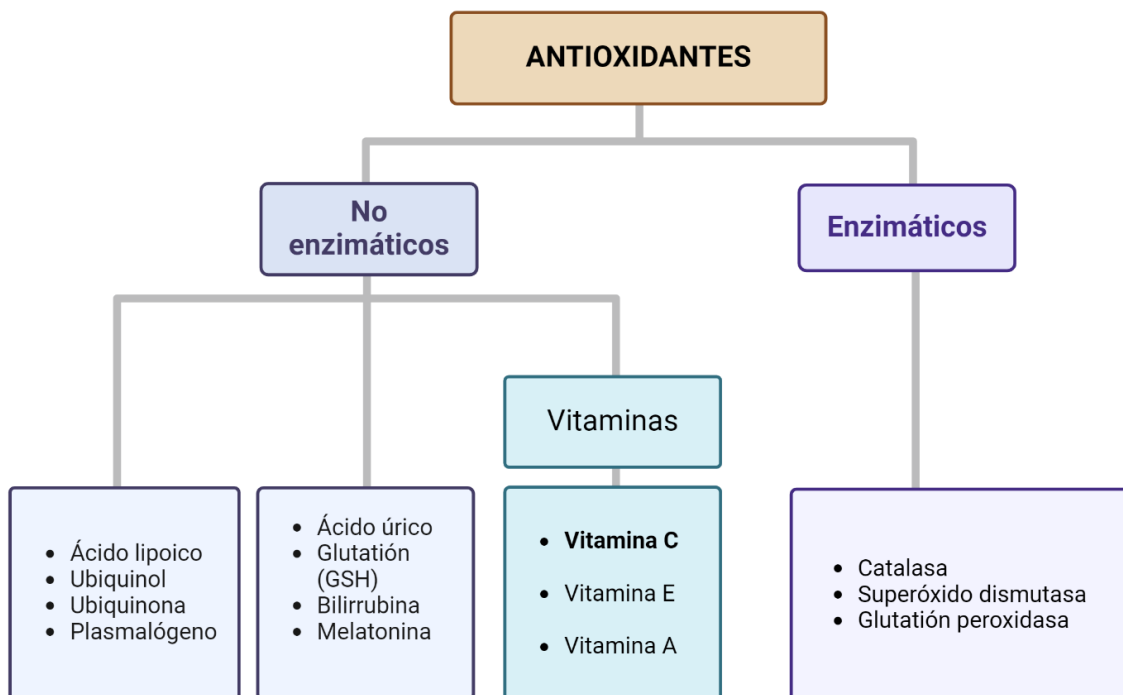


Figura 7: Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

1.7.2. Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos se consideran la primera de defensa contra el aumento de estrés oxidativo. Estos antioxidantes, como su nombre indica, involucran la acción de enzimas, por ejemplo, las superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y las glutatión peroxidasas (GPX), para prevenir la formación de ROS en exceso.

En breve, las SOD son enzimas que catalizan la conversión del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrogeno y en los mamíferos se identifican tres isoformas de estas, de las cuales la SOD2 se encuentra en las mitocondrias ^[106]. Las CAT cumplen un rol importante en la prevención del estrés oxidativo provocado por la producción de H₂O₂ durante los procesos metabólicos; catalizan de manera eficiente la descomposición heterolítica del H₂O₂, dando lugar a oxígeno y agua. Se encuentran distribuidas en todo el organismo, mostrando una mayor actividad en los hepatocitos y los glóbulos rojos ^[107]. Por último, las GPX tienen la función de catalizar la descomposición del H₂O₂ y los hidroperóxidos orgánicos, utilizando como sustrato el antioxidante tripéptido glutatión (GSH). En los mamíferos se han identificado al menos cuatro isoformas de estas, de las cuales la GPX1 es la más prevalente y la más eficiente neutralizando H₂O₂, mientras que las GPX4 muestran mayor actividad ante los hidroperóxidos lipídicos ^[108].

1.7.2.1. Antioxidantes enzimáticos en el cerebro

En el capítulo anterior se mencionó un sistema antioxidante débil como un factor que explica la vulnerabilidad del cerebro al estrés oxidativo. Esto se debe a los bajos niveles de enzimas antioxidantes en las neuronas. Particularmente, las neuronas presentan una actividad limitada de GPX debido a su bajo contenido de GSH ^[109] y

niveles de catalasa aproximadamente 50 veces menores que el de los hepatocitos [110]. Esta deficiencia restringe sus capacidades para degradar H_2O_2 , exponiéndolas al daño oxidativo tanto por H_2O_2 como por el radical $OH\cdot$ producido de este en la reacción de Fenton.

En ese sentido, estudios sugieren que el uso de antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C podría aminorar los efectos asociados al estrés oxidativo, sobre todo en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, como la EA [111,112].

1.7.3. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos complementan las defensas enzimáticas al neutralizar las ROS y prevenir el daño oxidativo mediante una variedad de mecanismos. Estudios recientes han destacado la importancia de esta variedad de antioxidantes en la protección contra el estrés oxidativo en varias patologías, demostrando que el uso combinado de estos compuestos antioxidantes puede potenciar la capacidad antioxidante general de las terapias farmacológicas, mejorando su biodisponibilidad en diversas localizaciones celulares [113,114]. Actualmente, la potencialidad terapéutica de los antioxidantes para prevenir y/o tratar el estrés oxidativo en condiciones patológicas, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas, sigue en estudio, tanto en animales como en ensayos clínicos [115].

Entre los antioxidantes no enzimáticos más conocidos se encuentran moléculas como el glutatión tripeptídico (GSH), la vitamina E y la vitamina C, las cuales actúan en la eliminación de radicales libres y en la regeneración de antioxidantes oxidados.

El glutatión, un tripéptido compuesto por glutamina, cisteína y glicina, es un antioxidante intracelular esencial presente en formas reducidas (GSH) y oxidadas (GSSG). Además de neutralizar directamente a las ROS, el glutatión actúa como un sustrato para la enzima GPX para que lleve a cabo su función. También participa en la detoxificación de sustancias nocivas a través de reacciones de conjugación facilitadas por las enzimas glutatión S-transferasas. Al mantener una alta proporción de GSH a GSSG, el glutatión contribuye a la protección de las células del daño oxidativo y apoya funciones celulares tales como la síntesis de ADN, proteínas, y regulación de la respuesta inmunitaria ^[108].

El α -tocoferol es la forma más biológicamente activa de la vitamina E. Al tratarse de un antioxidante liposoluble, el α -tocoferol es especialmente eficaz neutralizando las ROS que pueden causar la peroxidación de lípidos en las membranas celulares, preservando así la integridad y funcionalidad de las membranas celulares.

1.8. Vitamina C

La vitamina C es esencial para el mantenimiento de la fisiología humana normal. Una deficiencia prolongada de vitamina C en la dieta conduce al desarrollo de escorbuto, una enfermedad caracterizada por un deterioro acelerado de la integridad del tejido conectivo y las mucosas del cuerpo, incluyendo los vasos sanguíneos. Esta desempeña un papel importante en la prevención del escorbuto a través de su influencia directa en la síntesis de colágeno, así como en el desarrollo del sistema hematopoyético y la función de los leucocitos ^[116,117]. Se ha observado que también participa en la síntesis de carnitina, melanina, péptidos neuroendocrinos y neurotransmisores ^[118]. Adicionalmente, ha demostrado ser un potente agente

reductor y antioxidante en estudios científicos. Por ejemplo, se ha comprobado que, en conjunto con la vitamina E, la vitamina C tiene la capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos de membrana y de funcionar como un agente captador de radicales libres en el cerebro ^[119].

A pesar de que la mayoría de los seres vivos tienen la capacidad de sintetizar la vitamina C a partir de la glucosa en órganos como el hígado o el páncreas, existen especies, entre estas los humanos, que son incapaces de llevar a cabo este proceso. Esto se debe a que en ellas se ha perdido la enzima L-gulono- γ -lactona oxidasa, necesaria en la etapa final de la síntesis de vitamina C, a causa de mutaciones importantes en la secuencia de ADN que la codifica ^[120]. Por lo tanto, para el caso de estas especies, la vitamina C se considera no solo un antioxidante no enzimático, sino que además un componente exógeno que deben obtener desde su dieta ^[121].

Si bien el escorbuto es poco común en los países desarrollados actualmente, existe un déficit importante de vitamina C en la población ^[122]. Esta condición afecta alrededor del 15% de la población adulta, siendo más frecuente en grupos específicos como personas de bajo nivel socioeconómico y la tercera edad ^[123]. En efecto, hay estudios que sugieren que la ingesta diaria recomendada de vitamina C debería ser de 200 hasta incluso 400 mg para adultos sanos ^[124-126], una cifra significativamente superior a la dosis diaria recomendada por los institutos de salud pública (entre 75 y 125 mg) ^[127,128].

Para evaluar cómo afecta la deficiencia de vitamina C al sistema nervioso central, se han realizado estudios en modelos animales de Alzheimer cuyo gen codificante para

la enzima L-gulono- γ -lactona oxidasa ha sido silenciado, inhibiendo la síntesis de vitamina C. Estos estudios demostraron que una alta ingesta de vitamina C reduce los signos patológicos asociados a la EA, disminuyendo la carga de placas oligoméricas de A β en la corteza y el hipocampo y preservando la morfología mitocondrial, entre otros efectos ^[129]. Esto sugiere que una ingesta adecuada de vitamina C podría ejercer un rol en la ralentización de la EA.

1.8.1. Formas de la vitamina C

La vitamina C se presenta en el organismo en dos formas biológicamente activas, su forma reducida, el ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (DHA), siendo la primera forma la predominante en células y tejidos. En el plasma sanguíneo, el AA alcanza concentraciones que oscilan entre los 30 y 60 μM ^[130]. En su forma reducida, la vitamina C puede neutralizar las ROS antes de que causen daño celular, convirtiéndose posteriormente en su forma oxidada, el DHA. El DHA tiene una vida media baja en los sistemas biológicos, aproximadamente 6 minutos; puede ser reducido nuevamente a AA por acción de reductasas en un mecanismo de reciclaje ^[131], o bien puede sufrir hidrólisis irreversible para formar ácido dicetogulónico, el que es eliminado del organismo. Debido a sus características químicas, la difusión de ambos AA y DHA a través de la membrana plasmática es mínima. Sin embargo, un estudio realizado en 1998 demostró que los niveles de AA en diversos tejidos y células son significativamente más altos que en el plasma, alcanzando el orden de los milimolares en algunos casos como el cerebro ^[121,132]. Esta observación implicó que la vitamina C tiende a acumularse dentro de las células, sugiriendo la existencia de proteínas transportadoras de vitamina C, en especial una con capacidades concentrativas.

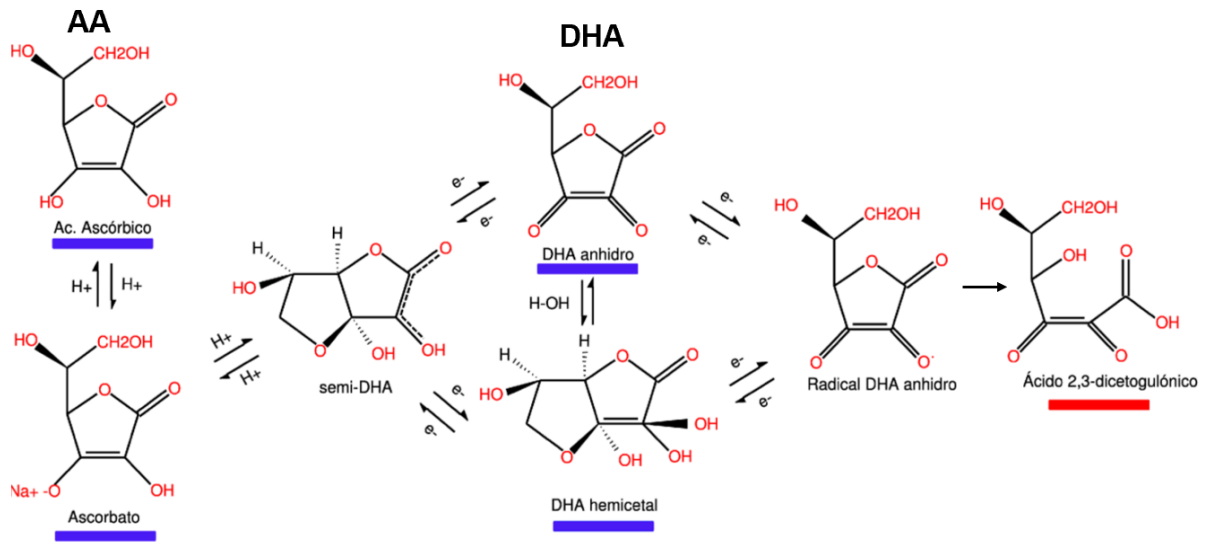


Figura 8: Reacciones redox y vías de reciclaje/degradación de la vitamina C. El AA se oxida para formar DHA a través del radical semi-DHA intermedio. El DHA, a su vez, puede existir tanto en una forma anhidra o como hemicetal, y luego degradarse en un radical DHA. Si este no es reducido a AA, es hidrolizado de forma irreversible a ácido 2,3-dicetogulónico, el cual carece de actividad biológica y es eliminado por el organismo.

1.8.2. Transporte de vitamina C

Actualmente, se establece que la vitamina C ingresa a las células a través de dos sistemas diferentes. Los transportadores de glucosa (GLUTs) transportan a la vitamina C en su forma oxidada, DHA, a favor de su gradiente de concentración. Por otro lado, el AA es transportado mediante los cotransportadores de ácido ascórbico dependientes de sodio (SVCT), que utilizan la gradiente de este ion para incorporar el AA al medio intracelular ^[133].

1.8.2.1. Transportadores facilitativos de glucosa (GLUT)

El transporte de DHA es llevado a cabo a favor de su gradiente a través de los transportadores GLUT, particularmente las isoformas 1, 2, 3, 4 y 8 ^[134]. Una vez dentro de la célula, el DHA se convierte rápidamente en AA mediante la acción de enzimas con actividad reductasa, permitiendo la acumulación de AA intracelular ^[135].

Investigaciones que han expresado estos transportadores de mamíferos en ovocitos de *Xenopus* han demostrado que GLUT2 y GLUT8 presentan una baja afinidad por el DHA, mientras que GLUT1 y GLUT3 tienen una alta afinidad y capacidad para transportar DHA, casi de manera análoga a la glucosa [136]. Sin embargo, si bien existen transportadores GLUT1 en la barrera hematoencefálica, estos no representan la vía principal de incorporación de vitamina C en SNC. Esto debido a que, en primer lugar, el AA es la forma predominante de la vitamina C en el plasma sanguíneo en condiciones fisiológicas, mientras que la presencia de DHA es mínima; en consecuencia, la absorción de DHA a través de GLUT1 se ve altamente limitada por la competencia que se produce entre esta y la glucosa, cuya concentración y vida media en el plasma es considerablemente superior. Además, se ha mencionado anteriormente que el cerebro posee una de las concentraciones más elevadas de AA en el organismo, alcanzando hasta 10 mM [132]. El paso del AA, desde un compartimento donde se concentra en unidades de los micromolares, hacia uno donde la concentración alcanza el orden de los milimolares, no puede sustentarse por un transporte facilitado como el de los transportadores GLUT y destaca, finalmente, la necesidad de un mecanismo de transporte concentrativo para explicar la acumulación de la vitamina C en el cerebro.

1.8.2.2. Familia de transportadores concentrativos SLC23

La familia *SLC23* corresponde a glucoproteínas que conforman un grupo de transportadores de nucleobases que incluye la permeasa de purinas general, el transportador bacteriano, el transportador de uracilo, la permeasa de uracilo unida a la membrana. Además, también la conforman los transportadores concentrativos dependientes de sodio (NAT), entre los cuales se encuentran los cotransportadores de vitamina C dependientes de sodio (SVCTs).

Los cotransportadores SVCT se descubrieron a través de varios experimentos con AA radioactivo en distintos modelos celulares y vesículas de membrana de diferentes animales, como sistemas que concentran activamente el AA en compartimentos celulares ^[137]. La clonación de estos transportadores comenzó en 1992, con cDNA de riñón de rata, donde se identificó una proteína de 604 aminoácidos a la que designaron como rSVCT1. A continuación, se identificó un segundo cDNA que codificaba una proteína de 592 aminoácidos, la que llamaron rSVCT2, que además tenía un 65% de similitud con rSVCT2 ^[138]. Ese mismo año, una investigación dirigida a caracterizar las variantes humanas de estas proteínas reveló, en un alineamiento de secuencias, que las secuencias de rSVCT1 y rSVCT2 compartían un 95% de identidad con *YSPL3* e *YSPL2*, respectivamente, dos secuencias humanas previamente identificadas ^[139]. Anteriormente, estas secuencias humanas habían sido clonadas pero no caracterizadas funcionalmente, bajo la creencia de que se trataban de transportadores de nucleobases ^[140]. Desde su caracterización entonces, los genes que codifican a hSVCT1 y hSVCT2 se rebautizaron, correlativamente, como *SLC23A1* y *SLC23A2*, y se identificaron como una subfamilia paróloga que comparte un 66% de identidad ^[141].

Además de estos genes, se han identificado a otras dos secuencias adicionales relacionadas a la familia de *SLC23* en estudios genómicos: *SLC23A3* y *SLC23A4*.

Si bien *SLC23A1* y *SLC23A2* forman un clado separado, ambos comparten aproximadamente un 50% de identidad con *SLC23A4* ^[142], mientras que *SLC23A3* presenta un 31% de coincidencia con solo con *SLC23A2* ^[141]. Durante varios años, ambas proteínas codificadas por estos genes adicionales fueron descritas en la literatura como proteínas huérfanas debido a la falta de conocimiento sobre sus funciones. Sin embargo, en un estudio publicado recientemente se ha clonado y expresado la proteína humana codificada por el gen *SLC23A3* en una línea celular

renal porcina, y los hallazgos de esta investigación sugieren que este gen podría en realidad ser un candidato para una proteína que puede actuar como un intercambiador de hipoxantina/xantina ^[143]. Respecto a *SLC23A4*, se ha visto que en ratas codifica a una proteína transportadora de nucleobases, mientras que los ortólogo en primates, incluidos los humanos, corresponden a pseudogenes truncados ^[142].

Paralelamente, se han identificado variantes de SVCT1 y SVCT2 resultantes del proceso de *splicing* alternativo. Para el caso de SVCT1, la variante fue identificada en la línea celular humana CaCo-2 y tejido intestinal humano, y surge de la inserción de cuatro aminoácidos (VGLH) en la región del segundo “loop” extracelular entre los TMD 3 y 4 de SVCT1, específicamente entre los aminoácidos E155 y V156 ^[144]. El mecanismo molecular por el cual esta alteración estructural resulta en la pérdida de la función aún no se ha determinado. Por otro lado, la variante de SVCT2 fue inicialmente identificada en tejido cerebral fetal humano, y también se trata de una proteína de entre 55 y 80 kDa, incapaz de transportar AA que, a diferencia del SVCT2, carece completamente de los TMD 5 y 6 y tiene parcialmente eliminado el dominio 4. Es interesante notar que esta variante corta no solo no es funcional, sino que además ejerce un efecto dominante-negativo sobre SVCT1 y SVCT2, inhibiendo el transporte de AA en ambos transportadores. El mecanismo detrás de este fenómeno no está bien dilucidado, aunque la localización conjunta de ambos SVCT2 y su variante corta en la superficie celular sugiere que podría atribuirse a interacciones proteína-proteína ^[145-147].

1.8.2.3. Caracterización de los cotransportadores concentrativos de ácido ascórbico dependientes del sodio SVCT1 y SVCT2

Como se mencionó anteriormente, en humanos los SVCTs se transcriben a partir de dos genes diferentes. El gen *SLC23A1*, localizado en el locus cromosomal 5q31.2-31.3, codifica para SVCT1 dando como producto una proteína de 598 aminoácidos. Por otro lado, el gen *SLC23A2*, en el locus cromosomal 20p12.2-12.3, codifica para SVCT2 y genera como producto a una proteína de 650 aminoácidos^[148]. La homología de estos transportadores entre diferentes especies es de aproximadamente 90% para ambos ARNm, y la mayor parte de la información sobre la estructura de estas proteínas proviene de predicciones basadas en su secuencias primarias de aminoácidos y análisis de Western blots^[144].

Si bien no comparten características estructurales con otros NAT, se ha demostrado que tanto en ratas y ratones, los transportadores SVCT1 y SVCT2 presentan una coincidencia moderada de aminoácidos con los de humanos, alcanzando un porcentaje identidad de 65% y 60%, respectivamente^[138,140]. Ambos transportadores son proteínas transmembrana que poseen 12 TMD, con sus extremos N- y C-terminales orientados hacia el citoplasma de la célula, y un lazo extracelular entre los dominios 7 y 8 con una serie de residuos de prolina conservados, esenciales para mantener la estabilidad de la estructura y la eficiencia del transporte.

El transporte realizado por estas proteínas está mediado por del sodio, presentando una relación sigmoideal. Tanto SVCT1 como SVCT2 cotransportan sodio y AA con y presentan un coeficiente de Hill de 2, indicando la presencia de dos sitios de unión de sodio. El transporte en ambos se lleva a cabo con una estequiometría de 2:1, siguiendo el gradiente electroquímico del sodio^[137,149,150]. SVCT1 transporta AA con

valores de K_m de aproximadamente 70 μM , aunque se ha visto que este valor puede oscilar entre 65 y 240 μM dependiendo de la línea celular o el sistema de expresión heterólogo utilizado. La K_m de SVCT2, en cambio, varía entre los valores de 15 y 62 μM [151,152]. Se ha observado que el proceso de transporte por SVCT1 es electrogénico, a diferencia del de SVCT2, que no presenta esta característica. Ambos transportadores son sensibles al pH, funcionando de manera óptima alrededor de un pH de 7.5. Por último, es importante destacar que ambos transportadores son únicamente específicos para el L-ácido ascórbico y no transportan otras formas como su D-enantiómero o el DHA [152].

1.8.2.4. Regulación de los cotransportadores concentrativos de ácido ascórbico dependientes del sodio SVCT1 y SVCT2

La función de los SVCTs depende de los iones de sodio; el AA es incorporado en contra de su gradiente de concentración, facilitado por la energía proporcionada por el gradiente de sodio establecido por la Na^+/K^+ ATPasa [133,153,154]. En ese sentido, se ha observado que la sustitución de sodio por otros iones, como potasio, litio o colina, resulta en la inhibición de la captación de AA. Además, se ha demostrado que el proceso de transporte del AA también depende de los iones de calcio y magnesio, siendo necesario al menos uno de estos para el transporte, ya que su ausencia simultánea casi lo anula [152].

El transporte mediado por SVCTs también se ve regulado por la cantidad de transportadores disponibles, población que se ve influenciada por la síntesis, degradación, activación de transportadores inactivos o redistribución dentro de la célula en variadas circunstancias. Por ejemplo, se ha visto que los niveles de mRNA de SVCT2 aumentan en respuesta a la presencia de factores como suero bovino fetal

(FBS), factor de crecimiento epidermal (EGF), glucocorticoides, zinc y calcio [155,156]. Otros estudios en modelos *in vivo* han revelado que SVCT2 se regula al alza en respuesta a la isquemia cerebral [157] y disminuye en la diferenciación muscular [158]. Respecto a SVCT1, numerosos estudios han investigado la edad como un factor modulador de su expresión, sin embargo, los resultados son contradictorios y no existe un consenso establecido al presente [159-161].

Respecto a posibles modificaciones postraduccionales, como la glucosilación y fosforilación, el análisis de la secuencia primaria de SVCT1 y SVCT2 ha identificado la presencia de cinco posibles sitios de fosforilación por proteína quinasa C (PKC), los cuales podrían actuar como puntos clave para la regulación postraducciona [139] **(Fig. 9)**. En el caso de SVCT1, estos sitios se localizan principalmente en la región del extremo C-terminal [144], mientras que en SVCT2 se distribuyen a lo largo de toda la proteína [162]. También se ha identificado un potencial sitio de fosforilación por proteína quinasa A (PKA) en el extremo C-terminal de SVCT1, el cual no está presente en SVCT2, lo que sugiere diferencias en los mecanismos de regulación entre ambas proteínas [137]. Estudios comparativos han sugerido que ambos transportadores poseen sitios de N-glucosilación en sus regiones extracelulares, con SVCT2 presentando, además, sitios únicos adicionales [163,164]. Además, las regiones N-terminales de ambos transportadores son altamente hidrofílicas y ricas en residuos ácidos, lo que puede contribuir a la regulación de las interacciones de estos con otras proteínas.

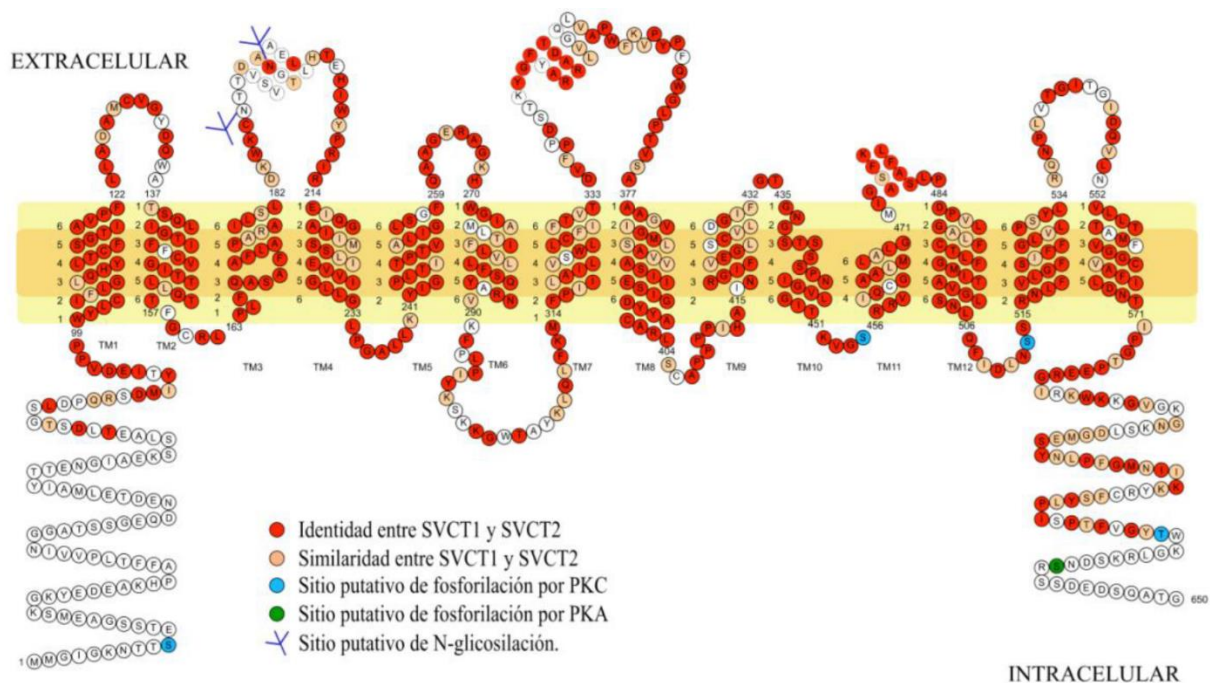


Figura 9: Modelo propuesto de la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico SVCT. Se muestra la secuencia de aminoácidos de SVCT2 junto con la estructura secundaria propuesta, basada en su perfil de hidrofobicidad, y se compara con SVCT1. Los residuos de aminoácidos en rojo corresponden a aquellos idénticos entre SVCT1 y SVCT2, mientras que los residuos naranjos indican las similitudes entre ambos transportadores. Los residuos celestes representan los sitios de fosforilación por PKC, y los verdes, los sitios de fosforilación por PKA. Además, se señalan los sitios de N-glicosilación

1.8.2.5. Rol fisiológico de los cotransportadores concentrativos de ácido ascórbico dependientes del sodio SVCT1 y SVCT2

Análisis de Northern blots han revelado que SVCT2 presenta una distribución más amplia en comparación a SVCT1. SVCT1 se encuentra mayoritariamente en tejidos epiteliales, especialmente en las membranas del borde en cepillo apical de las células intestinales y de los túbulos renales [27], mientras que SVCT2 se expresa predominantemente en el SNC, en las neuronas distribuidas en distintas áreas del cerebro, como la corteza, el hipocampo, el núcleo accumbens y los precursores cerebrales [138,165-167]

Respecto a los roles fisiológicos de los SVCTs, el SVCT1 mantiene principalmente la homeostasis del AA a través de su absorción intestinal y reabsorción desde tubo

digestivo y el torrente sanguíneo [144], mientras que SVCT2 es esencial para la distribución de AA desde el torrente sanguíneo hacia los diferentes tejidos, especialmente órganos especializados con actividad metabólica elevada y alta producción de ROS [27,138,168]

En ese sentido, se ha observado que, para el caso de las neuronas, SVCT2 participa del desarrollo y la función neuronal, y contribuye a la protección contra el daño asociado el estrés oxidativo [169]. Incluso, estudios de knockout en ratones han demostrado la importancia vital de SVCT2 para la supervivencia, ya que las crías SVCT2^{-/-} mueren poco después del nacimiento, presentando hemorragias cerebrales e insuficiencia respiratoria, probablemente debido a fallas en los procesos a nivel de SNC [170]. Por su parte, los ratones heterocigotos SVCT2^{+/-} presentan bajos niveles de AA en varios órganos y tejidos, especialmente en el cerebro, déficit que se acentúa a medida que envejecen [170-172]

1.8.2.6. Rol del contrantransportador SVCT2 en la mitocondria

Los transportadores de AA y su forma oxidada en las mitocondrias son esenciales debido a la naturaleza cargada e hidrofílica de estas moléculas. A lo largo de los años, se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos involucrados en este proceso, y se ha sugerido que la incorporación de vitamina C en las mitocondrias se realiza mediante el transporte de DHA. Esto se fundamenta en la presencia de transportadores GLUTs en las mitocondrias, a pesar de que la glucosa no parece tener un papel directo en el metabolismo mitocondrial. Adicionalmente, la expresión de transportadores de alta capacidad, como lo son los GLUTs, se consideraría ventajosa en situaciones de estrés oxidativo en las mitocondrias.

En esa misma línea, la posibilidad de un transporte mitocondrial de AA se ha considerado improbable debido a la alta afinidad de los SVCTs, lo que permite su plena actividad a concentraciones de AA considerablemente más bajas que las detectadas en el citosol de diversos tipos celulares *in vivo*. Además, existen dos razones adicionales que desestiman la participación de los SVCTs en el transporte mitocondrial de vitamina C. En primer lugar, la dependencia de sodio de estos transportadores no parece ser compatible con las concentraciones de este ion en el medio intracelular. En segundo lugar, tanto la localización como la función de un SVCT2 mitocondrial se sustentan en sus requerimientos de calcio para alcanzar su máxima actividad. En condiciones de reposo, existe una marcada diferencia en las concentraciones de calcio entre el medio extracelular y los compartimentos celulares, casi de cuatro ordenes de magnitud, y si bien existe una posibilidad de aumento transitorio de este ion en dichos compartimentos tras la estimulación, sus concentraciones siguen manteniéndose notablemente inferiores a las del exterior.

A pesar las observaciones y consideraciones lógicas previas, recientemente se ha descrito una isoforma del transportador SVCT2 de entre 28 y 35 kDa que se expresa en las membranas de las mitocondrias ^[173-175]. Otras investigaciones también han encontrado evidencia de la presencia de inmunorreactividad de SVCT2 en las mitocondrias de una línea celular humana de cáncer de sistema linfático (U937), donde la exposición a AA se relacionó con la acumulación mitocondrial de bajas concentraciones de AA ^[176]. Siguiendo esa línea, estudios posteriores de otros laboratorios han demostrado que esta isoforma está altamente expresada en células y tejidos tumorales de cánceres agresivos, mientras que su expresión en tejidos sanos es baja ^[177]. Estos hallazgos han sido confirmados posteriormente en una línea celular

humana de riñón fetal (HEK293), donde han calificado a esta isoforma de SVCT2 como un transportador mitocondrial de baja afinidad, debido a las concentraciones intracelulares bajas de sodio ^[177].

En base a la evidencia previamente presentada, se establece la existencia de un vínculo entre la respuesta celular al estrés oxidativo y un aumento de la expresión del transportador SVCT2 a nivel mitocondrial. Por otro lado, se ha demostrado que los oligómeros del péptido β -amiloide generan un alza en la producción de ROS, promoviendo un estado de estrés oxidativo en las neuronas. Esto plantea la interrogante de si la presencia de A β O, un marcador distintivo de la enfermedad de Alzheimer induce cambios en los niveles de expresión mitocondrial del transportador SVCT2.

2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa en la que convergen eventos como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la acumulación de oligómeros solubles del péptido A β . Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la fosforilación oxidativa mitocondrial contribuyen sin lugar a duda al estrés oxidativo, causando daños celulares. En ese sentido, los antioxidantes como la vitamina C juegan un papel importante en la mitigación del estrés oxidativo al preservar la integridad y la función mitocondrial.

Investigaciones previas han sugerido que la vitamina C ingresa a las mitocondrias como ácido deshidroascórbico (DHA) a través de transportadores de glucosa (GLUTs). Sin embargo, dado a que la vitamina C se acumula intracelularmente como ácido ascórbico (AA), surge la interrogante de si los transportadores de ácido ascórbico dependientes de sodio (SVCTs) también están involucrados en su captación mitocondrial. Evidencias recientes sugieren que SVCT2, típicamente descrito como un transportador de membrana plasmática, podría localizarse en las mitocondrias y mediar la captación de vitamina C en estos organelos. Este hallazgo ha sido observado en diversas líneas celulares humanas, aunque no se ha demostrado en otros modelos.

La situación es más compleja en ratones, que sintetizan su propia vitamina C y donde la presencia de SVCT2 en las mitocondrias no ha sido confirmada. Además, los anticuerpos disponibles para SVCT2 no logran detectarla en las mitocondrial de ratones, lo que plantea la incógnita de si los ratones no expresan esta variante mitocondrial o si esta se localiza en otros organelos. Por otro lado, los A β O_s son

conocidos por su capacidad para causar disfunción mitocondrial, pudiendo alterar la localización o función del SVCT2 en las mitocondrias, lo que tampoco no ha sido explorado.

Dado a que las neuronas hipocampales son un modelo relevante para estudiar enfermedades neurodegenerativas como la EA, esta tesis tiene como objetivo dilucidar la expresión de SVCT2 y si la exposición de A β O s afecta su expresión y localización, en modelos de ratón. A pesar de la limitación en el uso de anticuerpos específicos, las células de ratones ofrecen un modelo accesible y bien establecido para investigar el rol de SVCT2 en el estrés oxidativo inducido por A β O s y en la disfunción mitocondrial. Este enfoque ofrece nuevas perspectivas sobre la contribución de SVCT2 en modelos murinos, al estudio de enfermedades neurodegenerativas como la EA.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El transportador concentrativo de ácido ascórbico dependiente de sodio SVCT2 se localiza en la mitocondria, y aumenta sus niveles de expresión en presencia de oligómeros del péptido A β en neuronas hipocampales de ratón y células CAD.

Objetivo general

Evaluar los cambios en los niveles de expresión del transportador SVCT2 a nivel mitocondrial en un modelo asociado al contexto de la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos específicos

1. Describir las formas de SVCT2 presentes en células humanas y de ratón utilizando distintos anticuerpos dirigidos contra SVCT2.
2. Determinar *in vitro* los niveles de expresión del transportador SVCT2 mitocondrial en una línea celular tipo neuronal de ratón (CAD) y un cultivo celular de neuronas hipocampales de ratón en respuesta a oligómeros del péptido β -amiloide (A β Os).
3. Analizar los niveles de expresión del transportador SVCT2 en tejido cerebral humano que exhibe distintos grados de anomalías neurodegenerativas asociadas a la acumulación de oligómeros del péptido A β .

4. METODOS Y MATERIALES

4.1. Cultivo celulares

Las condiciones de cultivo fueron a una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad, a una temperatura de 37°C. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de bioseguridad clase II.

4.1.1. Línea celular CAD (ECACC 08100805)

Las células CAD, derivadas de un tumor neuronal catecolaminérgico de ratón, se cultivaron en placas de 10 cm² (Falcon) con 10 ml de medio de cultivo DMEM/F12™ (Reduced Serum Media, Thermo Fisher Scientific), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Hyclone), 1% de glutamina y 100 U/mL de antibióticos penicilina/estreptomicina (Corning). Se realizaron cambios de medio cada 48 horas.

4.1.1.1. Diferenciación de células CAD a un fenotipo tipo neuronal

Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se lavaron con 3 ml de PBS 1X (Gibco) y se cambió el medio a medio de diferenciación (Opti-MEM™ Reduced Serum Media, Thermo Fisher Scientific, sin suplementar). Posteriormente, se disociaron mecánicamente y se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro para ensayos de inmunofluorescencia. Para los ensayos de Western blot, las células se mantuvieron en sus placas originales, realizando únicamente el lavado y cambio a medio de diferenciación. A los cuatro días de cultivo in vitro en el medio de diferenciación, las células presentaron un fenotipo neuronal, caracterizado por la aparición de neuritas.

4.1.2. Línea celular ZR-75

Las células se cultivaron en placas de 10 cm² en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FBS y 100U/mL penicilina/estreptomicina, realizando cambios de medios cada 48 horas. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, las células se sembraron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos de 12 mm para ensayos de inmunofluorescencia. Para ello, se lavaron con PBS 1X y se trataron con tripsina al 0.25% durante 15 minutos a 37°C para su disociación. Luego, se neutralizó la tripsina con medio, se recolectaron las células y se centrifugaron a 1000rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante de tripsina y las células se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo RPMI suplementado. Posteriormente, se contaron utilizando el método de exclusión de tripán en una cámara de Neubauer. La densidad utilizada para la siembra fue de 100.000 células/mL. Para los ensayos de Western blot, las células se mantuvieron en sus placas originales.

4.1.3. Línea celular SH-SY5Y

Las células fueron cultivadas en placas de 10 cm² en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina, realizando cambios de medios cada 48 horas. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se sembraron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos de 12mm para ensayos de inmunofluorescencia, siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito para la línea ZR-75, con las únicas diferencias en el tiempo de incubación con tripsina (5 minutos a 37°C) y el medio de homogenización (DMEM/F12 suplementado). La densidad utilizada para la siembra también fue de 100.000 células/mL. Para los ensayos de Western blot, las células se mantuvieron en sus placas originales.

4.1.4. Cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón

Las ratonas C57BL/6, con dieciocho días de gestación, fueron tratadas conforme a las normativas del comité de ética de la Universidad de Concepción. Se anestesiaron profundamente mediante inhalación de CO₂ y luego sacrificaron por dislocación cervical. Bajo lupa estereoscópica, las regiones hipocampales de los embriones fueron microdisecionadas, disociadas y sembradas en placas a una densidad de 320.000 células/mL, utilizando medio de cultivo para siembra (MEM suplementado con HS al 10%, 4 µg/mL de DNasa y 2 mM de L-glutamina) durante las primeras 24 horas. Posteriormente, el medio de siembra se cambió por un medio de alimentación (MEM, HS al 2%, FBS al 10% y N3 al 0.5%). Las neuronas se utilizaron a los 11 días de incubación *in vitro* (DIV).

4.2. Tejidos cerebrales humanos

Las muestras fueron obtenidas a través del programa NeuroCEB, donde los donantes o sus familiares más cercanos firmaron el consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por el comité científico del Banco de Cerebros. Todo el procedimiento del Banco de Cerebros fue revisado y aceptado por el Comité Ético de Protección de las Personas Île-de-France VI, y ha sido declarado al Ministerio de Investigación y Educación Superior según lo solicitado por la ley francesa.

Se analizaron las muestras congeladas del isocórtex temporal superior T1 (todas las regiones) de sujetos con comorbilidad de Alzheimer y Parkinson. La enfermedad de Alzheimer fue diagnosticada de acuerdo con los criterios del Instituto Nacional de Envejecimiento de Francia (INSERM) y evaluada mediante la estadificación

neuropatológica para patología de tau y amiloide en el Instituto de Neuropatología del Hospital La Pitié-Salpêtrière. También se analizaron los tejidos fijados en formalina e incrustados en parafina de los mismos casos. Las edades promedio y los tiempos post-mortem de los casos de control y de los pacientes con enfermedad de Alzheimer no fueron significativamente diferentes, siendo la edad promedio de fallecimiento de $74,3 \pm 10,7$ años para los casos de control ($n = 38$) y de $72,7 \pm 12,4$ años para los pacientes con enfermedad de Alzheimer ($n = 76$), respectivamente.

Se obtuvieron muestras fijadas en formalina de cerebelo, hipocampo y corteza frontal de 8 pacientes. Por cada región se obtuvieron cinco cortes en parafina de $3 \mu\text{M}$ por microtomo.

4.3. Agregación de oligómeros solubles del péptido A β ₄₀

Siguiendo el protocolo establecido por colaboradores del laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos [178], el péptido A β ₄₀ liofilizado (GenicBio, Shanghai, China) fue reconstituido en DMSO a una concentración de 2,3 mM. Una alícuota de 2 μL ese stock se disolvió en PBS 1X estéril pH 7,4 para obtener una solución de 80 μM . Los péptidos se sometieron a agregación mediante agitación vertical durante dos horas a 500 rpm y 37°C y, una vez transcurrido ese tiempo, a dos horas a 500 rpm a temperatura de ambiente. Finalmente, la solución se sometió a un shock térmico de 30 minutos a 4°C. Los oligómeros solubles del A β (A β Os) se utilizaron a concentraciones crecientes para tratar las líneas celulares y los cultivos primarios durante 24 horas.

4.4. Ensayo de viabilidad MTT

El ensayo MTT es un técnica colorimétrica utilizado para evaluar la actividad metabólica celular. El fundamento de este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolio amarilla MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a cristales de formazán de color púrpura por células metabólicamente activas.

Para su ejecución, se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos. Después del tratamiento con AβOs, se aspiró el medio de las placas y se agregaron 100 µL de MTT (1 mg/mL) a cada pocillo, incubándose la placa durante 4 horas a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 100 µL de isopropanol a las placas, bajo agitación. Después de 15 minutos, se realizó la lectura de las placas a 570 nm utilizando el equipo NOVOstar (BMG LabTech).

4.5. Inmunomarcaje con Mitotracker™ Red CMXRos

El colorante liofilizado Mitotracker Red CMXRos (8-(4'-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15-octahidro-1 H,4 H,10 H,13 H-diquinolizino-8 H-xantilio cloruro) se preparó según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, EE.UU.). Se disolvió en DMSO a una concentración de 1 mM y se almacenó a -20°C hasta su uso. Las concentraciones de trabajo tanto para las neuronas hipocampales y las líneas celulares se estandarizaron previamente a 200 nM y 300 nM, respectivamente. Las células se trataron con soluciones de trabajo de CMXRos a las concentraciones mencionadas en medio de cultivo sin suplementar, a 37°C, durante veinte minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con medio sin suplementar, y las células se fijaron para su uso en ensayos de inmunofluorescencia.

4.6. Ensayos de Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares de 12 mm que fueron previamente esterilizadas en acetona, etanol al 70% y flameados, y tratados con poli-L-lisina durante 24 horas. Las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% preparado el mismo día, durante 20 minutos a temperatura de ambiente. Después se lavaron con PBS 1X, permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos, y se bloqueó la unión inespecífica con PBS-BSA al 5% durante una hora.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en la misma solución de bloqueo a una concentración de 1:500 para SVCT2-L33 (LS-C334917, LSBio), SVCT2-L10 (LS-C102064, LSBio), COXIV (ab-16056, Abcam) y MAP2 (188004, Synaptic Systems), y 1:250 para SVCT2-S19 (sc-9926, Santa Cruz Biotechnology) y TOM20 (sc-11415, Santa Cruz Biotechnology). Las células se incubaron con combinaciones de estos anticuerpos primarios contra SVCT2, marcadores mitocondriales (exceptuando las células tratadas con Mitotracker™ Red CMXRos) y MAP2 en el caso de las neuronas hipocámpales, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes a una concentración de 1:500 durante dos horas, a temperatura de ambiente y en oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron tres veces con PBS 1X y se montaron utilizando medio de montaje Fluoromount-G™, que contiene DAPI para el marcaje de los núcleos.

4.7. Microscopía confocal

Para la microscopía confocal, las muestras se observaron utilizando un equipo multifotón espectral de barrido láser LSM780 Zeiss, equipado con un microscopio invertido AxioObserver Z.1 y una matriz espectral de 34 canales con seis líneas de láser, de las cuales se ocuparon las de 488 nm, 594 nm y 633 nm. Cada muestra se examinó mediante cortes ópticos sucesivos de 0,2 μm , a lo largo del eje z (z-stack), utilizando el objetivo de inmersión Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27, en aceite de inmersión Immersol™ 518 F, cuyo índice de refracción (n) es 1,518 a 23°C. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital AxioCam, controlada por el software Zeiss ZEN, a una resolución de 7,5879 píxeles por micrón.

4.8. Ensayos de Western blot

Las placas de 10 cm^2 (CAD, ZR-75 y SHSY5Y) y de 6 pocillos (neuronas hipocámpales de ratón) se lavaron una vez con PBS1X estéril y frío. Posteriormente, las células se lisaron directamente en sus respectivas placas, empleando buffer RIPA 1X con el cóctel de inhibidor de proteasas 1X, manteniéndolas en hielo bajo agitación durante 30 minutos. La lisis celular se verificó mediante microscopía y, a continuación, las muestras se trataron con DNasa I de según el protocolo del fabricante para eliminar el ADN genómico.

La concentración de proteína en las muestras se determinó mediante el ensayo de proteína BCA usando un kit de Pierce™ (#23225). Luego, las proteínas se desnaturalizaron en buffer de carga 4X a 95°C durante 10 minutos. Se cargaron 50 μg de proteínas por carril en geles de acrilamida-SDS al 10% y se transfirieron

electroforéticamente a membranas de PVDF. Después de lavar con TBS/0.05% Tween 20 (TBST), se bloqueó la unión inespecífica incubando las membranas durante toda la noche en TBS-BSA al 5%.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en la misma solución de bloqueo a una concentración de 1:8000 para G β y 1:10000 para los anticuerpos SVCT2 y GAPDH. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C bajo agitación, se lavaron 4 veces durante 5 minutos con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en la solución de bloqueo a una concentración de 1:5000 durante toda la noche, también a 4°C bajo agitación. Las membranas se lavaron 5 veces con TBST y una vez con TBS, y las bandas inmunorreactivas se escanearon con el Sistema de Imagen de Fluorescencia ODYSSEY® (LiCOR).

4.9. Ensayos de Inmunohistoquímica en tejidos cerebrales

En el primer día, las muestras de tejido se desparafinaron e hidrataron sumergiéndolas en xileno tres veces durante 5 minutos cada una, seguidas de una serie descendente de etanol (100%, 96%, 70%, 50%) durante 1 minuto cada una. Una vez desparafinadas, se realizó una recuperación antigénica tratando las muestras con ácido fórmico al 90% durante 5 minutos y lavándolas en agua corriente durante 10 minutos. Posteriormente, se inhibieron las peroxidasas tratando las muestras con una solución de H₂O₂ al 3% y metanol al 20% en TBS 0.25M durante 5 minutos, seguido de dos lavados en TBS 0.25M durante 5 minutos cada uno.

A continuación, las muestras se incubaron durante 5 minutos en una solución de TBS 0.25M-Tritón X-100 al 0.2% para facilitar la penetración del anticuerpo, y se lavaron dos veces durante 5 minutos en TBS 0,25 M. Luego, se bloquearon las uniones

inespecíficas usando una solución de TBS 0,25 M con GS al 3% durante una hora. Finalmente, se eliminó cuidadosamente el exceso de líquido de las muestras, se les aplicó 200 μ L de anticuerpo primario diluido 1:200 en una solución de TBS 0,25 M y 1% de suero, y se dejaron incubando toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.

Al día siguiente, se eliminó el exceso de anticuerpo primario lavando las muestras en TBS 0.25 M tres veces durante 5 minutos cada una. El anticuerpo secundario de cabra biotinilado se diluyó 1:250 en TBS 0.25 M y se aplicó a las muestras, dejándolas incubar durante 45 minutos, seguido de tres lavados en TBS 0.25M. Las secciones se trataron posteriormente durante una hora con el complejo avidina/biotina (ABC), preparado 30 minutos antes, utilizando un kit ABC Vectastain Elite®. Tras la incubación, se realizaron tres lavados durante 5 minutos con TBS 0,25M, seguidos de un lavado de 5 minutos con TB 0.25 M. Finalmente, las muestras se incubaron en una solución de DAB (0,5 mg/mL), TB 0.25 M y H₂O₂ 0,8 mM. Una vez que se observó el marcaje, se detuvo la reacción sumergiendo las muestras en TB 0,25 M y lavándolas tres veces durante 5 minutos en TBS 0,25 M.

Se realizó una contratinción incubando las muestras en hematoxilina durante 5 a 10 minutos. Cuando se alcanzó el marcaje adecuado, las muestras se lavaron con agua corriente. Luego, se deshidrataron invirtiendo los pasos descritos en la desparafinización/hidratación, y se montaron con medio de montaje CytoSeal™.

4.10. Análisis de imágenes

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software ImageJ (v1.54j).

Para el caso de los ensayos de inmunofluorescencia, primero se sustrajo el fondo de las imágenes. A continuación, se aplicó el algoritmo de Otsu para definir el umbral de las señales y segmentar las regiones de interés ^[179]. Posteriormente, se cuantificó la densidad integrada de fluorescencia, y la eficiencia de colocación se calculó empleando el complemento actualizado JACoP BIOP ^[180,181]. Finalmente, se realizaron pruebas de randomización de las imágenes para validar la significancia de las colocaciones observadas. Estas pruebas incluyeron 1000 aleatorizaciones con un tamaño de bloque de 2 píxeles por muestra, generando una distribución de coeficientes de Pearson bajo condiciones de colocación aleatoria. El coeficiente de Pearson observado se comparó con esta distribución aleatoria para determinar si la colocación observada era estadísticamente significativa y no producto del azar.

Para cuantificar las bandas de Western blot, las imágenes se importaron al programa, se convirtieron a formato 8-bits y se les sustrajo el fondo. Luego, se seleccionaron las filas de bandas utilizando la herramienta de selección de rectángulo, manteniendo una región de interés constante a lo largo del experimento. A continuación, se generaron los perfiles de intensidad, se integraron para obtener el área bajo la curva y se normalizaron contra sus respectivos controles de carga (G β o GAPDH)

4.11. Análisis estadísticos

Los resultados se presentaron como promedio \pm error estándar. Antes de realizar los ANOVA uni o bidireccionales, dependiendo del caso, se efectuó una prueba de

normalidad usando el método Shapiro-Wilk. Para los datos que no siguieron una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis en lugar de ANOVA. Los análisis estadísticos se realizaron con el software R, mientras que los gráficos se generaron con GraphPad Prism.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de un nuevo anticuerpo anti-SVCT2 en modelos celulares de cáncer y enfermedad de Alzheimer

5.1.1. Expresión de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón utilizando un anticuerpo estandarizado en líneas celulares humanas y tejido humano (S19)

La identificación y caracterización funcional de un transportador SVCT2 mitocondrial cuya expresión está incrementada en células tumorales en comparación con las células normales y está asociada a estrés oxidativo, nos llevó a investigar si otras patologías asociadas a este fenómeno podrían presentar alteraciones en el transporte de vitamina C, ya sea a nivel mitocondrial o en otros organelos. Esto es especialmente relevante en enfermedades neurodegenerativas como la EA, donde el consumo de vitamina C como método preventivo ha sido motivo de debate y controversia ^[182-187].

Estudios recientes sobre diferenciación neuronal y el reciclaje de vitamina C han indicado que SVCT2 se localiza principalmente en la membrana plasmática y el retículo endoplasmático (RER) en las neuronas. Sin embargo, las imágenes de inmunocitoquímica revelan ciertos patrones de marcaje que sugieren la posible localización de SVCT2 en las mitocondrias ^[188]. Aunque este hallazgo no fue explorado en detalle por los autores, este plantea a un rol que SVCT2 podría estar desempeñando en las mitocondrias, que merece mayor estudio. En el caso de la enfermedad de Huntington, un estudio ha descrito que una alteración en el tráfico intracelular de SVCT2 contribuye al desequilibrio redox, con el transportador localizado lejos de la membrana plasmática ^[189]. Al igual que los estudios mencionados anteriormente, ciertos patrones punteados observados en las imágenes

podrían sugerir la presencia de SVCT2 en las mitocondrias neuronales, aunque este aspecto no fue abordado directamente. Estos hallazgos refuerzan la idea de que SVCT2 podría cumplir una función mitocondrial aún no reconocido en las neuronas.

Por otro lado, la presencia de SVCT2 en la membrana mitocondrial interna ha sido confirmada en otros contextos [173,176,177], lo que plantea la pregunta sobre su comportamiento en neuronas, específicamente modelos *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Para abordar esta interrogante, se trataron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón a los 11 DIV con concentraciones crecientes de A β Os (0,25 μ M; 0,5 μ M; y 1 μ M) durante 24 horas y posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Sin embargo, esta investigación reveló que el anticuerpo anti-SVCT2 estandarizado en humanos (S19) no mostró marcaje detectable en las neuronas de ratón (**Fig.10**).

Con el fin de esclarecer si la ausencia de marcaje se debía a la ausencia de SVCT2 en células de ratón, se evaluaron dos nuevos anticuerpos anti-SVCT2, L33 y L10, para detectar la expresión y localización de SVCT2 tanto en muestras murinas como humanas. Estos anticuerpos, dirigidos contra la región N-terminal de SVCT2, se probaron en líneas celulares de cáncer humanas como control positivo para SVCT2, debido a que han demostrado de forma consistente la expresión de la forma mitocondrial de esta proteína en investigaciones previas. Además, se probó el nuevo anticuerpo L33 en la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y para detectar posibles cambios en la expresión y ubicación de SVCT2 en células tipo neuronales humanas. Cabe destacar que la expresión de SVCT2 en esta línea en particular no correspondería exclusivamente a un modelo neuronal, debido a su origen tumoral.

Esta estrategia permitió realizar una completa caracterización de la expresión de SVCT2 y una comparación de su distribución en distintos contextos celulares.

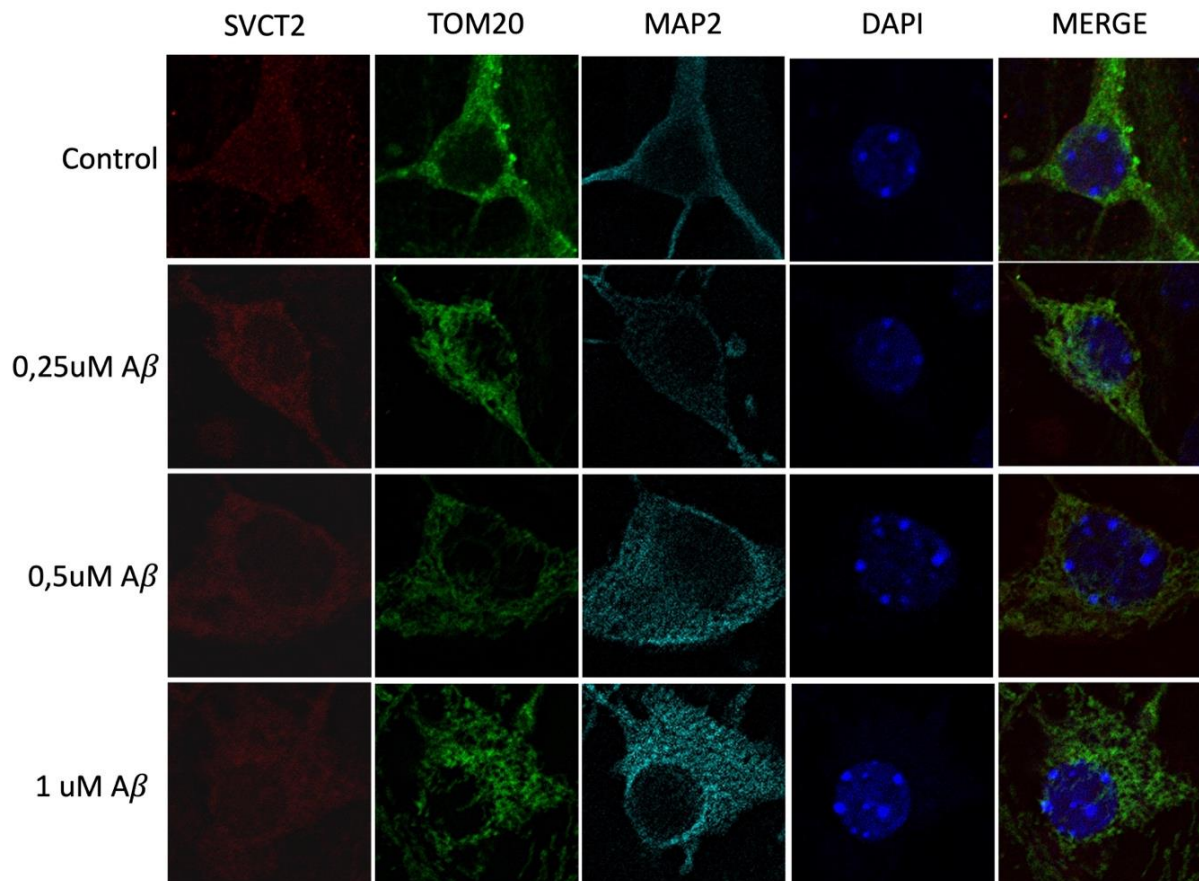


Figura 10: Evaluación de la inmunofluorescencia de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón tratadas con AβOs. Las imágenes representan el ensayo de inmunocitoquímica realizado en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratones a 11 días de división in vitro, utilizando anticuerpos previamente estandarizados para SVCT2 y TOM20. Los paneles muestran el marcaje con SVCT2 (rojo), TOM20 (verde), MAP2 (cian) y DAPI para la tinción de núcleos (azul). Las neuronas fueron tratadas con concentraciones crecientes de AβOs durante 24 horas. La evaluación revela un marcaje ineficaz del transportador SVCT2 en las neuronas hipocampales, indicando la falta de reactividad cruzada de los anticuerpos diseñados para especímenes humanos en muestras de ratón

5.1.2. Caracterización de anticuerpos anti-SVCT2 L33 y L10 en neuronas hipocampales y células CAD

Con el objetivo de caracterizar los nuevos anticuerpos, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en neuronas hipocampales de ratón y en células CAD diferenciadas usando los anticuerpos anti-SVCT2 L33 y L10. Además, se realizó una comparación en relación con el anticuerpo previamente utilizado en líneas celulares humanas, SVCT2 S19, para establecer cuál de los anticuerpos es el más adecuado para estudios posteriores.

En las células CAD diferenciadas, el anticuerpo anti-SVCT2 S19 pierde su patrón de marcaje acotado al anillo mitocondrial y muestra una señal menos intensa, requiriendo ajustes adicionales para su visualización. Por otro lado, los anticuerpos L33 y L10 presentan un marcaje más intenso, pero también disperso. Es particularmente notable que el anticuerpo L10 muestra un marcaje en el núcleo de las células, algo que no se observa en las neuronas hipocampales, donde presenta un patrón de marcaje exclusivamente citoplasmático. En las neuronas hipocampales, los tres anticuerpos muestran una localización similar, aunque la señal del S19 sigue siendo menos intensa que la de L33 y L10, con distribución de SVCT2 en el soma y los procesos neuríticos (**Fig. 11**).

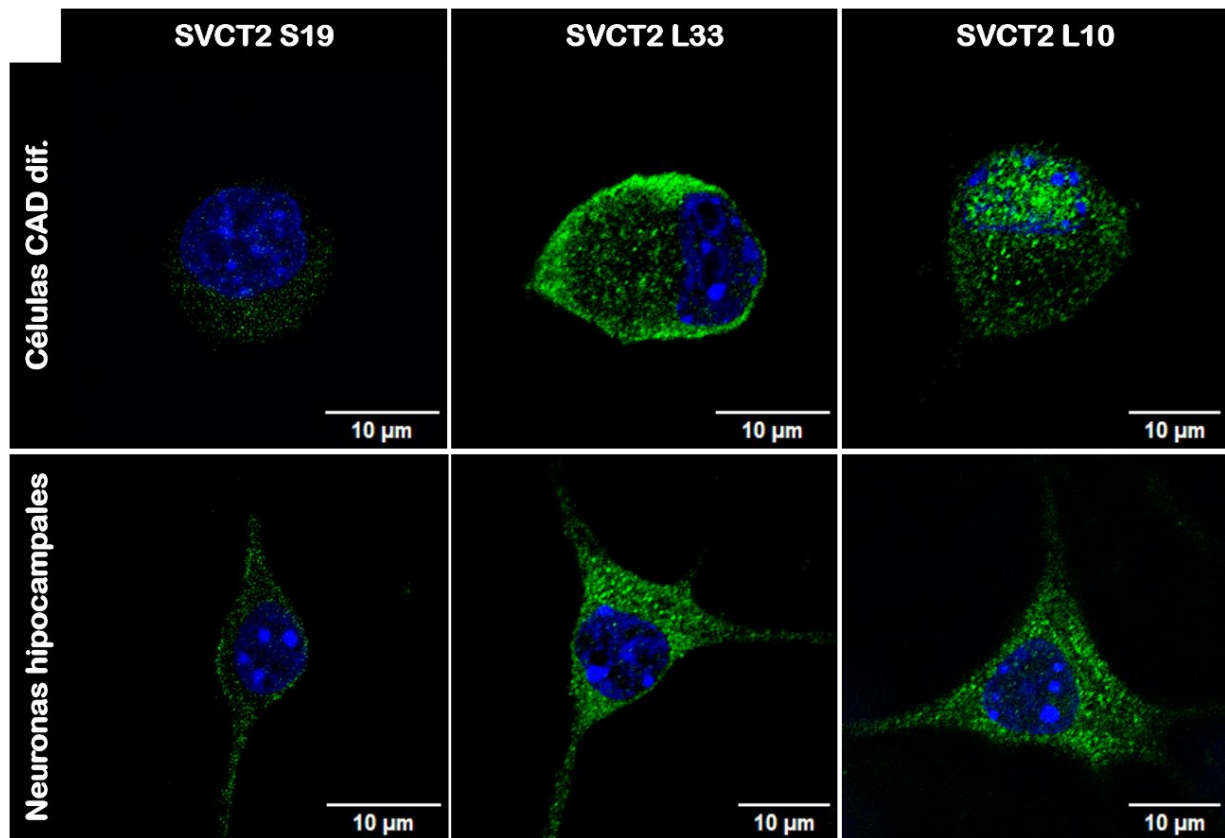


Figura 11: Localización del transportador SVCT2 en células CAD diferenciadas y neuronas hipocampales de ratón. Las células CAD diferenciadas (fila superior) y las neuronas hipocampales (fila inferior) fueron marcadas con los anticuerpos anti-SVCT2 S19, L33 y L10, todos en el canal verde. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI en el canal azul

5.1.3. Caracterización del anticuerpo anti-SVCT2 L33 en células ZR-75 y SH-SY5Y utilizando distintos marcadores mitocondriales

Debido al marcaje nuclear observado con el anticuerpo anti-SVCT2 L10, se decidió no continuar su uso y concentrar las pruebas en el anticuerpo anti-SVCT2 L33. Con el propósito de realizar un análisis comparativo con respecto a lo reportado para el anticuerpo previamente utilizado, anti-SVCT2 S19, se realizaron inmunotinciones y ensayos de colocalización en líneas celulares humanas. Se seleccionó la línea celular de cáncer ZR-75 como control positivo, debido a su expresión consistente de SVCT2 demostrada en estudios previos, y se evaluó la colocalización en las mitocondrias empleando distintos marcadores mitocondriales con el fin de encontrar el marcador más adecuado para evaluar la colocalización de SVCT2. Se utilizaron los anticuerpos anti-COXIV y anti-TOM20 por su alta especificidad hacia componentes mitocondriales clave. Además, se incluyó la sonda mitocondrial MitoTracker™ Red CMXRos, que proporciona una visualización directa y confiable de las mitocondrias debido a su afinidad química específica. Esta estrategia permitió analizar y comparar la detección de SVCT2 mitocondrial, garantizando la selección del marcador que ofreciera la señal más robusta en los ensayos de inmunocitoquímica.

Tal como se había descrito previamente, el anticuerpo S19 demostró una alta capacidad de reconocer SVCT2 mitocondrial en células ZR-75, con una colocalización consistente con los marcadores mitocondriales COXIV, TOM20 y CMXRos (**Fig. 12**). Su patrón de marcaje se limitó principalmente a las regiones del anillo mitocondrial, con valores elevados de coeficiente de correlación de Pearson, especialmente en combinación con TOM20 (PCC \approx 0.87). En contraste, el anticuerpo L33 mostró una colocalización menor con los mismos marcadores mitocondriales, con valores de

Pearson que oscilaron entre 0.2 y 0.5 en combinación con la sonda mitocondrial CMXRos, y un patrón de marcaje más amplio y disperso. Estos resultados sugieren que, mientras que S19 es más específico para la localización mitocondrial, L33 podría estar reconociendo SVCT2 en otras regiones celulares, lo que refleja diferencias en la distribución subcelular de los epítopes reconocidos por ambos anticuerpos. Esto fue posteriormente corroborado mediante Western blot en las mismas células, en donde S19 y L33 mostraron distinta especificidad. Mientras que S19 reconoce una sola banda de un tamaño menor a 35 kDa, el anticuerpo L33 reconoce una banda predominante de 55 kDa.

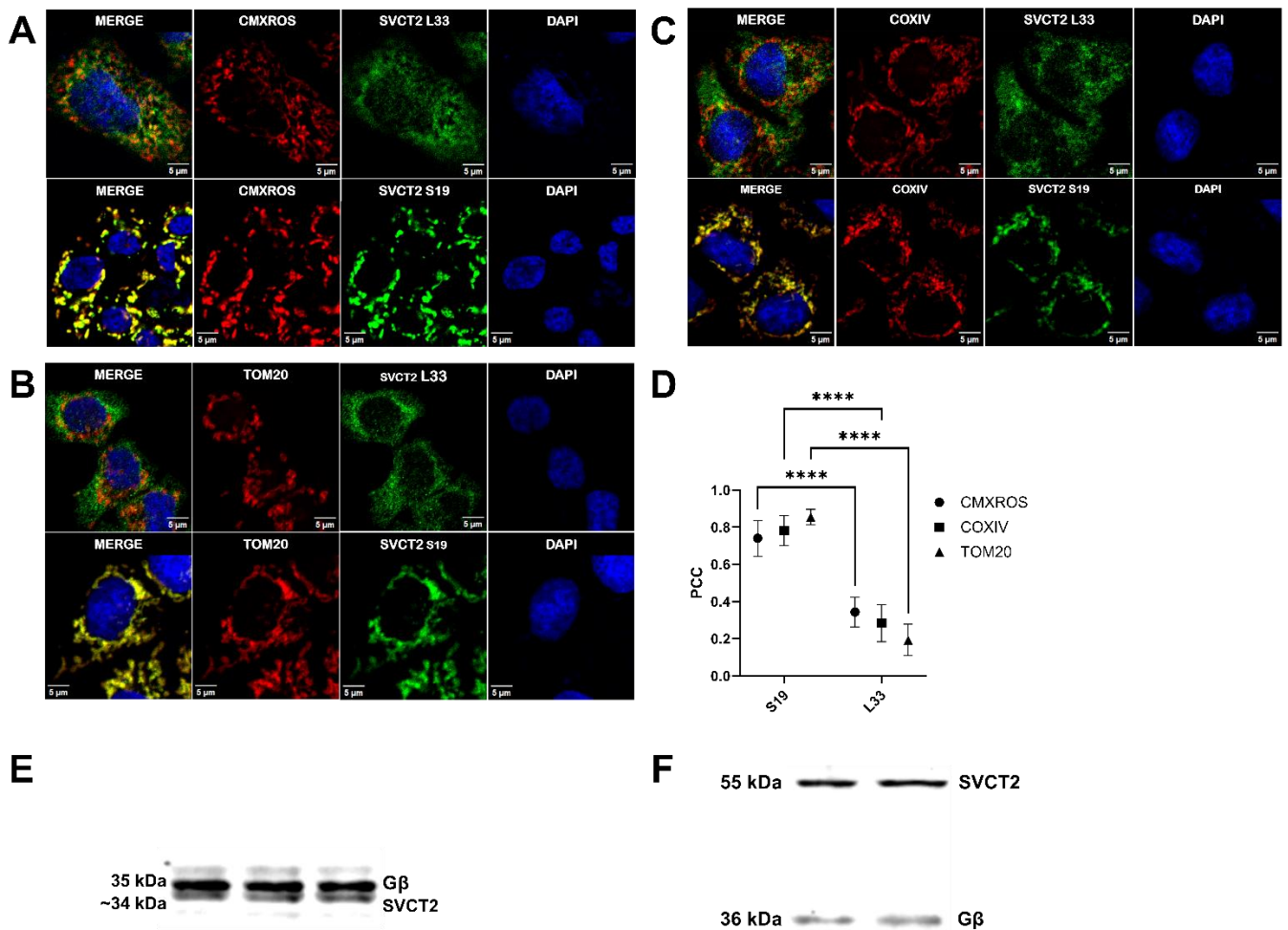


Figura 12: Caracterización del nuevo anticuerpo SVCT2 L33 en células ZR-75. Los ensayos de inmunofluorescencia muestran la colocalización de ambos anticuerpos anti-SVCT2 en el canal verde, con distintos marcadores mitocondriales en el canal rojo. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI en el canal azul. En las imágenes combinadas (MERGE), las regiones de colocalización aparecen en amarillo. Las imágenes revelaron la mayor especificidad y localización mitocondrial del anticuerpo anti-SVCT2 S19 en comparación con la distribución intracelular más amplia y dispersa de anti-SVCT2 L33. A. Colocalización de anticuerpos anti-SVCT2 L33 y S19 con la sonda mitocondrial MitoTracker™ Red CMXRos. B. Colocalización de anticuerpos anti-SVCT2 L33 y S19 con el marcador TOM20. C. Colocalización de los anticuerpos anti-SVCT2 L33 y S19 con el marcador COXIV. D. Análisis de los valores de coeficiente de correlación de Pearson (PCC ± SD). (CMXRos: S19: 0.7±0.01; L33: 0.3±0.02. TOM20: S19: 0.9±0.007; L33: 0.2±0.02. COXIV: S19: 0.8±0.02; L33: 0.3±0.03) (n=3; N=90); ****p<0.0001 comparando anticuerpos anti-SVCT2 S19 y L33 entre sí. E. Ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 S19 donde se usó el anticuerpo anti-Gβ como control de carga. F. Ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 L33 donde se usó el anticuerpo anti-Gβ como control de carga

5.1.4. Detección de SVCT2 en células SH-SY5Y expuestas a concentraciones crecientes de A β Os, utilizando los anticuerpos S19 y L33

Por último, se incluyó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y para evaluar el rendimiento de los anticuerpos anti-SVCT2 S19 y L33 en líneas neuronales humanas, algo que es particularmente relevante dado el enfoque neurobiológico de esta investigación. En este experimento, se compararon las colocalizaciones obtenidas con ambos anticuerpos para verificar si ambos reconocen SVCT2 bajo condiciones experimentos idénticas. Además, las células SH-SY5Y fueron expuestas a un gradiente de concentraciones de A β Os durante 24 horas, con el fin de evaluar si ambos anticuerpos responden de manera consistente o diferencial en presencia de estos.

Los resultados mostraron que ambos anticuerpos, anti-SVCT2 L33 y S19, colocalizan con valores de coeficiente de correlación de Pearson (PCC) superiores a 0,5 en todas las condiciones experimentales, lo que sugiere que ambos anticuerpos reconocen SVCT2 de manera consistente. Los coeficientes de Mander bajo umbral también reflejan una superposición importante: la fracción de señal en el canal rojo (L33) que colocaliza con la señal en el canal verde (S19) fue superior a 0.6 en todas las condiciones (FIG D), al igual que la fracción de señal en el canal verde que colocaliza con el canal rojo (FIG E). Esto indica una superposición recíproca y consistente entre ambos anticuerpos, independiente de la presencia de A β Os. Sin embargo, debido a la limitación en el número de mediciones, no fue posible aplicar un análisis estadístico robusto a estos datos. Para abordar esta limitación, se realizaron 2000 randomizaciones con un tamaño de bloque de 3 píxeles (FIG B), y los gráficos de randomización revelaron que, en todas las condiciones experimentales, el coeficiente

de correlación de Pearson observado se encuentra separado de la distribución aleatoria centrada en cero. Estos resultados sugieren que la colocalización entre los anticuerpos es significativamente mayor de lo que se esperaría por azar, confirmando que los valores obtenidos no son producto de una correlación aleatoria y ofreciendo un nivel de validación a las observaciones realizadas.

Es importante señalar que, si bien estas células no exhibieron cambios en los niveles de colocalización entre los anticuerpos S19 y L33 en presencia de A β Os, los niveles de intensidad de SVCT2 para cada uno de los anticuerpos si mostraron variaciones en los distintos tratamientos, aunque debido a la limitación en el número de mediciones, no fue posible realizar análisis estadísticos.

Los análisis de Western blot en esta línea con el anticuerpo L33 nos permitió detectar las tres formas descritas para SVCT2; una banda de 100 kDa que correspondería a la forma *full length*, una banda de 55 kDa que correspondería a la forma corta, y, por último, una forma de 30 kDa que correspondería a la forma mitocondrial. Ninguna de estas formas de SVCT2 presentó variaciones en respuestas a A β Os (FIG).

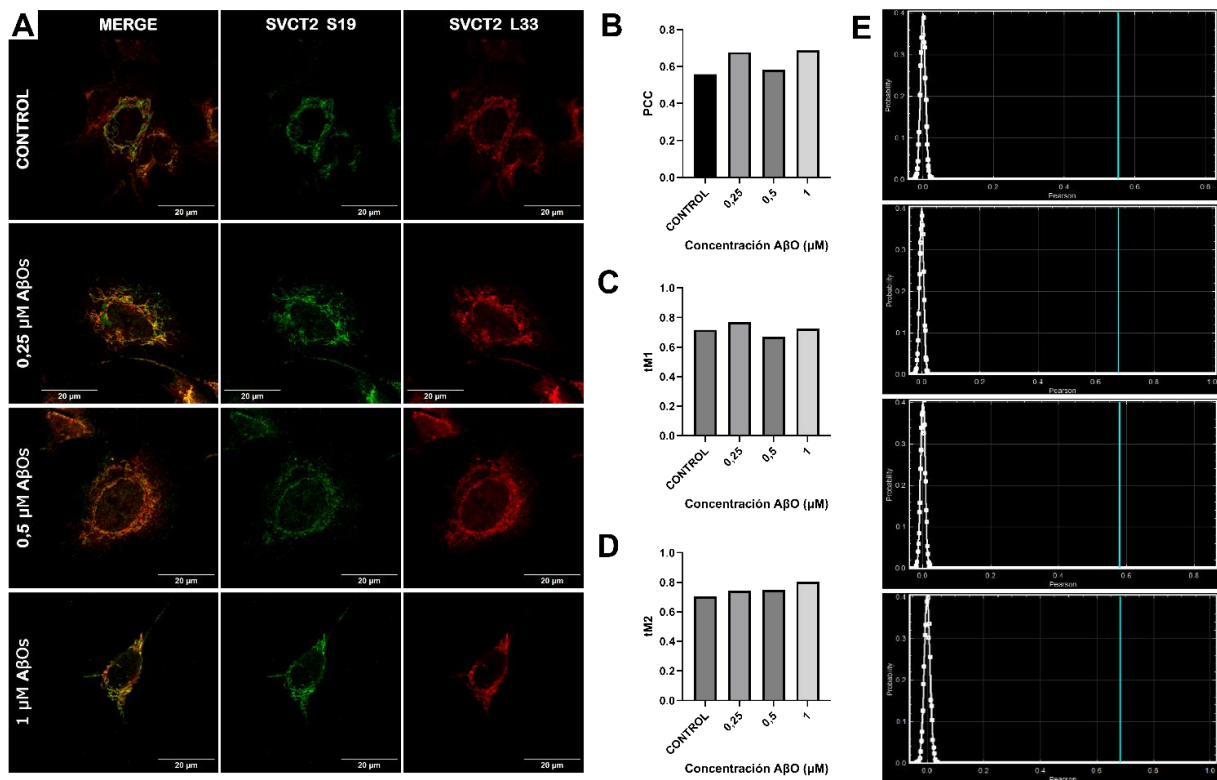


Figura 13: Localización de SVCT2 en células SH-SY5Y tratadas con AβOs. **A.** Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica utilizando conjuntamente los anticuerpos anti-SVCT2 S19 en verde, y anti-SVCT2 L33 en rojo. **B.** Coeficiente de correlación de Pearson (PCC). **C.** Coeficiente de superposición de Mander bajo umbral (tM1) que representa la fracción de señal en el canal rojo que colocaliza con la señal del canal verde. **D.** Coeficiente de superposición de Mander bajo umbral (tM2) que representa la fracción de señal en el canal verde que colocaliza con la señal en el canal rojo. **E.** Pruebas de randomización para el coeficiente correlación de Pearson (PCC) para cada condición experimental. En cada gráfico, la distribución de los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos a partir de 2000 randomización, representados en la gráfica como la curva de probabilidad, está centrada en cero. Las líneas turquesas indican los coeficientes observados en los datos originales no aleatorizados.

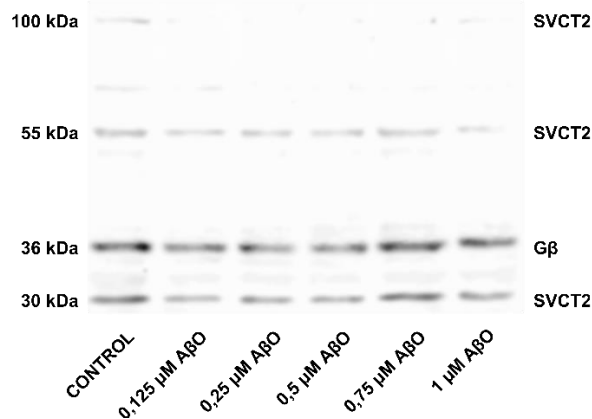


Figura 14: Análisis de Western blot evaluando la especificidad del anticuerpo anti-SVCT2 L33 y la expresión de SVCT2 en células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de AβOs. El anticuerpo anti-SVCT2 revela la presencia de bandas correspondientes a las isoformas de SVCT2 de 100 kDa, 55 kDa y 30 kDa, que son independientes a las concentraciones de AβOs. Se utilizó Gβ como control de carga.

5.2. Estudio de la localización de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón expuestas a oligómeros solubles del péptido A β 40

5.2.1. Efecto de A β ₄₀O sobre la viabilidad celular

Se evaluaron los cambios en la viabilidad celular tras la exposición a A β ₄₀O utilizando la técnica de MTT. Para esto, se utilizó un medio sin tratamiento como control negativo y FCCP como control positivo de toxicidad celular. Las células CAD se cultivaron con distintas concentraciones de A β O (0,125 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 0,75 μ M y 1 μ M). Se demostró que concentraciones superiores a 0,250 μ M disminuyen significativamente la viabilidad celular después de 24 horas de exposición (**Fig. 15**), indicando que las concentraciones de A β O desde los 0,5 μ M son tóxicas para las células CAD.

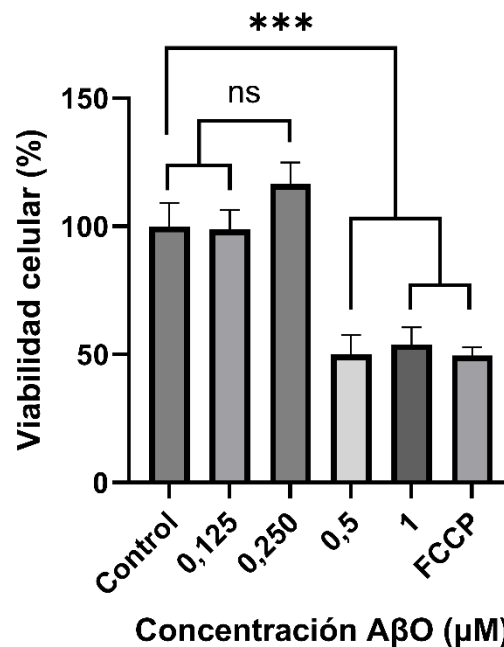


Figura 15: Análisis del efecto citotóxico de A β O sobre células CAD. Viabilidad celular de células CAD diferenciadas tratadas con diferentes concentraciones de A β O durante 24 horas a 37°. Se utilizó FCCP como control positivo de toxicidad celular. Los valores son expresados como porcentaje del control sin tratamiento \pm SEM (Control: 100 \pm 9%; 0,125 μ M: 99 \pm 8%; 0,25 μ M: 117 \pm 8%; 0,5 μ M: 50 \pm 8%; 0,75 μ M: 53 \pm 7%; 1 μ M: 50 \pm 3%) (n=2; N=12). ns= no significativo; ***p<0.001 versus control.

5.2.2. Análisis de colocalización de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón expuestas a un gradiente de AβOs utilizando el anticuerpo L33

Para analizar en detalle la localización subcelular específica de SVCT2 en neuronas hipocampales de ratón, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo L33, la sonda mitocondrial CMXRos como marcador mitocondrial, y un anticuerpo anti-MAP2 como marcador neuronal. Adicionalmente, las neuronas se trataron con concentraciones crecientes de AβOs (0,5 μM y 1 μM) para evaluar si la expresión de SVCT2 se veía afectada por la presencia de estos. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal revelaron una expresión intracelular de SVCT2 en las neuronas. Sin embargo, no se obtuvieron índices de colocalización importantes de SVCT2 con las mitocondrias (**Fig. 16**). Es más, el análisis de Pearson en las neuronas control sugiere incluso una anticorrelación débil con valores de PCC negativos, indicando que la localización de SVCT2 no está asociada a las mitocondrias en las neuronas hipocampales de ratón en un estado control. Sin embargo, es interesante notar que, al ser tratadas con 0,5 μM de AβOs durante 24 horas, el análisis de los coeficientes de Pearson y Mander reveló una diferencia significativa en la colocalización en comparación a las neuronas controles, lo que podría estar indicando un cambio en la distribución subcelular de SVCT2. En el caso del coeficiente de Pearson, este varió desde un valor negativo en el control hasta $0,30 \pm 0,12$ en las neuronas tratadas con 0,5 μM de AβOs. Este comportamiento está corroborado, además, por el análisis del coeficiente de superposición de Mander.

Exceptuando el tratamiento con 0,5 μM de AβOs, los resultados obtenidos en los ensayos de inmunocitoquímica y el análisis de colocalización mediante la randomización de Costes revelan una ausencia significativa de colocalización entre

SVCT2 y la sonda mitocondrial. A pesar de la presencia intracelular de SVCT2, los coeficientes de Pearson negativos junto con los p-valores bajos, sugieren que la distribución de SVCT2 no coincide con las mitocondrias. Esto se ve respaldado por la drástica reducción en los coeficientes de Mander tras la aplicación de umbrales, lo que indica que la colocalización observada inicialmente podría haberse debido al ruido o a señales no específicas. Con respecto a la intensidad de la señal de SVCT2 en respuesta a A β Os, esta presentó un comportamiento similar, aunque los análisis estadísticos demostraron que no era significativo.

La observación de una ligera anticorrelación sugiere que SVCT2 podría estar excluido de las estructuras mitocondriales en condiciones normales y es un hallazgo que destaca la importancia de considerar la distribución subcelular específica de SVCT2 en estudios futuros, así como la necesidad de explorar otros posibles compartimentos subcelulares donde SVCT2 podría desempeñar sus funciones en las neuronas hipocámpales de ratón. En resumen, los resultados proporcionan evidencia de que la localización subcelular de SVCT2 en neuronas hipocámpales de ratón no está asociada con las mitocondrias, lo que sugiere una distribución distinta que merece una investigación más detallada.

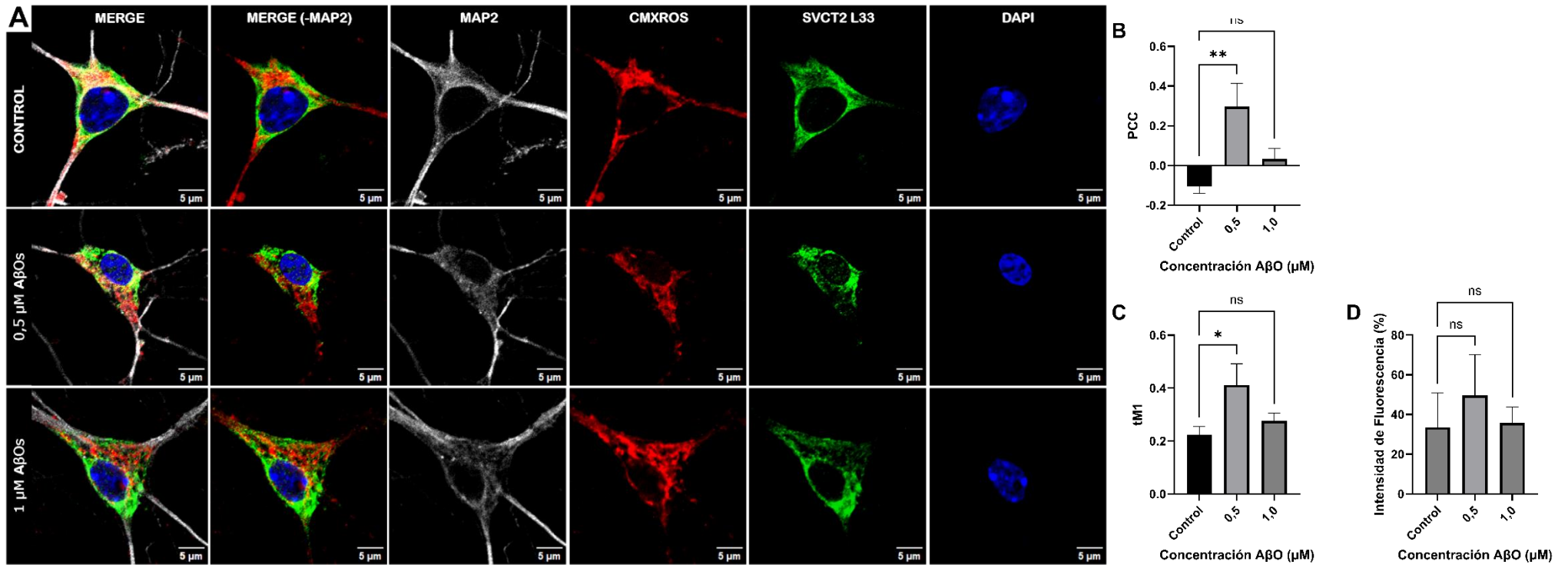


Figura 16: Localización de subcelular de SVCT2 y análisis de colocalización de Pearson y Mander entre el transportador SVCT2 y el marcador mitocondrial en neuronas hipocampales de ratón tratadas con AβOs. **A.** Las neuronas hipocampales de 11 DIV se trataron con concentraciones crecientes de AβOs durante 24 horas, luego se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de cuatro marcajes utilizando conjuntamente los anticuerpos anti-SVCT2 L33 en verde, anti-MAP2 como marcador neuronal en gris, la sonda mitocondrial Mitotracker™ Red CMXRos en rojo, y DAPI como marcador nuclear en azul. Posteriormente, se realizó el análisis de colocalización entre SVCT2 y CMXRos a partir de las imágenes obtenidas en los ensayos de inmunofluorescencia. **B.** Análisis del coeficiente de correlación de Pearson (PCC) (Control: -0.11 ± 0.04 ; 0,5 μM: 0.30 ± 0.12 ; 1 μM: 0.03 ± 0.05) (n=2; N=18). ns= no significativo; **p<0.01 versus control. **C.** Análisis del coeficiente de superposición de Mander con umbral (tM1) (Control: 0.22 ± 0.03 ; 0,5 μM: 0.41 ± 0.08 ; 1 μM: 0.28 ± 0.02) (n=2; N=18). ns= no significativo; *p<0.05 versus control. **D.** Intensidad de fluorescencia de SVCT2, con los valores normalizados y expresados como porcentaje. (Control: $33 \pm 17\%$; 0,5 μM: $50 \pm 20\%$; 1 μM: $36 \pm 7\%$) (n=321; N=18). ns= no significativo

5.2.3. Análisis de la expresión de SVCT2 en proteínas totales de neuronas hipocampales de ratón

Se analizó la expresión del transportador mediante ensayos de Western blot, los que revelaron la presencia de una banda predominante para SVCT2 de alrededor de 55 kDa de tamaño, la que está asociada a la variante corta. Se evaluó la expresión de la proteína G β como control interno, mostrando una robusta expresión en las tres condiciones (**Fig. 17**). El análisis de la intensidad de la banda de 55 kDa mostró una tendencia hacia un aumento en la expresión de SVCT2 con concentraciones crecientes de A β O, siendo estadísticamente significativa entre las neuronas control y las tratadas con 1 μ M de A β O. Es importante señalar que en este tipo de análisis no es posible diferenciar el aporte de las células gliales, que están presentes en los cultivos primarios de neuronas, al fenómeno descrito aquí.

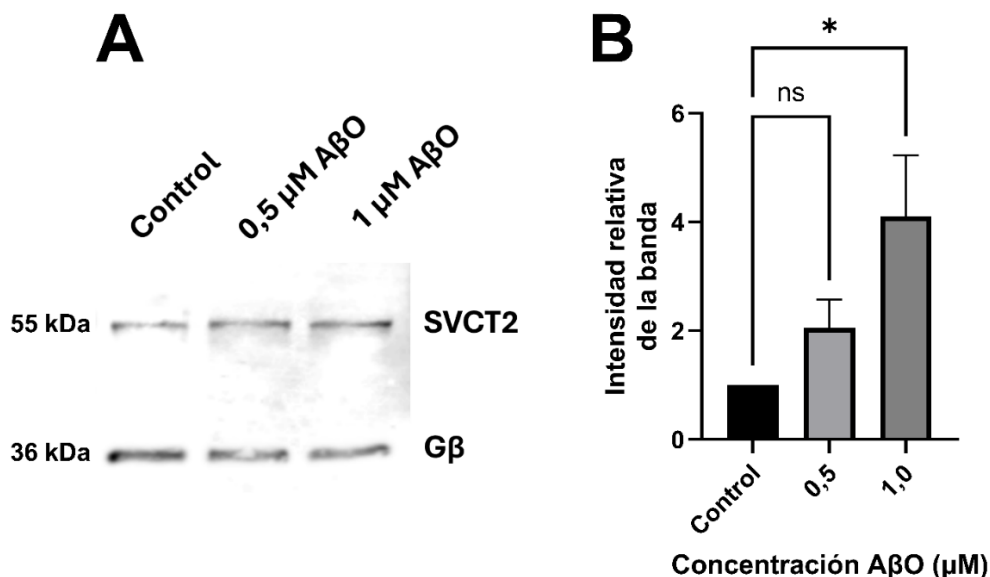


Figura 17: Expresión del transportador SVCT2 en proteínas totales extraídas de neuronas hipocampales de ratón tratadas con A β O. Se realizó la lisis celular al cabo de 24 horas de tratamiento con A β O y las muestras se procesaron previo a los ensayos de Western blot. **A.** Análisis por Western blot de la expresión de SVCT2 en proteínas totales extraídas de neuronas hipocampales de ratón, que se ensayaron utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 L33 y un anticuerpo anti-G β como control de carga. **B.** Se cuantificó la densidad de las bandas de SVCT2, normalizando con el control G β . (n=3; N=6) (Control: 1 \pm 0; 0,5 μ M: 2.1 \pm 0.5; 1 μ M: 4.1 \pm 1.1) (n=2; N=18). ns= no significativo; *p<0.05 versus control

5.3. Localización de SVCT2 en la línea celular CAD diferenciada expuesta a concentraciones crecientes de A β O s

5.3.1. Análisis de colocalización de SVCT2 en células CAD diferenciadas expuestas a un gradiente de A β O s utilizando el anticuerpo L33

Para complementar los estudios en neuronas hipocampales de ratón y evaluar la localización subcelular de SVCT2, se realizaron los mismos ensayos de inmunofluorescencia en células CAD, ya que las líneas celulares ofrecen un entorno experimental más controlado y uniforme en comparación con los cultivos primarios, permitiendo obtener resultados más reproducibles. Se cultivaron y trataron las células CAD con concentraciones crecientes de A β O s (0,5 μ M y 1 μ M) durante 24 horas para evaluar si la expresión de SVCT2 se veía afectada por los A β O s (**Fig. 18**).

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron utilizando el mismo anticuerpo L33 y marcador mitocondrial, MitoTracker™ Red CMXRos, que en las neuronas hipocampales. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal para analizar la colocalización de SVCT2 con las mitocondrias mediante los coeficientes de correlación de Pearson y de Mander. A diferencia de las neuronas hipocampales, las células CAD no mostraron cambios significativos en la colocalización de SVCT2 con las mitocondrias tras el tratamiento con diferentes concentraciones de oligómeros de A β . Además, no se observó anticorrelación en las células CAD. Los valores de los coeficientes de Pearson y Mander se mantuvieron bajos (**Fig 18. B y C**), indicando que, aunque SVCT2 está presente intracelularmente, no existe una colocalización significativa con las mitocondrias. Esto sugiere que la localización de SVCT2 no está predominantemente asociada a las mitocondrias en las condiciones experimentales utilizadas en la línea celular CAD.

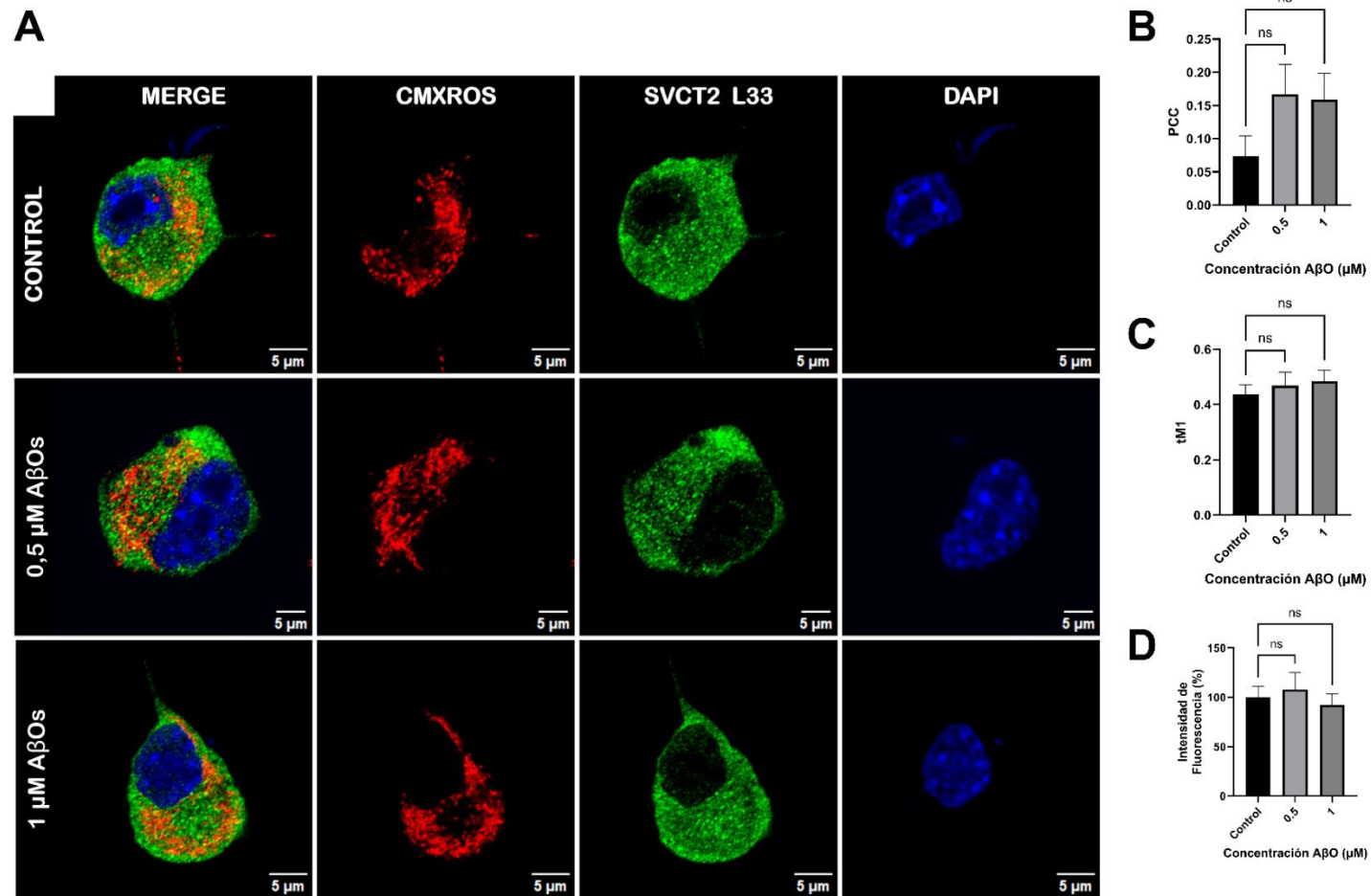


Figura 18: Localización de SVCT2 y análisis de colocalización en células CAD diferenciadas tratadas con AβOs. **A.** Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de triple marcaje al cabo de 24 horas de tratamiento con AβOs, utilizando conjuntamente el anticuerpo anti-SVCT2 L33 (canal verde) y la sonda mitocondrial MitoTracker™ Red CMXRos como marcador mitocondrial (canal rojo). Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI (canal azul). **B.** Análisis del coeficiente de correlación de Pearson (PCC) (Control: 0.07 ± 0.03 ; 0,5 μM: 0.17 ± 0.04 ; 1 μM: 0.16 ± 0.08) (n=3; N=27). ns= no significativo. **C.** Análisis del coeficiente de superposición de Mander con umbral del canal verde (tM1) (Control: 0.44 ± 0.03 ; 0,5 μM: 0.47 ± 0.05 ; 1 μM: 0.48 ± 0.04) (n=3; N=27). ns= no significativo. **D.** Intensidad de fluorescencia de SVCT2, con los valores normalizados y expresados como porcentaje. (Control: $33 \pm 5\%$; 0,5 μM: $40 \pm 7\%$; 1 μM: $48 \pm 6\%$) (n=3; N=27). ns= no significativo

5.3.2. Análisis de la expresión de SVCT2 en proteínas totales de células CAD diferenciadas

Al igual que con las neuronas hipocámpales, se analizó la expresión del transportador SVCT2 en las proteínas totales de las células CAD. Como control interno, se analizó la expresión de la proteína GAPDH. Interesantemente, los ensayos de Western blot mostraron la presencia de tres banda inmunorreactivas importantes para SVCT2, de 100 kDa, 55 kDa y 30-40 kDa de tamaño. La banda de 30 kDa se expresó con mayor intensidad que la de 55 kDa. Aunque la banda de 100 kDa, que corresponde a la forma *full length* de SVCT2, también se expresó, no se analizó en detalle. Al igual que lo observado en los ensayos de inmunocitoquímica, la intensidad de las bandas de 55 y 30-40 kDa no se vio afectada de manera significativa frente al tratamiento con concentraciones crecientes de A β O durante 24 horas, lo que sugiere que la expresión de SVCT2 se mantiene estable bajo estas condiciones experimentales.

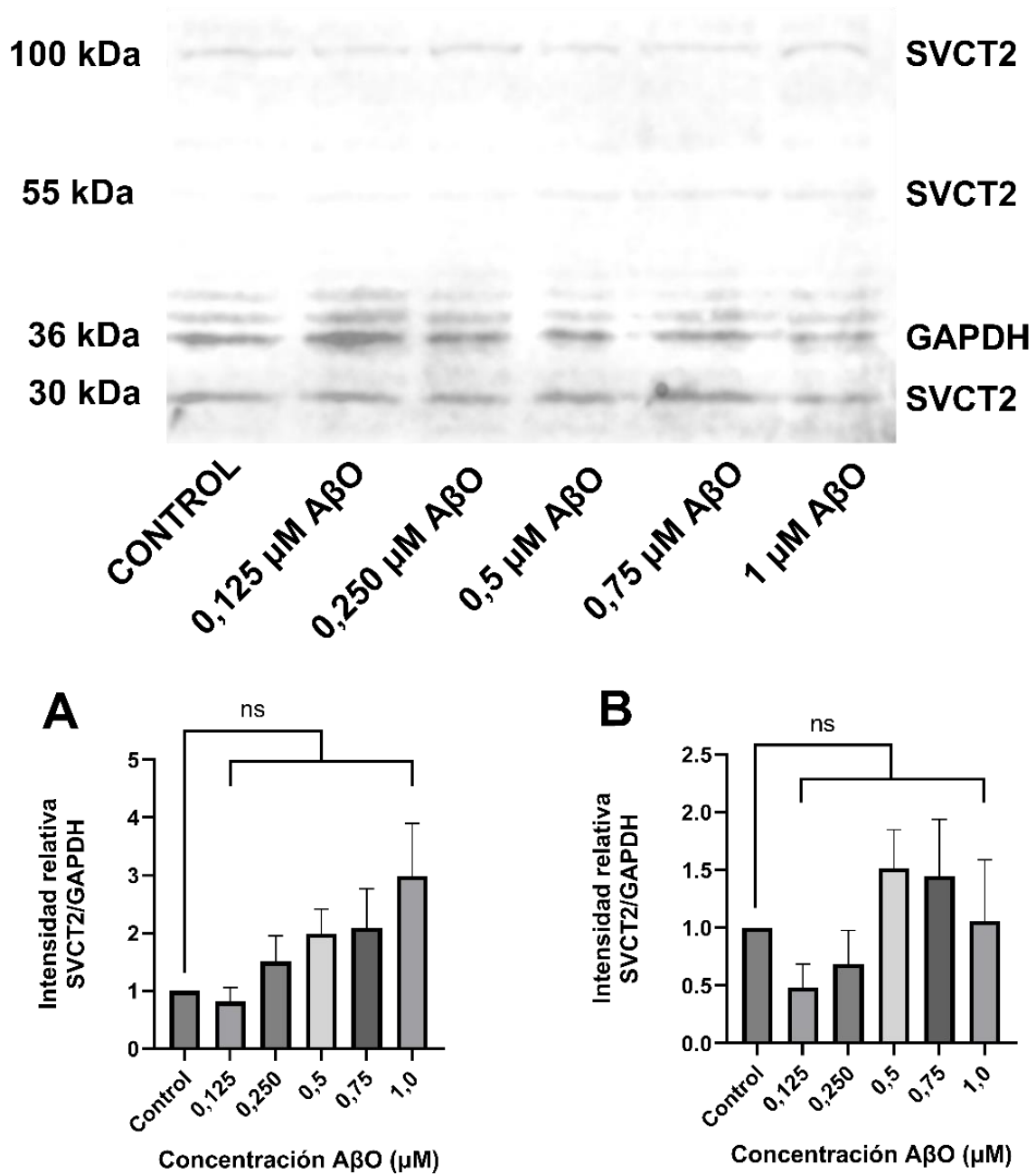


Figura 19: Expresión del transportador SVCT2 en proteínas totales extraídas de células CAD diferenciadas tratadas con AβOs. El análisis por Western blot de la expresión de SVCT2 en proteínas totales mostró la presencia de las bandas de 100, 55 y 30 kDa correspondientes a las isoformas de SVCT2. **A.** Se cuantificó la densidad de las bandas de SVCT2 de 30-40 kDa, normalizando con el control GAPDH. **B.** Se cuantificó la densidad de las bandas de SVCT2 de 55 kDa, normalizando con el control GAPDH (n=3; N=6). ns= no significativo.

5.4. Localización de SVCT2 en tejidos cerebrales humanos con distintos grados de acumulación de A β O s .

Para determinar si la expresión de SVCT2 en las líneas celulares humanas (ZR-75 y SH-SY5Y), líneas celulares de ratón (CAD diferenciadas) y los cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón *in vitro* refleja lo que ocurre en el tejido cerebral humano *in situ*, se realizaron estudios de inmunohistoquímica en tejidos cerebrales con un elevado nivel de anomalías neurodegenerativas asociadas a la acumulación de A β O s , de acuerdo con las etapas avanzadas de Braak (**Fig. 20**). Si bien la clasificación de Braak establece el avance de la patología neurodegenerativa en función de la propagación de NFTs, estudios histopatológicos han demostrado una correlación entre las etapas de Braak y la extensión de la deposición de A β O s ^[190]. En particular, se ha observado que la acumulación de A β sigue un patrón de expansión progresiva que comienza en la neocorteza y se extiende a otras regiones cerebrales, en paralelo con la progresión de los NFTs. Es así como, a partir de esta clasificación, se puede obtener una inferencia indirecta sobre la extensión de la deposición de A β en el cerebro (**Fig. 20**).

Además, se utilizaron tejidos tumorales como controles positivos y tejidos sanos como controles negativos. En total, se analizaron 21 muestras de tejidos tumorales, 7 muestras de tejidos sanos y 18 muestras de tejidos cerebrales, en los que se incluyeron muestras de hipocampo, corteza frontal, cuerpo estriado y cerebelo.

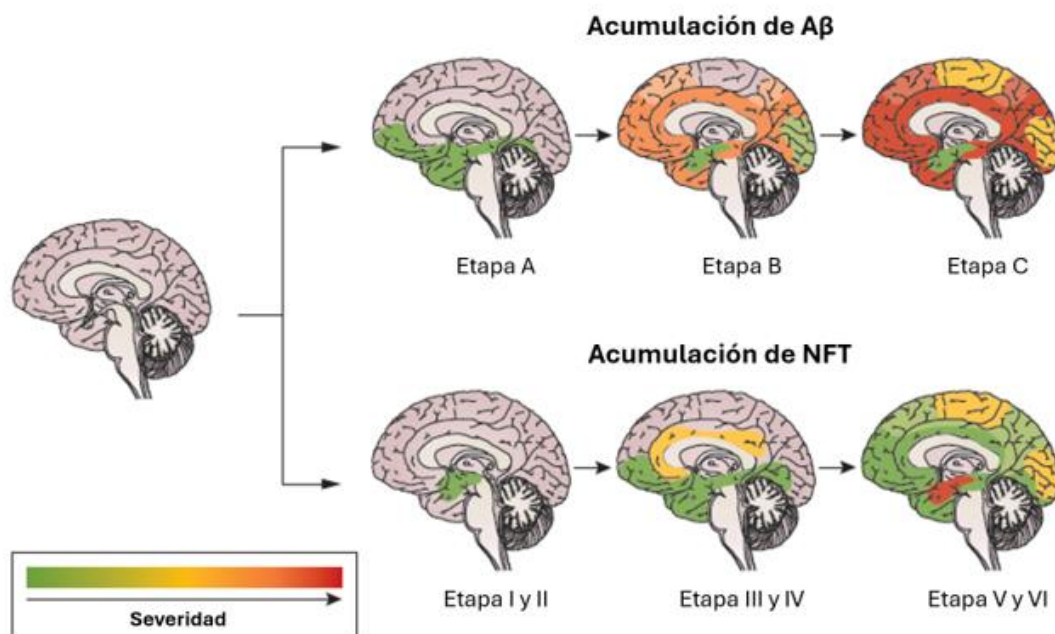


Figura 20: Progresión de la acumulación de A β y NFT en la EA según la clasificación de Braak. Si bien el sistema de clasificación de Braak se centra en la propagación de NFTs, se ha propuesto, en base a este, un modelo paralelo para la acumulación de A β . Esta comienza en las regiones corticales y límbicas (Etapa A), y posteriormente progresa a áreas más extensas del cerebro (Etapas B y C), mientras que la acumulación de NFTs comienza en la corteza entorrinal y el hipocampo (Etapas I y II), y se extiende gradualmente a otras áreas corticales en las etapas posteriores (III, IV, V y VI). Esta clasificación indica la severidad de la patología neurodegenerativa. Modificada de Masters, C. y colaboradores, *Nat Rev Dis Primers.*, 2015 ^[191].

Como se esperaba, los tejidos tumorales exhibieron un marcaje intenso de la SVCT2, mientras que los tejidos sanos utilizados como controles negativos no mostraron una señal detectable. Por otro lado, los tejidos cerebrales tampoco presentaron marcaje para SVCT2, lo que sugiere que su expresión en estas regiones es limitada o nula bajo las condiciones experimentales utilizadas. **(Fig. 21)**. Es importante destacar que los tejidos cerebrales exhibieron una población neuronal notoriamente baja y además morfológicamente alterada debido a la neurodegeneración avanzada. Dado a que no se disponía de controles de tejido cerebral de individuos sanos, se utilizaron imágenes histológicas referenciales de la Universidad de Michigan ^[192]., correspondientes a tejido hipocampal y tejido de corteza cerebral **(Fig. 22)**.

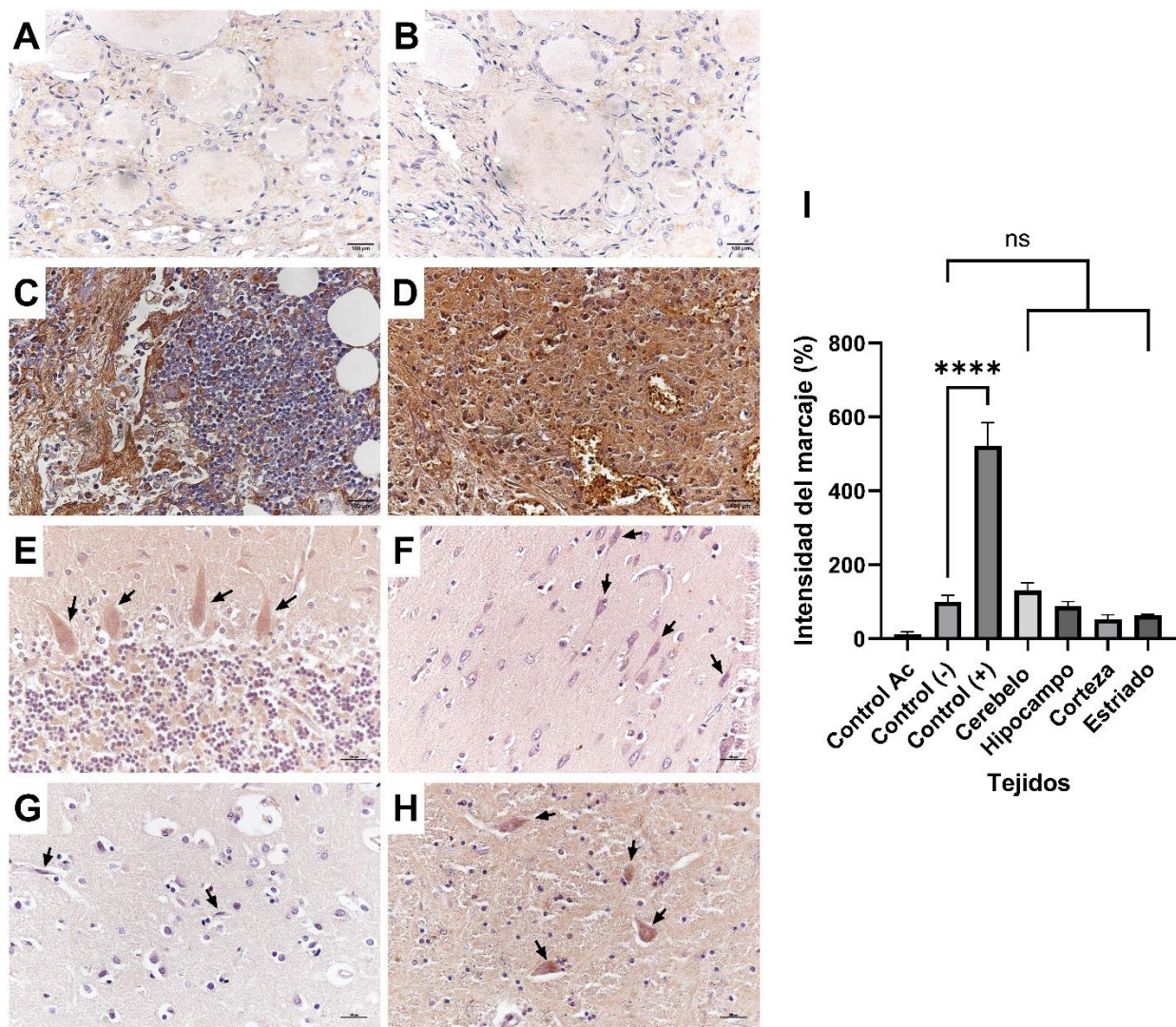


Figura 21. Expresión del transportador SVCT2 en tejidos tumorales y cerebrales. Se analizó la intensidad del marcaje inmunohistoquímico de diferentes tipos de tejidos humanos y se observó que SVCT2 se expresa mayoritariamente en tejido tumoral. **A.** Expresión de SVCT2 en tejido tiroideo sano. **B.** Expresión de SVCT2 en tejido mamario sano. **C.** Expresión de SVCT2 en tejido metastásico ganglionar de adenocarcinoma gástrico poco diferenciado. **D.** Expresión de SVCT2 en tejido metastásico pulmonar de adenocarcinoma tiroideo. **E.** Expresión de SVCT2 en corteza cerebelar, las flechas señalan neuronas cerebelares. **F.** Expresión de SVCT2 en tejido hipocampal, las flechas señalan neuronas hipocampales. **G.** Expresión de SVCT2 en tejido cortical, las flechas señalan neuronas corticales. **H.** Expresión de SVCT2 en tejido estriatal, las flechas señalan neuronas estriatales. **I.** Análisis de la intensidad de marcaje del transportador SVCT2 en los diferentes tipos de tejidos humanos, con los valores normalizados y expresados como porcentaje. *Control Ac* corresponde al control del anticuerpo primario. *Control (-)* corresponde al control en tejidos sanos. *Control (+)* corresponde al control en tejidos tumorales. (*Control Ac*: $2 \pm 1\%$; *Control (-)*: $13 \pm 2\%$; *Control (+)*: $68 \pm 8\%$; Cerebelo: $17 \pm 8\%$; Hipocampo: $11 \pm 6\%$; Corteza: $7 \pm 2\%$; Estriado: $8 \pm 0.4\%$) (*Control (-)* n =3; N=7) (*Control (+)* n=3; N=21) (Tejidos cerebrales n=3; N=27) ****p<0.0001 versus el *Control (-)*. ns= no significativo. Para todos los tejidos se realizó una contratinción con hematoxilina luego del marcaje de SVCT2. La barra escala ubicada en la esquina inferior derecha equivale a 100 μ m en todas las imágenes.

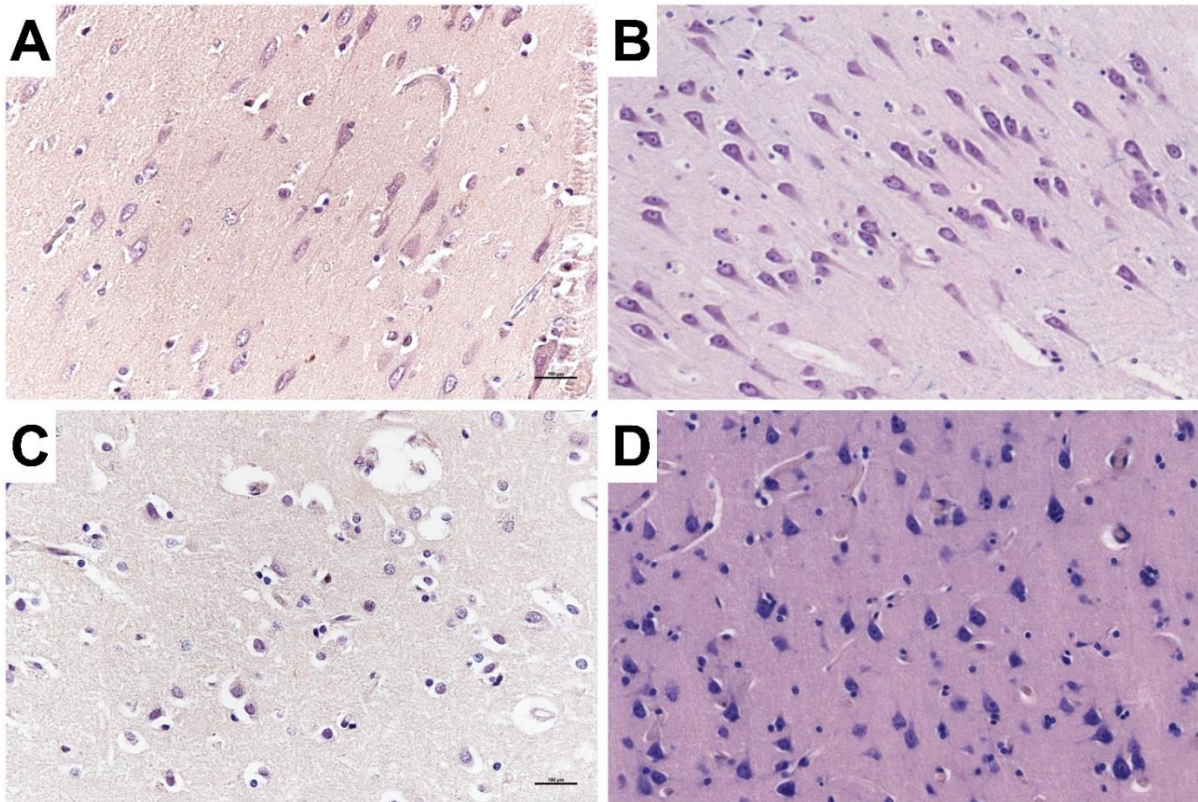


Figura 22: Comparación entre cortes de tejido con neurodegeneración avanzada y tejido control sano obtenido de la literatura. A y C corresponden, respectivamente, a tejido hipocámpal y tejido cortical en etapas avanzadas de neurodegeneración, marcados con anticuerpo anti-SVCT2 y contrateñidos con hematoxilina. **B.** Tejido hipocámpal sano teñido con azul de Luxol. **D.** Tejido cortical sano teñido con azul de toluidina y eosina. La comparación entre A y C con sus respectivos controles sanos (B y D) revela una importante reducción en la población neuronal en los tejidos con neurodegeneración avanzada. La barra en A y C equivale a 100 μm , y las imágenes referenciales se seleccionaron ajustándose a esa escala. Las imágenes de tejidos cerebrales sanos se obtuvieron de la base de datos histológica de la Universidad de Michigan, EE.UU. ^[192].

6. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo es un factor importante en el daño neuronal asociado a enfermedades neurodegenerativas. Las ROS producidas en exceso durante la disfunción mitocondrial contribuyen al daño celular y aceleran la progresión de estas enfermedades. La vitamina C, un potente agente reductor, desempeña un papel importante en la neutralización de ROS y la protección de las células frente al estrés oxidativo. No obstante, para que ejerza sus efectos protectores, debe ser transportada de manera eficiente hacia las neuronas y, en particular, hacia las mitocondrias. El transportador SVCT2 es el encargado de mediar la captación de AA hacia las células, y evidencias recientes sugieren que también podría localizarse en las mitocondrias, desde donde desempeñaría un papel directo en la mitigación del estrés oxidativo.

En el contexto de la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que los oligómeros solubles del péptido β -amiloide inducen estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, lo que podría estar afectando la expresión y localización de SVCT2. Para abordar esta interrogante, se realizó un análisis comprehensivo de la expresión del transportador SVCT2 tanto en células en cultivo derivadas de ratón y humano como en tejido nervioso proveniente de pacientes con algún grado de la enfermedad de Alzheimer. Nuestro objetivo principal fue de determinar si las neuronas en un contexto de enfermedad de Alzheimer expresan el transportador SVCT2 en mitocondrias, y si el tratamiento con distintas concentraciones de A β Os afecta los niveles de expresión de esta proteína. Sin embargo, nos encontramos con una primera limitación: el anticuerpo utilizado para detectar de la forma mitocondrial de SVCT2, previamente caracterizado en células HEK293 y ZR-75, no logró reconocer SVCT2 en células de ratón mediante

ensayos de inmunocitoquímica. Esto nos llevó a explorar nuevas alternativas para poder resolver la problemática planteada. A continuación, discutimos la fiabilidad de los nuevos anticuerpos empleados, así como las principales conclusiones y limitaciones de este estudio respecto a la expresión de SVCT2 en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

Estandarización y fiabilidad de los anticuerpos utilizados

En la búsqueda de un anticuerpo que permitiera la detección de SVCT2 en el modelo celular murino, se seleccionaron dos anticuerpos por el nivel de inmunomarcaje obtenido: L33 y L10. Al realizar la tinción en células CAD, uno de los principales modelos utilizados en esta tesis, se observó que el anticuerpo L10 presentaba un patrón de distribución intranuclear. Esto nos llevó a optar por el uso de L33. Sin embargo, es importante señalar que la expresión nuclear de SVCT2 ya ha sido previamente descrita en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, utilizando el anticuerpo HPA052825. Según los autores, el marcaje nuclear y de membrana nuclear de SVCT2 podría explicarse por el hecho de que el AA actúa como un cofactor de enzimas nucleares 2-OGDD, tales como las TETs y KDMs. En ese sentido, la expresión nuclear del transportador SVCT2 permitiría la actividad de estas enzimas a nivel nuclear ^[193].

En la caracterización del anticuerpo L33 en línea celular CAD, se observó un patrón de marcaje intracelular, que fue corroborado mediante inmunocitoquímica en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de ratón. Sin embargo, como se discutirá más adelante, aunque SVCT2 se localiza intracelularmente, su distribución no sigue un patrón mitocondrial y no colocaliza con marcadores mitocondriales en condiciones

control. Es más, al utilizar la línea celular ZR-75, que se emplea como control positivo para la expresión de la forma mitocondrial de SVCT2, se reveló que el anticuerpo L33 colocaliza con marcadores mitocondriales, lo que indica que este anticuerpo tiene la capacidad de detectar la forma mitocondrial de SVCT2, aunque los niveles de colocalización observados son significativamente menores que los obtenidos con el anticuerpo S19, lo cual podría explicarse por el tropismo diferencial de ambos anticuerpos hacia distintas formas de SVCT2. Esta observación se refuerza en los resultados obtenidos tanto en las inmunocitoquímica como en los ensayos de Western blot de las líneas celulares humanas; para las células SH-SY5Y, existe una superposición significativa de ambos anticuerpos S19 y L33, respaldando la afirmación de que L33 es capaz de reconocer epítopes similares a S19, el cual a su vez reconoce la forma mitocondrial de SVCT2. En los ensayos de Western blot de ZR-75, al utilizar el anticuerpo S19, se detectó principalmente una banda de 30 kDa, mientras que al emplear el anticuerpo L33, se identificó principalmente una banda de 55 kDa; en el caso de las células SH-SY5Y, el anticuerpo L33 identificó la presencia de tres bandas, de 100 kDa, 55 kDa y 30 kDa. Los datos obtenidos fueron comparados con la literatura, mostrando que la banda de 30 kDa correspondería a la forma mitocondrial de SVCT2, mientras que la banda de 55 kDa correspondería a la descrita como forma corta de SVCT2 ^[145,147,154]. Al menos en este experimento no fue posible detectar la forma *full length* de SVCT2 de 100 kDa en las líneas de cáncer de mama, lo que calza con lo reportado en literatura que estas células no expresan el transportador SVCT2 funcional a nivel de membrana plasmática ^[177].

Análisis en neuronas hipocampales de ratón y células CAD diferenciadas

Si bien SVCT2 está presente intracelularmente, los coeficientes de Pearson y Mander indican que su distribución no coincide con las mitocondrias. Es más, en neuronas no

tratadas con A β O_s hay una ligera anticorrelación observada que sugiere que SVCT2 puede incluso estar excluida de estos organelos en condiciones fisiológicas. En las neuronas tratadas con 0,5 μ M de A β O_s, los resultados de colocación son más variados, con la mayoría de los ensayos mostrando valores de Pearson moderados, lo que sugiere una colocación significativa que podría ser biológicamente relevante. Sin embargo, en neuronas tratadas con 1 μ M de A β O_s, se observa una pérdida de colocación entre SVCT2 y la sonda mitocondrial, con valores de Pearson bajos que refuerzan la idea de una reducción drástica en la colocación. Esta pérdida podría estar relacionada con la destrucción celular y el daño mitocondrial inducidos por los A β O_s, o bien podría ser que las especies oligoméricas generadas a 1 μ M no sean tan patogénicas como las producidas a 0,5 μ M. Por otro lado, el análisis de Western blot reveló que la expresión de SVCT2 de 55 kDa, posiblemente la variante corta, se regula al alza en respuesta a concentraciones crecientes de A β O_s.

Estudios previos han sugerido que los A β O_s inducen cambios rápidos en la expresión de microARNs (miRNA), lo que a su vez altera el patrón de expresión de proteínas y puede influir en las modificaciones postraduccionales de estas ^[194,195]. En ese sentido, recientemente se han identificado miRNAs que regulan negativamente la expresión del SVCT2 *full length* en otros tipos celulares mediante la inhibición postranscripcional del transportador ^[196]. Este mecanismo podría ser relevante en el contexto neuronal, planteando la posibilidad de que la exposición a A β O_s promueva la sobreexpresión de miRNAs específicos que favorezcan la aparición de variantes de SVCT2 y disminuyan su forma funcional. Bajo esa perspectiva, la aparición de la variante corta podría estar indicando una disrupción significativa en la función de SVCT2 en el cultivo primario, posiblemente como una respuesta maladaptativa al daño crónico provocado

por los A β Os. Su efecto dominante negativo sobre la forma *full length* de SVCT2, sumado a su incapacidad para transportar ácido ascórbico, tendría el potencial de exacerbar el daño oxidativo y contribuir a los procesos neurodegenerativos observados en enfermedades como el Alzheimer.

Otra posible explicación para el patrón de expresión de SVCT2 bajo las condiciones de exposición a A β Os podría involucrar la activación de la vía de señalización NF- κ B. Según se ha descrito antes en la literatura, la activación de NF- κ B en respuesta a altos niveles de estrés oxidativo promueve la producción de TNF- α ^[197], que a su vez puede mediar directamente en la expresión de *SLC23A2* ^[198]. Este mecanismo inflamatorio, inducido por el estado oxidativo provocado por los A β Os, podría suprimir la forma *full length* de SVCT2 y, al mismo tiempo, favorecer la aparición de variantes, como la observada en nuestros ensayos, por *splicing* alternativo. Los eventos de *splicing* alternativos se han reportado con frecuencia durante las patologías neurodegenerativas; el *splicing* del exón 15 de APP puede alterar la proporción de sus fragmentos proteolíticos, gatillando la formación de placas amiloides ^[199]. Siguiendo esa misma línea, la proteína tau presenta isoformas dependientes del *splicing* alternativo del exón 10, que puede alterar su patrón de expresión y desencadenar la formación de ovillos neurofibrilares ^[200]. FynT, una isoforma de la proteína tirosina quinasa Fyn producto de *splicing* alternativo, está sobreexpresada en pacientes con EA y se asocia a procesos neuroinflamatorios crónicos ^[201]. Por último, el receptor AMPA, un mediador clave en la transmisión sináptica, presenta *splicing alternativo* en la enfermedad de Parkinson ^[202]. Estos ejemplos refuerzan la noción de que los eventos de *splicing* alternativo modulados por vías inflamatorias juegan un papel importante en las alteraciones proteómicas causadas por los A β Os. En ese sentido,

la sobreexpresión de la variante de 55 kDa de SVCT2 podría no tratarse de un evento aislado, sino más bien de un proceso complejo de disrupción en la regulación transcripcional de proteínas esenciales.

Concluyendo respecto al análisis en neuronas hipocampales de ratón, el tratamiento con AβOs podría no solo estar modulando la localización subcelular de SVCT2, sino que también promoviendo la expresión de una variante perjudicial. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para aclarar los mecanismos detrás de estos resultados y determinar su impacto biológico en el progreso de la neurodegeneración.

Siguiendo con las células CAD, el análisis de Western blot identificó tres bandas distintas correspondientes a diferentes variantes de SVCT2: la forma *full length* de 100 kDa, la variante corta de 55 kDa y la forma mitocondrial de 30 kDa. La forma *full length* de 100 kDa se mantuvo débil pero consistentemente expresada en todas las condiciones, lo que sugiere que las células CAD mantienen un nivel basal de SVCT2 independiente del tratamiento con AβOs. La variante corta de 55 kDa, en cambio, mostró un ligero aumento en respuesta a los AβOs, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo. Esta variante inhibe la función normal de la forma *full length* de SVCT2, lo que podría exacerbar el estrés oxidativo al afectar la captación de vitamina C y su presencia, tanto en células CAD como en las neuronas hipocampales, reforzando la idea de una respuesta maladaptativa que podría comprometer la capacidad celular para resistir el daño oxidativo. Por otro lado, la banda de 30 kDa se expresó intensa y constantemente en todas las condiciones experimentales de las células CAD. Esta variante cumpliría un papel importante en el mantenimiento de la función mitocondrial, asegurando un suministro constante de ácido ascórbico para

combatir la producción de ROS en estos organelo. Sin embargo, a pesar de la presencia de esta variante en el análisis de Western blot, los ensayos de colocalización no revelaron una colocalización significativa de SVCT2 con las mitocondrias en las células CAD, con valores de los coeficientes de Pearson y Mander bajos que se mantuvieron constantes en las diferentes condiciones experimentales. Esto sugiere que la variante de 30 kDa no está asociada directamente con las mitocondrias, sino que se localiza posiblemente en otros compartimentos celulares. Los patrones de expresión observados en las células CAD contrastan con los de las neuronas hipocampales, donde la variante corta de 55 kDa fue la forma predominante, con nula expresión de las formas de 100 kDa y 30 kDa. Esta discrepancia resalta las diferencias de usar líneas celulares inmortalizadas para modelar comportamientos complejos. Los cultivos primarios, que conservan más las características específicas del tejido original, pueden exhibir mecanismos distintos que no están presentes en las líneas celulares, y se alinean con otras investigaciones que muestran que las líneas celulares inmortalizadas pueden revelar perfiles de expresión proteica diferentes en comparación con estos. Por ejemplo, se ha visto que las líneas celulares neuronales como PC12, si bien son ampliamente utilizadas en la investigación neurobiológica, expresan distintos niveles de receptores de neurotransmisores, canales iónicos y proteínas sinápticas en comparación con los cultivos primarios de neuronas, lo que conduce a diferencias en estudios sobre transmisión sináptica y neurodegeneración [203]. De manera similar y en otro contexto, se ha visto que las líneas celulares de cardiomiocitos H9c2 expresan diferentes conjuntos de canales iónicos y proteínas contráctiles en comparación con los cultivos primarios de cardiomiocitos, lo que afecta su función para imitar con precisión la función cardíaca [204]. Estos ejemplos indican que, aunque las líneas celulares ofrecen conveniencia y reproducibilidad, pueden no

capturar completamente la complejidad de los sistemas primarios, lo que puede generar discrepancias en los resultados experimentales.

Si bien las líneas celulares siguen siendo muy útiles y ampliamente utilizadas en la investigación de cultivos neuronales, el uso de cultivos primarios es preferible para estudios que buscan asimilar las propiedades de las células neuronales *in vivo*, ya que no derivan de tumores. Sin embargo, el uso del cultivo primario neuronal también trae sus limitaciones. A diferencia de las líneas celulares, que ofrecen un suministro ilimitado de células homogéneas, la preparación y el cultivo de células primarias es más complejo, especialmente en el caso de las neuronas. Además, los cultivos primarios no son inmortales, lo que limita significativamente la cantidad de células disponibles para experimentos. Otra complicación es la necesidad de aislar el tipo celular de interés y determinar la pureza de los cultivos obtenidos, algo que no es posible en el caso de los cultivos primarios de neuronas debido a su dependencia de una base de células gliales. Esto representa una dificultad adicional, especialmente en los ensayos de Western blot realizados en esta investigación, ya que la glía puede estar interfiriendo en los resultados al contribuir al perfil de expresión detectado.

Es evidente que se requieren de más investigaciones para validar y ampliar nuestra comprensión de la regulación de SVCT2 en células neuronales. Los estudios futuros deberían incluir ensayos funcionales, como mediciones de la captación de vitamina C y evaluaciones de marcadores de estrés oxidativo, para confirmar el papel inhibitorio de la variante de 55 kDa. Además, será importante verificar la ocurrencia de *splicing* alternativo en el gen *SLC23A2* analizando los transcritos de ARNm en líneas celulares y neuronas primarias expuestas a A β Os, y, posteriormente, en un cultivo exclusivos

de células gliales para descartar su posible contribución en la aparición de las variantes de SVCT2. Los ensayos de FRET o BRET podrían proporcionar información valiosa sobre las interacciones de esta variante con la forma *full length* en tiempo real y aclarar su mecanismo de acción inhibitorio; como alternativa, la co-inmunoprecipitación podría utilizarse para estudiar dichas interacciones. Además, estudios de silenciamiento génico mediante siRNA podrían ser útiles para determinar los impactos específicos de las diferentes variantes de SVCT2 en la función celular. Por último, la validación *in vivo* en modelos transgénicos será necesaria para evaluar el impacto de SVCT2 y sus variantes en la progresión de la EA, en un contexto más fisiológico.

Análisis en tejidos cerebrales humanos

Al momento de trabajar con los tejidos cerebrales en estados avanzado de neurodegeneración se presentaron varios desafíos importantes. En principio, un obstáculo importante fue la presencia de lipofuscina, una molécula asociada al proceso de envejecimiento que se acumula en el tejido cerebral con el paso del tiempo. La lipofuscina es altamente autofluorescente y su espectro de emisión se solapa con el de los fluoróforos comúnmente utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica, generando interferencias importantes que hicieron imposible diferenciar las señales específicas de SVCT2 y las mitocondrias. Debido a esto, fue necesario abandonar el uso de inmunofluorescencia y recurrir al marcaje cromogénico de SVCT2 por DAB, cuya resolución espacial es menor y no permite realizar estudios de colocalización simultánea.

Otra observación crítica para considerar es la marcada pérdida neuronal en las muestras de tejido cerebral humano con estados avanzados de neurodegeneración, según la clasificación de Braak. En las etapas más avanzada, se documenta casi una ausencia total de neuronas en áreas claves del cerebro tales como el hipocampo, la corteza entorrinal y la corteza cerebral, lo que podría explicar el inmunomarcaje débil de SVCT2 en esas áreas al estar reducida su señal global. Además, la falta de tejido cerebral de control dificulta la comparación de los niveles de expresión de SVCT2 en condiciones saludables. Como alternativa, se recurrió a referencias de la literatura que proporcionan imágenes histológicas de tejido cerebral sano, aunque estas no están marcadas específicamente contra SVCT2 o proteínas mitocondriales. A pesar de la limitación en esta comparación, se puede evidenciar una reducción drástica en la población neuronal de las muestras con neurodegeneración avanzada, lo que respalda la idea de que la falta de señal de SVCT2 podría deberse, en principio, a la ausencia de neuronas en estas áreas afectadas. Sumado a esto, las alteraciones morfológicas y la pérdida de la integridad de los tejidos posiblemente impactan los resultados de los ensayos de inmunodetección, ya que pueden complicar la accesibilidad de anticuerpos a sus epítomos, dificultando la correcta identificación de SVCT2 en las células sobrevivientes. También, la degradación estructural de las neuronas podría alterar la distribución normal de SVCT2, provocando una señal difusa o atípica en comparación con controles saludables.

Por último, los puntos previamente discutidos adquieren mayor relevancia al notar que, en las áreas donde se observan algunas neuronas, como el núcleo estriado, cerebelo e hipocampo, se destaca un marcaje en ellas con la técnica utilizada. El marcaje es especialmente evidente en las neuronas de Purkinje y las neuronas del

núcleo estriado, lo que sugiere una fuerte expresión de SVCT2 intracelular en estas células específicas. Este fenómeno requiere un estudio más detallado para dilucidar la localización de SVCT2 en las neuronas y su posible implicancia en los procesos neurodegenerativos.

7. CONCLUSIÓN

La hipótesis inicial sugería que la expresión mitocondrial de SVCT2 aumentaría en respuesta al tratamiento crónico con oligómeros del péptido A β (A β O s) en neuronas hipocampales de ratón y células CAD diferenciadas. Sin embargo, los resultados de este estudio no respaldan esta hipótesis. En lugar de ello, los datos revelan que esta variante de SVCT2 no aumenta su expresión ni se colocaliza con las mitocondrias en respuesta a los A β O s , y la expresión predominante de una variante corta de SVCT2 en neuronas hipocampales sugiere una posible respuesta maldaptativa que podría inhibir el transporte de vitamina C y exacerbar el estrés oxidativo. Por lo tanto, la hipótesis debe ser reevaluada con investigaciones adicionales que se centren en las implicancias funcionales de las variantes de SVCT2 en modelos murinos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

8. REFERENCIAS

- [1] Agrawal, M., & Biswas, A., *Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders*. Frontiers in molecular biosciences, 2015. **2**: p. 54.
- [2] Durães, F., Pinto, M., & Sousa, E., *Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases*. Pharmaceuticals, 2018. **11**(2): p. 44.
- [3] Long, S., Benoit, C., & Weidner, W., *World Alzheimer Report 2023*. Alzheimer's Disease International, 2023.
- [4] Collaborators, G. D. F., *Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. Lancet Public Health, 2022. **7**(2): p. e105-e125.
- [5] Musiek, E. S., & Schindler, S. E., *Alzheimer disease: current concepts & future directions*. Missouri Medicine, 2013. **110**(5): p. 395.
- [6] Goedert, M., *Oskar Fischer and the study of dementia*. Brain, 2009. **132**(Pt 4): p. 1102-1111.
- [7] Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R., *An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"*. Clin Anat, 1995. **8**(6): p. 429-431.
- [8] Alzheimer's Association. (2024). *2024 Alzheimer's Disease Facts and Figures (1552-5260)*. (Alzheimers Dement, Issue).
- [9] Guerreiro, R., & Bras, J., *The age factor in Alzheimer's disease*. Genome Med, 2015. **7**: p. 106.
- [10] Madhani, R. S., *Alzheimer's disease: a mini-review for the clinician*. Front Neurol, 2023. **14**: p. 1178588.
- [11] Cumplido-Mayoral, I., García-Prat, M., Operto, G., Falcon, C., Shekari, M., Cacciaglia, R., Milà-Alomà, M., Lorenzini, L., Ingala, S., Meije Wink, A., Mutsaerts, H., Minguillón, C., Fauria, K., Molinuevo, J. L., Haller, S., Chetelat, G., Waldman, A., Schwarz, A. J., Barkhof, F.,...Gispert, J. D., *Biological brain age prediction using machine learning on structural neuroimaging data: Multi-cohort validation against biomarkers of Alzheimer's disease and neurodegeneration stratified by sex*. Elife, 2023. **12**.
- [12] Gao, X. R., Chiariglione, M., Qin, K., Nuytemans, K., Scharre, D. W., Li, Y. J., & Martin, E. R., *Explainable machine learning aggregates polygenic risk scores and electronic health records for Alzheimer's disease prediction*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 450.
- [13] Jack, C. R., Jr., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., & Sperling, R., *NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2018. **14**(4): p. 535-562.
- [14] Franke, K., & Gaser, C., *Ten Years of BrainAGE as a Neuroimaging Biomarker of Brain Aging: What Insights Have We Gained?* Front Neurol, 2019. **10**: p. 789.
- [15] Fjell, A. M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A. M., & Walhovd, K. B., *What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus*. Prog Neurobiol, 2014. **117**: p. 20-40.
- [16] Nelson, P. T., Head, E., Schmitt, F. A., Davis, P. R., Neltner, J. H., Jicha, G. A., Abner, E. L., Smith, C. D., Van Eldik, L. J., Kryscio, R. J., & Scheff, S. W., *Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies*. Acta Neuropathol, 2011. **121**(5): p. 571-587.
- [17] Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Larson, E. B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L.,...Mukadam, N., *Dementia prevention, intervention, and care*. Lancet, 2017. **390**(10113): p. 2673-2734.
- [18] Ferraro, O. E., Guaita, A., & Villani, S., *Cognitive, physical and disability trajectories in community-dwelling elderly people*. Aging Clin Exp Res, 2021. **33**(10): p. 2671-2677.
- [19] Ju, Y., & Tam, K. Y., *Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease*. Neural Regen Res, 2022. **17**(3): p. 543-549.
- [20] Manuella, J., Min, J., McCarthy, P., Alfaro-Almagro, F., Lee, S., Smith, S., Elliott, L. T., Winkler, A. M., & Douaud, G., *The effects of genetic and modifiable risk factors on brain regions vulnerable to ageing and disease*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 2576.
- [21] Breijyeh, Z., & Karaman, R., *Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment*. Molecules, 2020. **25**(24): p. 5789.
- [22] Shaw, G., *New Study Characterizing APOE4 Homozygosity as Distinct Form of Alzheimer's Sparks Debate*. Neurology Today, 2024. **24**(12): p. 1-19.
- [23] Qian, J., Wolters, F. J., Beiser, A., Haan, M., Ikram, M. A., Karlawish, J., Langbaum, J. B., Neuhaus, J. M., Reiman, E. M., & Roberts, J. S., *APOE-related risk of mild cognitive impairment and dementia for prevention trials: an analysis of four cohorts*. PLoS medicine, 2017. **14**(3): p. e1002254.
- [24] Hampel, H., Vassar, R., De Strooper, B., Hardy, J., Willem, M., Singh, N., Zhou, J., Yan, R., Vanmechelen, E., & De Vos, A., *The β -secretase BACE1 in Alzheimer's disease*. Biological psychiatry, 2021. **89**(8): p. 745-756.
- [25] Zhou, B., Lu, J. G., Siddu, A., Wernig, M., & Südhof, T. C., *Synaptogenic effect of APP-Swedish mutation in familial Alzheimer's disease*. Science translational medicine, 2022. **14**(667): p. eabn9380.

- [26] Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R., *Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity: Supplementary issue: Brain plasticity and repair*. Journal of experimental neuroscience, 2016. **10**: p. JEN. S39887.
- [27] Lykkenfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P., *The pharmacokinetics of vitamin C*. Nutrients, 2019. **11**(10): p. 2412.
- [28] Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., & Cole, G., *Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice*. Science, 1996. **274**(5284): p. 99-103.
- [29] Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., & et al., *Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein*. Nature, 1995. **373**(6514): p. 523-527.
- [30] Wyss-Coray, T., Masliah, E., Mallory, M., McConlogue, L., Johnson-Wood, K., Lin, C., & Mucke, L., *Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 603-606.
- [31] Chin, J., Palop, J. J., Puoliväli, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Scarce-Levie, K., Masliah, E., & Mucke, L., *Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Journal of Neuroscience, 2005. **25**(42): p. 9694-9703.
- [32] Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.-H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., & Paganetti, P. A., *Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(24): p. 13287-13292.
- [33] Borchelt, D. R., Ratovitski, T., Van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., & Sisodia, S. S., *Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins*. Neuron, 1997. **19**(4): p. 939-945.
- [34] Plascencia-Villa, G., & Perry, G., *Preventive and therapeutic strategies in Alzheimer's disease: focus on oxidative stress, redox metals, and ferroptosis*. Antioxidants & redox signaling, 2021. **34**(8): p. 591-610.
- [35] MC, H., *A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis*. Nat Neurosci, 2004. **7**: p. 954-960.
- [36] Cheng, I. H., Palop, J. J., Esposito, L. A., Bien-Ly, N., Yan, F., & Mucke, L., *Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation*. Nature medicine, 2004. **10**(11): p. 1190-1192.
- [37] Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., & Morgan, D., *Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes*. Nature medicine, 1998. **4**(1): p. 97-100.
- [38] Langui, D., Girardot, N., El Hachimi, K. H., Allinquant, B., Blanchard, V., Pradier, L., & Duyckaerts, C., *Subcellular topography of neuronal A β peptide in APPxPS1 transgenic mice*. The American journal of pathology, 2004. **165**(5): p. 1465-1477.
- [39] Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., Van Der Kolk, N., Vingdeux, V., Van De Steeg, E., Ret, G., & Canton, T., *Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A β 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model*. The American journal of pathology, 2004. **165**(4): p. 1289-1300.
- [40] Copley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M., *13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress*. Redox biology, 2018. **15**: p. 490-503.
- [41] Bai, R., Guo, J., Ye, X.-Y., Xie, Y., & Xie, T., *Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease*. Ageing research reviews, 2022. **77**: p. 101619.
- [42] Cavanaugh, S. E., Pippin, J. J., & Barnard, N. D., *Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward*. Altx, 2014. **31**(3): p. 279-302.
- [43] Kumfor, F., Halliday, G. M., & Piguet, O., *Clinical aspects of Alzheimer's disease*. Neurodegenerative Diseases: Pathology, Mechanisms, and Potential Therapeutic Targets, 2017: p. 31-53.
- [44] Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B., *Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease*. Nature Reviews Neuroscience, 2015. **16**(6): p. 358-372.
- [45] Tzioras, M., McGeachan, R. I., Durrant, C. S., & Spires-Jones, T. L., *Synaptic degeneration in Alzheimer disease*. Nature reviews neurology, 2023. **19**(1): p. 19-38.
- [46] Kojro, E., & Fahrenholz, F., *The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases*. Subcell Biochem, 2005. **38**: p. 105-127.
- [47] Patel, S., Bansoad, A. V., Singh, R., & Khatik, G. L., *BACE1: a key regulator in Alzheimer's disease progression and current development of its inhibitors*. Current Neuropharmacology, 2022. **20**(6): p. 1174.
- [48] Thinakaran, G., & Koo, E. H., *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29615-29619.
- [49] Rostagno, A., Cabrera, E., Lashley, T., & Ghiso, J., *N-terminally truncated A β 4-x proteoforms and their relevance for Alzheimer's pathophysiology*. Translational Neurodegeneration, 2022. **11**(1): p. 30.
- [50] Omtri, R. S., Davidson, M. W., Arumugam, B., Poduslo, J. F., & Kandimalla, K. K., *Differences in the cellular uptake and intracellular itineraries of amyloid beta proteins 40 and 42: ramifications for the Alzheimer's drug discovery*. Molecular pharmaceuticals, 2012. **9**(7): p. 1887-1897.
- [51] Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M., *A β 42 and A β 40: similarities and differences*. Journal of peptide science, 2015. **21**(7): p. 522-529.

- [52] Lim, K. H., Collver, H. H., Le, Y. T., Nagchowdhuri, P., & Kenney, J. M., *Characterizations of distinct amyloidogenic conformations of the A β (1–40) and (1–42) peptides*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **353**(2): p. 443-449.
- [53] Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E., *Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development*. Acta Pharmacol Sin, 2017. **38**(9): p. 1205-1235.
- [54] Sgourakis, N. G., Yan, Y., McCallum, S. A., Wang, C., & Garcia, A. E., *The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study*. J Mol Biol, 2007. **368**(5): p. 1448-1457.
- [55] Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., & Teplow, D. B., *Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(1): p. 330-335.
- [56] Kumar-Singh, S., *Hereditary and sporadic forms of abeta-cerebrovascular amyloidosis and relevant transgenic mouse models*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(4): p. 1872-1895.
- [57] Caballero, E., Hernando-Pérez, E., Tapias, V., Calvo-Rodríguez, M., Villalobos, C., & Núñez, L., *Amyloid beta oligomers-induced Ca $^{2+}$ entry pathways: role of neuronal networks, NMDA receptors and amyloid channel formation*. Biomedicine, 2022. **10**(5): p. 1153.
- [58] Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., Domercq, M., & Matute, C., *Amyloid β oligomers induce Ca $^{2+}$ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors*. Cell calcium, 2010. **47**(3): p. 264-272.
- [59] Huang, Y.-r., & Liu, R.-t., *The toxicity and polymorphism of β -amyloid oligomers*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(12): p. 4477.
- [60] Cioffi, F., Adam, R. H. I., & Broersen, K., *Molecular mechanisms and genetics of oxidative stress in Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's Disease, 2019. **72**(4): p. 981-1017.
- [61] Flannery, P. J., & Trushina, E., *Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2019. **98**: p. 109-120.
- [62] Jones, D. P., & Sies, H., *The redox code*. Antioxidants & redox signaling, 2015. **23**(9): p. 734-746.
- [63] Hermes-Lima, M., *Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals*. Functional metabolism: regulation and adaptation, 2004. **1**: p. 319-366.
- [64] Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C., *Free radicals, antioxidants in disease and health*. Int J Biomed Sci, 2008. **4**(2): p. 89-96.
- [65] D'uracková, Z. k., *Free radicals and antioxidants for non-experts*. Systems biology of free radicals and antioxidants, 2014: p. 537-565.
- [66] Li, R., Jia, Z., & Trush, M. A., *Defining ROS in Biology and Medicine*. React Oxyg Species (Apex), 2016. **1**(1): p. 9-21.
- [67] Noreen, A., Bukhari, D. A., & Rehman, A., *Reactive Oxygen Species: Synthesis and Their Relationship with Cancer-A Review*. Pakistan Journal of Zoology, 2018. **50**(5).
- [68] Auten, R. L., & Davis, J. M., *Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details*. Pediatric research, 2009. **66**(2): p. 121-127.
- [69] Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O., *Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9): p. 1363-1373.
- [70] Bedard, K., & Krause, K. H., *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
- [71] Meitzler, J. L., Antony, S., Wu, Y., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Roy, K., & Doroshow, J. H., *NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology*. Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(17): p. 2873-2889.
- [72] Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L., *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. Indian J Clin Biochem, 2015. **30**(1): p. 11-26.
- [73] Alfadda, A. A., & Sallam, R. M., *Reactive oxygen species in health and disease*. BioMed research international, 2012. **2012**(1): p. 936486.
- [74] Demirci-Cekic, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R., *Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2022. **209**: p. 114477.
- [75] Sies, H., *Oxidative stress: Concept and some practical aspects*. Antioxidants, 2020. **9**(9): p. 852.
- [76] Choi, T. G., & Kim, S. S., *Physiological functions of mitochondrial reactive oxygen species*. Free Radic. Med. Biol, 2019.
- [77] Taylor, R. W., & Turnbull, D. M., *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nature Reviews Genetics, 2005. **6**(5): p. 389-402.
- [78] Chen, W., Zhao, H., & Li, Y., *Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets*. Signal transduction and targeted therapy, 2023. **8**(1): p. 333.
- [79] Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Missiroli, S., Patergnani, S., & Poletti, F., *Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging*. Journal of signal transduction, 2012. **2012**(1): p. 329635.
- [80] Brand, M. D., *Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **100**: p. 14-31.
- [81] Thomas, C., Mackey, M. M., Diaz, A. A., & Cox, D. P., *Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation*. Redox Rep, 2009. **14**(3): p. 102-108.

- [82] Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S., *Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases*. *Molecules*, 2019. **24**(8): p. 1583.
- [83] Willems, P. H., Rossignol, R., Dieteren, C. E., Murphy, M. P., & Koopman, W. J., *Redox homeostasis and mitochondrial dynamics*. *Cell metabolism*, 2015. **22**(2): p. 207-218.
- [84] Finkel, T., & Holbrook, N. J., *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 239-247.
- [85] Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. B., *Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling*. *International journal of molecular medicine*, 2019. **44**(1): p. 3-15.
- [86] Angelova, P. R., & Abramov, A. Y., *Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016. **100**: p. 81-85.
- [87] Shadel, G. S., & Horvath, T. L., *Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis*. *Cell*, 2015. **163**(3): p. 560-569.
- [88] Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H., *Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. *Journal of signal transduction*, 2012. **2012**(1): p. 646354.
- [89] Gomes, L. C., & Scorrano, L., *Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013. **1833**(1): p. 205-212.
- [90] Shutt, T. E., & McBride, H. M., *Staying cool in difficult times: mitochondrial dynamics, quality control and the stress response*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013. **1833**(2): p. 417-424.
- [91] Brand, M. D., & Nicholls, D. G., *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. *Biochemical Journal*, 2011. **435**(2): p. 297-312.
- [92] Grimm, A., & Eckert, A., *Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view*. *J Neurochem*, 2017. **143**(4): p. 418-431.
- [93] Cenini, G., Lloret, A., & Cascella, R., *Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019. **2019**: p. 2105607.
- [94] Bayliak, M. M., Gospodaryov, D. V., & Lushchak, V. I., *Homeostasis of carbohydrates and reactive oxygen species is critically changed in the brain of middle-aged mice: Molecular mechanisms and functional reasons*. *BBA advances*, 2023. **3**: p. 100077.
- [95] De Pasquale, R., Beckhauser, T. F., Hernandez, M. S., & Britto, L. R. G., *LTP and LTD in the visual cortex require the activation of NOX2*. *Journal of Neuroscience*, 2014. **34**(38): p. 12778-12787.
- [96] Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A., *Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. **2019**(1): p. 3085756.
- [97] Misgeld, T., & Schwarz, T. L., *Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture*. *Neuron*, 2017. **96**(3): p. 651-666.
- [98] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed., p. 816). Garland Science.
- [99] Flippo, K. H., & Strack, S., *Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity*. *Journal of cell science*, 2017. **130**(4): p. 671-681.
- [100] Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M., *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis*. *J Alzheimers Dis*, 2010. **20 Suppl 2**(Suppl 2): p. S265-279.
- [101] Cioffi, F., Adam, R. H. I., Bansal, R., & Broersen, K., *A Review of Oxidative Stress Products and Related Genes in Early Alzheimer's Disease*. *J Alzheimers Dis*, 2021. **83**(3): p. 977-1001.
- [102] Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., & Janssen-Heininger, Y., *Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo*. *Nature metabolism*, 2022. **4**(6): p. 651-662.
- [103] Jomova, K., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M., *Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants*. *Archives of Toxicology*, 2024. **98**(5): p. 1323-1367.
- [104] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N., *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. *Pharmacogn Rev*, 2010. **4**(8): p. 118-126.
- [105] Gómez, X., Sanon, S., Zambrano, K., Asquel, S., Bassantes, M., Morales, J. E., Otáñez, G., Pomaquero, C., Villarroya, S., & Zurita, A., *Key points for the development of antioxidant cocktails to prevent cellular stress and damage caused by reactive oxygen species (ROS) during manned space missions*. *npj Microgravity*, 2021. **7**(1): p. 35.
- [106] Palma, F. R., He, C., Danes, J. M., Paviani, V., Coelho, D. R., Gantner, B. N., & Bonini, M. G., *Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch*. *Antioxid Redox Signal*, 2020. **32**(10): p. 701-714.
- [107] Glorieux, C., & Calderon, P. B., *Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach*. *Biological chemistry*, 2017. **398**(10): p. 1095-1108.
- [108] Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. In *Vitamins and hormones* (Vol. 121, p. 109-141). Elsevier.
- [109] Aoyama, K., *Glutathione in the Brain*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(9).
- [110] Ren, X., Zou, L., Zhang, X., Branco, V., Wang, J., Carvalho, C., Holmgren, A., & Lu, J., *Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system*. *Antioxidants & redox signaling*, 2017. **27**(13): p. 989-1010.

- [111] Morris, M. C., Beckett, L. A., Scherr, P. A., Hebert, L. E., Bennett, D. A., Field, T. S., & Evans, D. A., *Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease*. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 1998. **12**(3): p. 121-126.
- [112] Masaki, K., Losonczy, K., Izmirlian, G., Foley, D., Ross, G., Petrovitch, H., Havlik, R., & White, L., *Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men*. *Neurology*, 2000. **54**(6): p. 1265-1272.
- [113] Wachter, V. J., & Benet, L. Z. (1999). Propyl gallate to increase bioavailability of orally administered pharmaceutical compounds. In: Google Patents.
- [114] Singh, A. P., Singh, R., Verma, S. S., Rai, V., Kaschula, C. H., Maiti, P., & Gupta, S. C., *Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies*. *Medicinal research reviews*, 2019. **39**(5): p. 1851-1891.
- [115] Forman, H. J., & Zhang, H., *Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021. **20**(9): p. 689-709.
- [116] Aghajanian, P., Hall, S., Wongworawat, M. D., & Mohan, S., *The roles and mechanisms of actions of vitamin C in bone: new developments*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2015. **30**(11): p. 1945-1955.
- [117] Dresen, E., Lee, Z. Y., Hill, A., Notz, Q., Patel, J. J., & Stoppe, C., *History of scurvy and use of vitamin C in critical illness: A narrative review*. *Nutrition in Clinical Practice*, 2023. **38**(1): p. 46-54.
- [118] Ballaz, S. J., & Rebec, G. V., *Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator*. *Pharmacological research*, 2019. **146**: p. 104321.
- [119] Monacelli, F., Acquarone, E., Giannotti, C., Borghi, R., & Nencioni, A., *Vitamin C, aging and Alzheimer's disease*. *Nutrients*, 2017. **9**(7): p. 670.
- [120] Henriques, S. F., Duque, P., López-Fernández, H., Vázquez, N., Fdez-Riverola, F., Reboiro-Jato, M., Vieira, C. P., & Vieira, J., *Multiple independent L-gulonolactone oxidase (GULO) gene losses and vitamin C synthesis reacquisition events in non-Deuterostomian animal species*. *BMC Evolutionary Biology*, 2019. **19**: p. 1-12.
- [121] Rice, M. E., *Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain*. *Trends in neurosciences*, 2000. **23**(5): p. 209-216.
- [122] Harrison, F. E., *A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012. **29**(4): p. 711-726.
- [123] Moreira, P. L., Villas Boas, P. J. F., & Ferreira, A. L. A., *Association between oxidative stress and nutritional status in the elderly*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2014. **60**: p. 75-83.
- [124] Berger, M., Bischoff-Ferrari, H., Zimmermann, M., Herter, I., Spieldenner, J., & Eggersdorfer, M. (2020). *White Paper on Nutritional Status in Supporting a Well-Functioning Immune System for Optimal Health with a Recommendation for Switzerland* (SGE, Issue).
- [125] Center, L. P. I. M. I. (2020). *Micronutrients for Older Adults*. Oregon State University. Retrieved 20 October from <https://lpi.oregonstate.edu/mic/life-stages/older-adults>
- [126] Levine, M., Wang, Y., Padayatty, S. J., & Morrow, J., *A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(17): p. 9842-9846.
- [127] European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, N. a. A., *Scientific opinion on dietary reference values for vitamin C*. *EFSA Journal*, 2013. **11**(11): p. 3418.
- [128] Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. (2000). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. In *Dietary Reference Intakes*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/9810>
- [129] Kook, S., Lee, K., Kim, Y., Cha, M., Kang, S., Baik, S., Lee, H., Park, R., & Mook-Jung, I., *High-dose of vitamin C supplementation reduces amyloid plaque burden and ameliorates pathological changes in the brain of 5XFAD mice*. *Cell death & disease*, 2014. **5**(2): p. e1083-e1083.
- [130] Capellmann, M., Becka, M., & Bolt, H., *A note on distribution of human plasma levels of ascorbic and dehydroascorbic acid*. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 1994. **45**(1).
- [131] May, J. M., Qu, Z., & Morrow, J. D., *Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1528**(2-3): p. 159-166.
- [132] Rice, M. E., & Russo-Menna, I., *Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia*. *Neuroscience*, 1997. **82**(4): p. 1213-1223.
- [133] Rivas, C., Zúñiga, F., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., & Vera, J., *Vitamin C transporters*. *Journal of physiology and biochemistry*, 2008. **64**: p. 357-375.
- [134] Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischbarg, J., & Golde, D. W., *Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid*. *Nature*, 1993. **364**(6432): p. 79-82.
- [135] Bender, D. A. (2005). ASCORBIC ACID | Physiology, Dietary Sources and Requirements. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)* (p. 169-176). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-226694-3/00023-X>
- [136] Rumsey, S. C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M. J., Simpson, I. A., & Levine, M., *Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in Xenopus Oocytes and isolated rat adipocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(36): p. 28246-28253.
- [137] Liang, W.-J., Johnson, D., & Jarvis, S. M., *Vitamin C transport systems of mammalian cells*. *Molecular membrane biology*, 2001. **18**(1): p. 87-95.

- [138] Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F., & Hediger, M. A., *A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters*. *Nature*, 1999. **399**(6731): p. 70-75.
- [139] Daruwala, R., Song, J., Koh, W. S., Rumsey, S. C., & Levine, M., *Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2*. *FEBS letters*, 1999. **460**(3): p. 480-484.
- [140] Faaland, C. A., Race, J. E., Ricken, G., Warner, F. J., Williams, W. J., & Holtzman, E. J., *Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and Aspergillus nucleobase transporters*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1998. **1442**(2-3): p. 353-360.
- [141] Bürzle, M., Suzuki, Y., Ackermann, D., Miyazaki, H., Maeda, N., Cléménçon, B., Burrier, R., & Hediger, M. A., *The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(2-3): p. 436-454.
- [142] Kourkoulou, A., Pittis, A. A., & Diallinas, G., *Evolution of substrate specificity in the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) protein family*. *Microb Cell*, 2018. **5**(6): p. 280-292.
- [143] Hosoyamada, M., Tomioka, N. H., Watanabe, T., Yasuno, N., Uchida, S., & Shibata, S., *SLC23A3 is a renal hypoxanthine transporter*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2022. **41**(12): p. 1279-1286.
- [144] Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L. D., Leibach, F. H., Ganapathy, V., & Prasad, P. D., *Human Na⁺-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1999. **1461**(1): p. 1-9.
- [145] Lutsenko, E. A., Carcamo, J. M., & Golde, D. W., *A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(8): p. 3150-3156.
- [146] Ramírez, E., Jara, N., Ferrada, L., Salazar, K., Martínez, F., Oviedo, M. J., Tereszczuk, J., Ramírez-Carbonell, S., Vollmann-Zwerenz, A., & Hau, P., *Glioblastoma invasiveness and collagen secretion are enhanced by vitamin C*. *Antioxidants & redox signaling*, 2022. **37**(7-9): p. 538-559.
- [147] Salazar, K., Cerda, G., Martínez, F., Sarmiento, J. M., González, C., Rodríguez, F., García-Robles, M., Tapia, J. C., Cifuentes, M., & Nualart, F., *SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform*. *Journal of neurochemistry*, 2014. **130**(5): p. 693-706.
- [148] STRATAKIS, C. A., TAYMANS, S. E., DARUWALA, R., SONG, J., & LEVINE, M., *Mapping of the human genes (SLC23A2 and SLC23A1) coding for vitamin C transporters 1 and 2 (SVCT1 and SVCT2) to 5q23 and 20p12, respectively*. *Journal of Medical Genetics*, 2000. **37**(9): p. e20-e20.
- [149] Takanaga, H., Mackenzie, B., & Hediger, M. A., *Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23*. *Pflügers Archiv*, 2004. **447**: p. 677-682.
- [150] Wilson, J. X., *Regulation of vitamin C transport*. *Annu. Rev. Nutr.*, 2005. **25**(1): p. 105-125.
- [151] Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., & Catani, M., *SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake*. *Amino acids*, 2008. **34**: p. 347-355.
- [152] Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zúñiga, F. A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., & Guzmán, C., *Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2: activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(1): p. 615-624.
- [153] Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millán, C., Reinicke, K., Vera, J. C., Vásquez, O., Aguayo, L. G., & Nualart, F., *High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons*. *Journal of neurochemistry*, 2001. **78**(4): p. 815-823.
- [154] García, M. D. L. A., Salazar, K., Millán, C., Rodríguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., & Vera, J. C., *Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells*. *Glia*, 2005. **50**(1): p. 32-47.
- [155] Biondi, C., Pavan, B., Dalpiaz, A., Medici, S., Lunghi, L., & Vesce, F., *Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs*. *Molecular human reproduction*, 2007. **13**(1): p. 77-83.
- [156] Qiao, H., & May, J. M., *Regulation of the human ascorbate transporter SVCT2 exon 1b gene by zinc-finger transcription factors*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. **50**(9): p. 1196-1209.
- [157] Gess, B., Sevimli, S., Strecker, J.-K., Young, P., & Schäbitz, W.-R., *Sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2) expression and activity in brain capillary endothelial cells after transient ischemia in mice*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17139.
- [158] Sandoval, D., Ojeda, J., Low, M., Nualart, F., Marcellini, S., Osses, N., & Henríquez, J. P., *The vitamin C transporter SVCT2 is down-regulated during postnatal development of slow skeletal muscles*. *Histochemistry and cell Biology*, 2013. **139**: p. 887-894.
- [159] Michels, A. J., Joisher, N., & Hagen, T. M., *Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2003. **410**(1): p. 112-120.
- [160] Forman, K., Martínez, F., Cifuentes, M., Bertinat, R., Salazar, K., & Nualart, F., *Aging selectively modulates vitamin c transporter expression patterns in the kidney*. *Journal of Cellular Physiology*, 2017. **232**(9): p. 2418-2426.

- [161] Kashiouris, M. G., L'Heureux, M., Cable, C. A., Fisher, B. J., Leichtle, S. W., & Fowler, A. A., *The emerging role of vitamin C as a treatment for sepsis*. *Nutrients*, 2020. **12**(2): p. 292.
- [162] Rajan, D. P., Huang, W., Dutta, B., Devoe, L. D., Leibach, F. H., Ganapathy, V., & Prasad, P. D., *Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1999. **262**(3): p. 762-768.
- [163] Reidling, J. C., Subramanian, V. S., Dahhan, T., Sadat, M., & Said, H. M., *Mechanisms and regulation of vitamin C uptake: studies of the hSVCT systems in human liver epithelial cells*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008. **295**(6): p. G1217-G1227.
- [164] Velho, A. M., & Jarvis, S. M., *Topological studies of hSVCT1, the human sodium-dependent vitamin C transporter and the influence of N-glycosylation on its intracellular targeting*. *Experimental cell research*, 2009. **315**(13): p. 2312-2321.
- [165] Milby, K., Oke, A., & Adams, R., *Detailed mapping of ascorbate distribution in rat brain*. *Neuroscience letters*, 1982. **28**(1): p. 15-20.
- [166] Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Montecinos, H., Millán, C., García, M. d. I. A., & Nualart, F., *The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids*. *Journal of neurochemistry*, 2009. **108**(3): p. 563-577.
- [167] 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., *Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain*. *Journal of neuroscience research*, 2006. **83**(5): p. 919-928.
- [168] Clark, A. G., Rohrbaugh, A. L., Otterness, I., & Kraus, V. B., *The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants*. *Matrix Biology*, 2002. **21**(2): p. 175-184.
- [169] Qiu, S., Li, L., Weeber, E. J., & May, J. M., *Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity*. *Journal of neuroscience research*, 2007. **85**(5): p. 1046-1056.
- [170] Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., Miller, G. F., Kwon, O., Levine, M., Guttentag, S. H., & Nussbaum, R. L., *Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival*. *Nat Med*, 2002. **8**(5): p. 514-517.
- [171] Harrison, F., Dawes, S., Meredith, M., Babaev, V., Li, L., & May, J., *Low vitamin C and increased oxidative stress and cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010. **49**(5): p. 821-829.
- [172] McNulty, A. L., Vail, T. P., & Kraus, V. B., *Chondrocyte transport and concentration of ascorbic acid is mediated by SVCT2*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2005. **1712**(2): p. 212-221.
- [173] Muñoz-Montesino, C., Roa, F. J., Peña, E., González, M., Sotomayor, K., Inostroza, E., Muñoz, C. A., González, I., Maldonado, M., Soliz, C., Reyes, A. M., Vera, J. C., & Rivas, C. I., *Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **70**: p. 241-254.
- [174] Muñoz-Montesino, C., Peña, E., Roa, F. J., Sotomayor, K., Escobar, E., & Rivas, C. I., *Transport of vitamin C in cancer: Antioxidants & redox signaling*, 2021. **35**(1): p. 61-74.
- [175] Yin, J., Song, Y., Zhang, N., Xu, T., & Wang, H., *A fluorophore-conjugated ascorbic acid functions for the visualization of sodium vitamin C transporters in living cells*. *Analytical Methods*, 2015. **7**(22): p. 9663-9672.
- [176] Azzolini, C., Fiorani, M., Cerioni, L., Guidarelli, A., & Cantoni, O., *Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria*. *IUBMB life*, 2013. **65**(2): p. 149-153.
- [177] Peña, E., Roa, F. J., Inostroza, E., Sotomayor, K., González, M., Gutierrez-Castro, F. A., Maurin, M., Sweet, K., Labrousse, C., Gatica, M., Aylwin, C. F., Mendoza, P., Maldonado, M., Delgado, C., Madariaga, J., Panes, J., Silva-Grecchi, T., Concha, I., Moraga-Cid, G.,...Rivas, C. I., *Increased expression of mitochondrial sodium-coupled ascorbic acid transporter-2 (mitSVCT2) as a central feature in breast cancer*. *Free Radic Biol Med*, 2019. **135**: p. 283-292.
- [178] Panes, J. D., Godoy, P. A., Silva-Grecchi, T., Celis, M. T., Ramirez-Molina, O., Gavilan, J., Muñoz-Montecino, C., Castro, P. A., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E., *Changes in PGC-1 α /SIRT1 signaling impact on mitochondrial homeostasis in amyloid-beta peptide toxicity model*. *Frontiers in pharmacology*, 2020. **11**: p. 709.
- [179] Ostu, N., *A threshold selection method from gray-level histograms*. *IEEE Trans SMC*, 1979. **9**: p. 62.
- [180] Shihan, M. H., Novo, S. G., Le Marchand, S. J., Wang, Y., & Duncan, M. K., *A simple method for quantitating confocal fluorescent images*. *Biochemistry and biophysics reports*, 2021. **25**: p. 100916.
- [181] Cordeliers, F. P., & Bolte, S. (2008). *JACoP v2. 0: improving the user experience with co-localization studies*. *ImageJ User & Developer Conference*,
- [182] Hamid, M., Mansoor, S., Amber, S., & Zahid, S., *A quantitative meta-analysis of vitamin C in the pathophysiology of Alzheimer's disease*. *Frontiers in aging neuroscience*, 2022. **14**: p. 970263.
- [183] Dong, R., Yang, Q., Zhang, Y., Li, J., Zhang, L., & Zhao, H., *Meta-analysis of vitamin C, vitamin E and β -carotene levels in the plasma of Alzheimer's disease patients*. *Wei Sheng yan jiu= Journal of Hygiene Research*, 2018. **47**(4): p. 648-654.
- [184] Williams, D. M., Hägg, S., & Pedersen, N. L., *Circulating antioxidants and Alzheimer disease prevention: a Mendelian randomization study*. *The American journal of clinical nutrition*, 2019. **109**(1): p. 90-98.

- [185] Chen, L., Sun, X., Wang, Z., Lu, Y., Chen, M., He, Y., Xu, H., & Zheng, L., *The impact of plasma vitamin C levels on the risk of cardiovascular diseases and Alzheimer's disease: a Mendelian randomization study*. *Clinical Nutrition*, 2021. **40**(10): p. 5327-5334.
- [186] Heo, J.-H., Hyon-Lee, & Lee, K.-M., *The possible role of antioxidant vitamin C in Alzheimer's disease treatment and prevention*. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*®, 2013. **28**(2): p. 120-125.
- [187] Boothby, L. A., & Doering, P. L., *Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease*. *Annals of Pharmacotherapy*, 2005. **39**(12): p. 2073-2080.
- [188] Salazar, K., Espinoza, F., Cerda-Gallardo, G., Ferrada, L., Magdalena, R., Ramírez, E., Ulloa, V., Saldivia, N., Troncoso, N., & Oviedo, M. J., *SVCT2 overexpression and ascorbic acid uptake increase cortical neuron differentiation, which is dependent on vitamin c recycling between neurons and astrocytes*. *Antioxidants*, 2021. **10**(9): p. 1413.
- [189] Covarrubias-Pinto, A., Parra, A. V., Mayorga-Weber, G., Papic, E., Vicencio, I., Ehrenfeld, P., Rivera, F. J., & Castro, M. A., *Impaired intracellular trafficking of sodium-dependent vitamin C transporter 2 contributes to the redox imbalance in Huntington's disease*. *Journal of neuroscience research*, 2021. **99**(1): p. 223-235.
- [190] Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H., *Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD*. *Neurology*, 2002. **58**(12): p. 1791-1800.
- [191] Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L., *Alzheimer's disease*. *Nature Reviews Disease Primers*, 2015. **1**(1): p. 15056.
- [192] Hortsch, M., *The Michigan Histology website as an example of a free anatomical resource serving learners and educators worldwide*. *Anatomical Sciences Education*, 2023. **16**(3): p. 363-371.
- [193] Praditi, C., Bozonet, S. M., Dachs, G. U., & Vissers, M. C., *Ascorbate Uptake and Retention by Breast Cancer Cell Lines and the Intracellular Distribution of Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2*. *Antioxidants*, 2023. **12**(11): p. 1929.
- [194] Schonrock, N., Ke, Y. D., Humphreys, D., Staufenbiel, M., Ittner, L. M., Preiss, T., & Götz, J., *Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid- β* . *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11070.
- [195] Li, J. J., Dolios, G., Wang, R., & Liao, F.-F., *Soluble beta-amyloid peptides, but not insoluble fibrils, have specific effect on neuronal microRNA expression*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90770.
- [196] Sangani, R., Periyasamy-Thandavan, S., Kolhe, R., Bhattacharyya, M. H., Chutkan, N., Hunter, M., Isales, C., Hamrick, M., Hill, W. D., & Fulzele, S., *MicroRNAs-141 and 200a regulate the SVCT2 transporter in bone marrow stromal cells*. *Molecular and cellular endocrinology*, 2015. **410**: p. 19-26.
- [197] Ruiz-Perera, L. M., Schneider, L., Windmüller, B. A., Müller, J., Greiner, J. F., Kaltschmidt, C., & Kaltschmidt, B., *NF- κ B p65 directs sex-specific neuroprotection in human neurons*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 16012.
- [198] Chmiel, J. A., Stuivenberg, G. A., Al, K. F., Akouris, P. P., Razvi, H., Burton, J. P., & Bjazevic, J., *Vitamins as regulators of calcium-containing kidney stones—new perspectives on the role of the gut microbiome*. *Nature Reviews Urology*, 2023. **20**(10): p. 615-637.
- [199] Course, M. M., Gudsnuk, K., Keene, C. D., Bird, T. D., Jayadev, S., & Valdmanis, P. N., *Aberrant splicing of PSEN2, but not PSEN1, in individuals with sporadic Alzheimer's disease*. *Brain*, 2023. **146**(2): p. 507-518.
- [200] Glatz, D. C., Rujescu, D., Tang, Y., Berendt, F. J., Hartmann, A. M., Faltraco, F., Rosenberg, C., Hulette, C., Jellinger, K., & Hampel, H., *The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease*. *Journal of neurochemistry*, 2006. **96**(3): p. 635-644.
- [201] Lee, C., Low, C. Y., Wong, S. Y., Lai, M. K., & Tan, M. G., *Selective induction of alternatively spliced FynT isoform by TNF facilitates persistent inflammatory responses in astrocytes*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 43651.
- [202] Kobylecki, C., Crossman, A. R., & Ravenscroft, P., *Alternative splicing of AMPA receptor subunits in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia*. *Experimental neurology*, 2013. **247**: p. 476-484.
- [203] Edwards, M. A., Loxley, R. A., Williams, A. J., Connor, M., & Phillips, J. K., *Lack of functional expression of NMDA receptors in PC12 cells*. *NeuroToxicology*, 2007. **28**(4): p. 876-885.
- [204] Onódi, Z., Visnovitz, T., Kiss, B., Hambalkó, S., Koncz, A., Ágg, B., Váradi, B., Tóth, V. É., Nagy, R. N., & Gergely, T. G., *Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2022. **165**: p. 19-30.